



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



# **HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİNİN (HBOT) SEBEP OLDUĞU GENOTOKSİK ETKİLERİN İNCELENMESİ**

**Aylin ÜSTÜNDAĞ**

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Yalçın DUYDU**

**2010- ANKARA**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HİPERBARİK OKSİJEN TEDAVİSİNİN (HBOT) SEBEP  
OLDUĞU GENOTOKSİK ETKİLERİN İNCELENMESİ**

**Aylin ÜSTÜNDAĞ**

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Yalçın DUYDU**

**2010- ANKARA**

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
**Farmasötik Toksikoloji Doktora Programı**  
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından  
**Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 04 / 06 / 2010



Prof. Dr. Mümtaz İŞCAN

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

(Jüri Başkanı)



Prof. Dr. Nurşen BAŞARAN

Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi



Prof. Dr. Yalçın DUYDU

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

(Danışman)



Prof. Dr. Sinan SÜZEN

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi



Prof. Dr. Ahmet AYDIN

Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	viii
Çizelgeler	x
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Hiperbarik Oksijen Tedavisi	1
1.1.1. Tanımı ve Tarihçesi	1
1.1.2. Basınç Odaları ve Tedavinin Uygulanması	2
1.1.3. Temel Etki Mekanizması ve Fizyolojik Etkileri	4
1.1.4. Kullanım Alanları ve Fizyopatolojik Etkileri	5
1.1.5. DNA Hasarı ve DNA Onarım Mekanizmaları	13
1.1.6. HBO'nun Genotoksitesitesi	18
1.1.7. Adaptif Cevap Gelişmesi	21
1.1.8. HBO'nin İndüklediği in-vivo Gen ve Kromozom Mutasyonları	24
1.1.9. HBO'nin İndüklediği in-vitro Gen ve Kromozom Mutasyonları	27
1.1.10. Vitamin Kullanımı	28
1.2. Komet Testi (Tek Hücre Jel Elektroforezi)	30
1.2.1. Komet Testinin Kullanım Alanları	32
1.2.2. Komet Testinin Avantajları	33
1.2.3. Fpg (Formamido Pirimidin Glikozilaz) ile Modifiye Komet Testi	34
1.3. Sitokinez Bloke Edilmiş Mikroçekirdek (Cytokinesis Blocked Micronuclei, CBMN) Yöntemi	35
1.3.1. CBMN Yönteminin Avantajları	37
1.4. Tezin Amacı	38
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>41</b>
2.1. Gereç	41
2.1.1. Kullanılan Maddeler	41
2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler	42
2.1.3. Çalışmamızda Yer Alacak Olan Hasta Grubu Ve Hasta Sayısı	42
2.1.4. GATA Deniz ve Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalında uygulanacak HBOT'si protokolü	43
2.2. Yöntem	44
2.2.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	44
2.2.2. Yöntem Basamakları	46
2.2.2.1. Kandan Lenfosit İzolasyonu	49
2.2.2.2 Lenfositlerin Mikroskopta Sayılması	50

2.2.2.3 Lenfositlerin -80 °C'de Saklanması	51
2.2.3. Komet Analizi	52
2.2.4. Oluşan Oksidatif DNA Hasarının Onarımının Gösterilmesi	54
2.2.5. Formamidopirimidin Glikozilaz (Fpg) Enziminin Kullanıldığı Modifiye Komet Analizi	54
2.2.6. 10 Seanslık HBOT'ne Giren Hastaların 1. ve 5. Seansında Alınan Kan Örneklerine Uygulanan Komet Testi	55
2.2.7. Sitokinezi Bloke Edilmiş Mikroçekirdek Testi (Cytokinesis-Blocked Micronuclei, CBMN)	55
2.3. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	58
<b>3. BULGULAR</b>	59
3.1. Tez Çalışmamıza Katılan Grubun Özellikleri	59
3.2. Komet Testi Uygulamaları ile Elde Edilen Sonuçlar	61
3.2.1. Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ile Elde Edilen Sonuçlar	61
3.2.2. HBO Tedavisi Gören Hastalardan Elde Edilen Komet Testi Sonuçları	63
3.2.2.1 HBOT'den Önce ve İlk Seanstan Sonra Alınan Örneklerle Ait Sonuçlar	63
3.2.2.2 HBOT'den Önce ve İlk Seanstan Sonra Alınan Örneklerin Hasta Grubunun Özelliklerine Göre Değerlendirilmesi	70
3.2.2.3. HBOT'nin 1. ve 5. Seansından Önce ve Sonra Alınan Örneklerle Ait Sonuçlar	83
3.3. Sitokinezi Bloke Edilmiş Mikroçekirdek (CBMN) Testi Kullanılarak Elde Edilen Sonuçlar	90
3.3.1. Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan MMC (Mitomisin-C) ile Elde Edilen CBMN Testi Sonuçları	90
3.3.2. HBOT'den Önce ve İlk Seanstan Sonra Alınan Örneklerle Ait Sitokinezi Bloke Edilmiş Mikroçekirdek Testi Sonuçları	92
3.4. Komet Testi İle Gözlenen DNA Hasarının Fluoresan Mikroskop Altındaki Görüntüleri	95
3.5. CBMN Testi İle Gözlenen BNMN'lerin Işık Mikroskobu Altındaki Görüntüleri	97
<b>4. TARTIŞMA</b>	98
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	110
<b>ÖZET</b>	113
<b>SUMMARY</b>	114
<b>KAYNAKLAR</b>	115
<b>EKLER</b>	124
<b>Ek-1: ETİK KURUL RAPORU</b>	124
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	126

## ÖNSÖZ

“Hiperbarik oksijen tedavisinin (HBOT) sebep olduğu genotoksik etkilerin incelenmesi” başlıklı doktora tezimde hocam Prof. Dr. Yalçın DUYDU danışmanlığında GATA Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp AD’dan 100 hastadan numune alınarak çalışılmıştır. Bu hastalarda DNA hasarı ve onarımı incelenmiş ayrıca klastojenik etkiler araştırılmıştır.

Doktora tezimin deney kurgusu, deneysel çalışmaları ve tezin hazırlanması sırasında bana yol gösteren, her konuda benden yardım, hoşgörü ve desteğini esirgemeyen, tecrübeleriyle beni yetiştiren değerli hocam Sayın Prof. Dr. Yalçın DUYDU’ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında her türlü olanağı saylayan, destek ve yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalımız Öğretim Üyesi hocalarımaya saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Gerek çalışmalarım, gerekse özel hayatımda destek ve yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım Özge ÜLKER’e ve Anabilim Dalımızın diğer araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tezim sırasında benden yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof Dr. Nurşen Başaran’a ve her türlü yardım ve desteğini gördüğüm arkadaşım Dr. Sevtap AYDIN’a teşekkürlerimi sunarım.

Benden yardım ve desteklerini esirgemeyen, deneylerimin bir kısmını yapabilmem için bana laboratuvarlarını sunan Yeditepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ecz. Ahmet AYDIN’a teşekkür ederim.

Tezimin deneysel aşamalarındaki hastaların takibi ve numune alımlarını temin eden ve bu konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Servisi Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Hakan AY ve GATA Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp AD Öğretim Üyesi Dr. Kemal Şimşek’e ve diğer Öğretim Üyelerine, çalışmalarımda bana yardımcı olan arkadaşım Dr. Bio. Ayşe EKEN’e ayrıca numune alımı ve anket doldurma aşamalarında yardımlarını esirgemeyen hemşire Eda DEMİR, Hülya YİĞİT, Nurhan ÖZCAN ve Kıymet KOÇ’a teşekkürlerimi sunarım.

Yaptığım çalışmalar sırasında ve tüm hayatım boyunca bana gösterdikleri manevi destekten dolayı aileme, her konuda hoşgörü ve desteğini esirgemeyen sevgili eşim Özgür ÜSTÜNDAĞ’a ve biricik kızım NİSAN’a teşekkürlerimi sunarım.

## SİMGELER ve KISALTMALAR

ALS	Alkali oynak bölgeleri (alkali-labile sites)
AP	Apürinik veya apirimidinik
APC	Apidikolin
APE	Apürinik endonükleaz
ATA	Normal atmosfer basıncı (atmosfer absolut)
ATP	Adenozin trifosfat
AU	Arbitrary Units
BER	Baz kesip çıkarma (eksizyon) onarımı
BNMN	Çift çekirdekli hücrelerdeki mikroçekirdek (Binucleated cells with micronuclei)
BSA	Bovine Serum Albumin (Sığır serum albümini)
CAT	Katalaz
CBMN	Sitokinezi Bloke Edilmiş Mikroçekirdek (Cytokinesis Blocked Micronuclei) Yöntemi
CO	Karbon monoksit
DMSO	Dimetilsülfoksit
DSB	DNA çift zincir kırıkları (Double strand break)
E. coli	Escherichia coli
Fapy-Ade	4,6-diamino-5-formamido-pirimidin
Fapy-Gua	2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin
Fpg	Formamidopirimidin glikozilaz
GATA	Gülhane Askeri Tıp Akademisi
GPx	Glutatyon peroksidaz
GSH	Glutatyon
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
HBO	Hiperbarik oksijen
HBOT	Hiperbarik oksijen tedavisi
HO-1	Hem oksijenaz-1
HPRT	Hipoksantin guanin fosforibosil transferaz
Komet testi	Tek hücre jel elektroforezi (single cell gel electrophoresis, SCGE)
LMA	Düşük erime noktalı agar (Low melting point agar)
MMC	Mitomisin-C
MMR	Yanlış eşleşme onarımı (Mismatch repair)
Na <sub>2</sub> EDTA	Disodyum etilen diamin tetra asetik asit
NAC	N-asetil sistein
NDI	Çekirdek bölünme indeksi (Nuclear Division Index)
Nei	Endonükleaz VIII
NER	Nükleotid kesip çıkarma (eksizyon) onarımı
NMA	Normal erime noktalı agar (Normal melting point agar)

Nth	Endonükleaz III
Ogg1	8-oksoguanin glikozilaz
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
pO <sub>2</sub>	Parsiyel oksijen basıncı
ROM	Reaktif oksijen metabolitleri
SnMP	Kalay-mesoporfirin
SOD	Süperoksit dismutaz
SSB	DNA tek zincir kırıkları (Single strand break)
TÖ	Tedavi öncesi
TS	Tedavi sonrası
8-oksoadenin	7,8-dihidro-8-oksoadenin
8-oksoguanin	7,8-dihidro-8-oksoguanin



## ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA), Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalında bulunan tek kişilik hiperbarik oda	3
Şekil 1.2. Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA), Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalında bulunan çok kişilik hiperbarik kabin	3
Şekil 1.3 DNA hasarı çeşitleri	13
Şekil 1.4. DNA onarımı gerçekleşmediğinde olası sonuçlar	14
Şekil 1.5. DNA onarım mekanizmaları	15
Şekil 1.6. Yanlış eşleşme onarım mekanizması	17
Şekil 1.7. Baz kesip çıkarma onarımı (BER) mekanizması	18
Şekil 1.8 Hem metabolizması	22
Şekil 1.9. Komet testi ile belirlenen DNA lezyonlarının olası yazgısı	31
Şekil 1.10. Floresans mikroskop komet görüntüleri	32
Şekil 1.11. Hücre bölünmesi sırasında CBMN yöntemi ile çekirdek ve mikroçekirdeklerin görünüşü	37
Şekil 2.1. HBOT için gelen hastalardan alınan kan örneklerinde uygulanan işlemlerin özetle şematik olarak gösterilmesi	47
Şekil 2.2. 10 seans boyunca HBOT gören hastalarda ilk 5 seans içinde oluşan oksidatif DNA hasarının karşılaştırılması	48
Şekil 2.3. Lenfosit izolasyon basamakları	49
Şekil 2.4. Sitospin santrijüj	50
Şekil 2.4. Sitospin santrijüj	56
Şekil 3.1. Lenfosit hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan 50 µM ve 100 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ile komet testi ve fpg ile modifiye edilmiş komet testi sonuçları	62
Şekil 3.2. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası taze olarak çalışılan örneklerle -80°C'den çıkarılarak çalışılan örneklerin sonuçları	65
Şekil 3.3. 100 hastaya ait tedavi öncesi, tedavi sonrası ve 15., 30., 60. ve 120. dakikalardaki komet testi sonucunda elde edilen ortalama arbitrary units (AU) değerleri	69
Şekil 3.4. 100 hastaya ait tedavi öncesi, tedavi sonrası fpg proteini kullanılarak uygulanan komet testi sonucunda elde edilen ortalama arbitrary units (AU) değerleri	70
Şekil 3.5. Tez çalışmamıza katılan 100 hasta ile elde edilen komet testi sonuçlarının erkek (n:77) ve kadın (n:23) olmak üzere cinsiyete bağlı olarak sonuçları	71
Şekil 3.6. Tez çalışmamıza katılan 100 hasta ile elde edilen komet testi sonuçlarının sigara içen (n:28) ve sigara içmeyen (n:72) olmak üzere gruplandırılmasıyla elde edilen sonuçlar	73
Şekil 3.7. Tez çalışmamıza katılan 100 hasta ile elde edilen komet testi sonuçlarının sigara içen erkek (n:21), sigara	75

- içmeyen erkek (n:56), sigara içen kadın (n:7) ve sigara içmeyen kadın (n:16) olmak üzere gruplandırılmasıyla elde edilen sonuçlar
- Şekil 3.8. Tez çalışmamıza katılan 100 hasta ile elde edilen komet testi sonuçlarının röntgen çektiren (n:34) ve röntgen çektirmeyen(n:66) olmak üzere gruplandırılmasıyla elde edilen sonuçlar 76
- Şekil 3.9. Tez çalışmamıza katılan 100 hasta ile elde edilen komet testi sonuçlarının kahve içen (n:31) ve kahve içmeyen (n:69) olmak üzere gruplandırılmasıyla elde edilen sonuçlar 78
- Şekil 3.10. Tez çalışmamıza katılan 100 hasta ile elde edilen komet testi sonuçlarının yaş dağılımına bağlı olarak; <30 (n:28), 30-45 (n:34), 45-60 (n:25) ve >60 (n:13) olmak üzere gruplandırılmasıyla elde edilen sonuçlar 80
- Şekil 3.11. Tez çalışmamıza katılan 100 hasta ile elde edilen komet testi sonuçlarının hastalık durumuna bağlı olarak; ani işitme kaybı (n:36), diyabetik ayak (n:22), CO intoksikasyonu (n:2) ve diğer hastalıklar (n:40) olmak üzere gruplandırılmasıyla elde edilen sonuçlar 82
- Şekil 3.12. 5 hastaya ait tedaviye başlamadan önce ve ilk seans sonrasında ve tedavinin ortasına denk gelen 5. seans öncesinde ve seans sonrasında uygulanan komet testi sonuçları ve bu 5 hastaya ait sonuçların ortalaması 84
- Şekil 3.13. 5 hastaya ait tedaviye başlamadan önce ve ilk seans sonrasında ve tedavinin ortasına denk gelen 5. seans öncesinde ve seans sonrasında alınan örneklerle 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması ve 2 saatlik inkubasyon ile elde edilen komet testi sonuçları ve bu 5 hastaya ait sonuçların ortalaması 86  
87  
88
- Şekil 3.14. Lenfositlere pozitif kontrol olarak uygulanan 10, 20, 40 ve 60 ng/ml MMC ile elde edilen mikroçekirdek sayıları ve NDI değerleri 91
- Şekil 3.15. HBO tedavisi gören 90 hastaya ait tedaviye başlamadan hemen önce (TÖ) ve ilk tedavi seansından sonra (TS) alınan kan örneklerinde uygulanan CBMN testi sonuçlarına ait ortalama MN ve NDI değerleri 94
- Şekil 3.16. Floresan mikroskop altındaki hasarsız (0) (mikroskop büyütmesi: 40x0.65), az hasarlı (1) (mikroskop büyütmesi: 10x0.25), orta hasarlı (2) (mikroskop büyütmesi: 40x0.65), hasarlı (3) (mikroskop büyütmesi: 40x0.65) ve çok hasarlı (4) (mikroskop büyütmesi: 40x0.65) DNA'ya ait komet görüntüleri 95  
96
- Şekil 3.17. CBMN yöntemiyle değerlendirmeye alınan ve alınmayan çekirdeklerin ve mikroçekirdeklerin mikroskop görüntüleri (20x0.40 mikroskop büyütmesi ile) 97

**ÇİZELGELER**

Çizelge 1.1 HBO'nin neden olduğu in-vivo ve in-vitro genotoksik etkiler	26
Çizelge 3.1. GATA Deniz ve Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı'na HBO tedavisi için başvuran hastalar arasından gönüllü olarak tez çalışmamıza katılan 100 hastanın özellikleri	59 60
Çizelge 3.2. Lenfosit hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan 50 µM ve 100 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ile komet testi ve fpg ile modifiye edilmiş komet testi sonuçları	61
Çizelge 3.3 Tedavi öncesi ve tedavi sonrası taze olarak çalışılan örneklerle -80°C'den çıkarılarak çalışılan örneklerin sonuçları arasında istatikselsel olarak bir farklılık bulunmamıştır	64
Çizelge 3.4. 100 hastaya ait tedavi öncesi (Tö) ve tedavi sonrası (TS) komet testi ve fpg proteini ile modifiye edilmiş komet testi sonuçları	66 67
Çizelge 3.5. 5 hastaya ait ilk seans öncesi ve sonrası, 5. seans öncesi ve sonrası alınan örneklerde uygulanan ve bu örneklerin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 'ye maruz bırakılması ile komet testi uygulanarak elde edilen arbitrary units (AU) değerleri	89
Çizelge 3.6. Lenfositlere pozitif kontrol olarak uygulanan 10, 20, 40 ve 60 ng/ml MMC ile elde edilen mikroçekirdek sayıları ve NDI değerleri	90
Çizelge 3.7. 90 hastaya ait MN ve NDI değerleri, ortalama değerler ve standart sapma değerleri	93

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Hiperbarik Oksijen Tedavisi

### 1.1.1. Tanımı ve Tarihçesi

Hiperbarik Oksijen (HBO) tedavisi, tamamen kapalı basınç odalarında, normal atmosfer basıncından yüksek basınçlar altında aralıklı olarak %100 oksijen solutulmak suretiyle uygulanan tıbbi tedavi yöntemidir (Cunningham, 1927).

Hiperbarik tedavinin tarihçesi çok eskilere dayanmaktadır. İlk olarak İngiliz bir papaz olan Henshaw, henüz oksijen keşfedilmemiş iken, kapalı bir odada basıncı artırma fikri ile 1662 yılında sızdırmaz bir oda inşa ederek hastalar üzerinde uygulama yapmıştır (Gill ve Bell, 2004). 1879 yılında Fransız cerrah Fontaine tekerler üzerinde hareket edebilen ve içindeki basıncın arttırılabildiği bir ameliyat odası inşa etmiş ve bu oda içinde cerrahi ameliyatlar gerçekleştirmiştir (Fontaine, 1879). 1891 yılında Corning, Birleşik Devletler'e "Basıncılı hava tedavisi"ni tanıtmış ve elektrik enerjisi ile çalışan kompresörü işleten ilk kişi olmuştur (Corning, 1891) . Kansas Üniversitesinde anestezi profesörü olan Cunningham, kalp ve dolaşım bozukluğu olan insanların yüksek irtifada yaşadıklarında kötüleştiklerini, deniz seviyesine döndüklerinde ise düzeldiklerini tespit etmiştir. Bu tespiti baz alarak, artırılmış atmosferik basıncın kalp ve dolaşım hastalıklarında yararlı olabileceğini düşünmüştür. 1918 yılındaki grip epidemisinde hastalanarak hayvan deneylerinde kullandığı hiperbarik odaya yerleşmiş ve kendine basınç uygulamıştır. Bu şekilde kendini hipoksi krizleri süresince başarılı bir şekilde

oksijenize etmiştir. Bu olayla birlikte Kansas şehrinde 27 metre uzunluğunda 3 metre eninde bir oda inşa etmiş ve hasta gruplarını tedavi etmeye çalışmıştır (Jacobson ve ark., 1965). 1775 yılında Priestley tarafından oksijenin keşfedilmesiyle birlikte hiperbarik uygulamalarda artış olmuştur.

HBO tedavisinin bugünkü anlamda kullanılması 1930'lu yıllardan sonra Amerikan ve İngiliz donanmalarında dekompresyon hastalığının tedavisinde kullanılmaya başlaması ile ortaya çıkmıştır. Tedavi edici hekimlikte hiperbarik odaların kullanımı ise Churchill-Davidson'un çalışmaları ile 1955 yılında başlamıştır. Bu araştırmacı, kanser hastalarında radyasyon tedavisinin etkilerini artırmak için yüksek oksijen içeren ortamı kullanmayı deneyen ilk kişi olmuştur (Churchill-Davidson ve ark., 1955). Daha sonraları çeşitli araştırmacılar ve doktorlar tarafından büyük damarların transpozisyonunda, CO zehirlenmelerinde ve anaerobik enfeksiyonlara karşı kullanılabileceği gösterilmiştir (Gill ve Bell, 2004).

### **1.1.2. Basınç Odaları ve Tedavinin Uygulanması**

HBO uygulaması için kullanılan odalara "Hiperbarik oda" denir. Genel olarak 2 çeşit hiperbarik oda kullanılır:

- a) Tek kişilik hiperbarik kabin



**Şekil 1.1** Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA), Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalında bulunan tek kişilik hiperbarik kabin

b) Çok kişilik hiperbarik oda



**Şekil 1.2** Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA), Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalında bulunan çok kişilik hiperbarik oda

Bu odaların basıncı hava ile artırılır ve hastalar özel maskeler veya oksijen başlıkları yardımıyla oksijen solurlar. Tedavi koşullarında normal atmosfer basıncının (1 ATA= 760 mm Hg) üzerinde ve 3 ATA'ya kadar basınç uygulanabilir. Çoğu tedavi 2 veya 3 ATA basınçta verilir ve ortalama tedavi süresi 60-120 dakikadır. Uygulama sayısı akut durumlarda 3-5 seanstan, kronik durumlarda ise 40-80 seansa kadar değişebilir. Tedavi uygulamasından önce güvenlik açısından hastaların tedavi esnasında statik elektrik yükleyebilecek giysiler, petrol ürünü giysi ve kozmetik malzemeler

kullanmamaları gerekmektedir. HBO tedavisi alacak hasta uygulama hakkında bilgilendirildikten sonra tedavi prosedürü bu konuda tecrübeli sağlık personeli tarafından uygulanır. Tedavi esnasında da hasta yönlendirilebilir (Topal ve Korkmaz, 2008).

### **1.1.3. Temel Etki Mekanizması ve Fizyolojik Etkileri**

Hiperbarik oksijenizasyonun insan vücudu üzerinde 2 temel etkisi vardır. Bunlardan biri vücut içindeki gazlar üzerine mekanik etkisi, diğeri ise parsiyel oksijen basıncını ( $pO_2$ ) arttırıcı etkisidir. Genel olarak tedavi edici etkinliği bu 2 temel etki üzerindedir.

1. *Mekanik Etkisi:* Basınç artışının mekanik etkisi insan vücudundaki hava kabarcıkları ve gaz içeren boşluklar üzerinde yaptığı değişikliklerle oluşur. Bu etkiler fizik kanunlarından Boyle-Mariotte kanunu (sabit sıcaklıktaki hacim basınçla ters orantılıdır) ile açıklanır. Basınç arttıkça havanın hacmi bu kanun gereğince azalacağından dekompresyon hastalığı ve gaz embolisi hastalıklarında hiperbarik tedavi kullanılmaktadır.

2. *Oksijen Çözünürlüğünü Arttırıcı Etkisi:* Normal şartlar altında oksijen çok büyük oranda kanda hemoglobine bağlı olarak taşınmakta çok az bir kısmı plazmada çözünmektedir (%1,5-3). Fakat hiperbarik şartlarda vücudun rutin gereksinimlerini tek başına karşılayabilecek kadar oksijenin plazmada çözünmesini sağlamak mümkündür. Örneğin 3 ATA'da kandaki çözünmüş oksijen içeriği % 6,8'lik bir hacme yükselir. Plazmada çözünmüş oksijen oranı %6'yı geçtiğinde oksihemoglobin, arteriyel sistemden venöz sisteme değişime uğramadan geçebilir; çünkü plazma içerisindeki çözünmüş

oksijen, hemoglobine bağlı oksijene oranla çok daha kolay kullanılma olanağına sahiptir. Böylece sadece plazma, dokuların ihtiyaçlarını karşılamak için yeterli oksijen taşıma kapasitesine ulaşmış olur. Böylece doku oksijenizasyonu yetersizliği ile seyreden birçok hastalıkta kullanılır (Topal ve Korkmaz, 2007, Ay ve Şimşek, 2008).

3 ATA'da %100 oksijen kullanarak doku oksijenlenmesini 10-15 kat arttırmak mümkün olabilmektedir. Bu yüksek doku oksijen düzeyleri ise 30 dakika ile 4 saat arasında değişen sürelerle devam eder (Jain, 1996).

#### **1.1.4. Kullanım Alanları ve Fizyopatolojik Etkileri**

HBO, klinik kullanımda bilinen ve henüz bilinmeyen birçok fizyopatolojik mekanizma üzerinden tedavi edici etkisini gösterir. HBO'nun klinik kullanımını oksijenin 3 ATA maksimum parsiyel basıncı ile uygulanması ile sınırlandırılmıştır. Günümüzde hiperbarik oksijen tedavisi tek tedavi aracı ve destek tedavi aracı olarak temelde aşağıdaki hastalık gruplarında kullanılmaktadır:

- Vurgun ( Dekompresyon hastalığı),
- CO (karbon monoksit) zehirlenmesi, siyanid zehirlenmesi, akut duman inhalasyonu,
- Hava-gaz embolisi,
- Yumuşak dokunun nekrotizan enfeksiyonları (derialtı, kas, fasya),
- Crush yaralanmaları, kompartman sendromu ve diğer akut travmatik iskemiler,
- Yara iyileşmesinin geciktiği durumlar (diyabetik ve diyabetik olmayan),
- Kronik refrakter osteomyelit,



- Aşırı kan kaybı,
- Radyasyon nekrozları,
- Termal yanıklar,
- Tutması şüpheli deri flepleri ve greftleri,
- Beyin absesi,
- Anoksik ansefalopati,
- Ani işitme kaybı,
- Retinal arter oklüzyonu,
- Kafa kemikleri, sternum ve vertebraların akut osteomyelitleri,
- Gazlı gangren

#### *Dolaşım Sistemindeki Hava Kabarcıklarına Etkisi:*

Dekompresyon hastalığında olduğu gibi çeşitli patolojik durumlarda da insan vücudunda dokular veya dolaşım sisteminde hava kabarcıkları oluşabilmekte ve oluştukları ortamda sorunlara ve fonksiyon bozukluklarına yol açabilmektedirler. Dekompresyon hastalığı, “dalgıç hastalığı” olarak da bilinmektedir. Dalgıçlar su altına her on metre indikçe, üzerlerinde oluşan basınç da 1 ATA artar. Bu basınç artışı nedeniyle, dalgıçların su altında tüpten solumuş oldukları hava içerisindeki azot gazının parsiyel basıncı da yükselir. Parsiyel basınç arttıkça, kandaki azot gazının çözünmüş miktarı da artar. Bu durumdaki dalgıcın, su altından satha hızlı çıkışı sırasında üzerindeki basınç bu kez hızla azalır. Bu azalma, kanda çözünmüş olarak bulunan azotun parsiyel basıncını da düşürür. Parsiyel basıncı düşen azot, gaz haline geçer. Sonuç olarak damar içerisinde gaz baloncukları oluşmaya başlar. Bu duruma “vurgun” denir (Gökben, 2001). Bu olay, damarlarda görüldüğü gibi dokularda da görülebilir. Oluşan gaz kabarcıkları mekanik tıkanmalara neden olur, kan akışını engeller, dolayısıyla doku kaybına yol açar. Kabarcık boyutunun azaltılması HBO tedavisinin mekanik etkisinden kaynaklanan bir özelliğidir. Bu etki sayesinde

oluşan kabarcıkların boyutları zararlı oldukları seviyenin altına düşürülerek, dokularda ve dolaşım sisteminde oluşabilecek patolojilerin önüne geçilmiş olur (Gill ve Bell, 2004).

#### *CO Zehirlenmesindeki Etkisi:*

CO zehirlenmesinde HBO'nun kullanımı mortalite ve morbiditenin büyük oranda azalmasını sağlar. Bu nedenle CO zehirlenmesinde HBO tedavisi hayat kurtarıcı en hızlı yöntemdir. CO zehirlenmelerine bağlı akut ve kronik dönemdeki etkilerin ortadan kaldırılmasında yararlı olduğu bildirilmiştir (Tibbles ve Perrotta, 1994, Weaver ve ark., 2002). Ciddi CO zehirlenmesinde, en az bir seans 90 dakikalık 2,5-3 ATA HBO uygulaması gereklidir (Waisman ve ark., 1998). HBO tedavisi iskemik bulguları önlerken, özellikle mitokondriyal enzimlere bağlanmış olan CO'nun ayrışmasında ve nöropsikolojik bozuklukların düzelmesinde de büyük yarar sağlamaktadır (Okur ve ark., 2005).

#### *Dokulardaki Kan Akımı ve Oksijenizasyona Etkisi:*

2 atmosfer (atm.) basınçta oksijen solunduğunda damarlarda vazokonstriksiyon olur ve doku kan akımı %20 oranında düşer. Normal doku  $pO_2$ 'si 30-40 mmHg'dir. Fakat enfeksiyon, travma veya ödemin sebep olduğu iskemi gibi patolojik durumlarda doku  $pO_2$  düzeyleri düşer.  $pO_2$  30 mmHg'nin altına düşmesiyle fibroblast ve lökosit fonksiyonlarında belirgin bir azalma olur. HBO uygulaması ile fibroblast sayısı artar, kolajen oluşumu kolaylaşır ve lökositlerin biterisidal etkileri artar. Normal bir cilt dokusuna 2 ATA'da HBO uygulandığında doku  $pO_2$ 'si 250-300 mmHg'ya kadar yükselir. Bu nedenle HBO uygulanan dokudaki %20'lik kan akımı azalması, dokudaki artmış  $pO_2$  basıncı tarafından fazlasıyla kompanse edilir (Dooley ve Mehm, 1990).

#### *Hipoksik Yaraların İyileşmesine Etkisi:*

İyileşmesi problemlili yaralar genellikle hipoksi ile ilişkilidir. 1960'larda yara iyileşmesinde HBO uygulaması, diğeri tedavi yöntemlerine yardımcı bir tedavi şekli olarak kullanılmaya başlanmıştır. Birçok klinik gözlem ve bunu destekleyen deneysel çalışma hipoksi altında yara iyileşmesinin geciktiğini göstermiştir (Hammarlund ve Sundberg, 1994, Tompach ve ark., 1997, Zamboni ve ark., 1997). 1960'larda yara iyileşmesinde HBO uygulaması, diğeri tedavi yöntemlerine yardımcı bir tedavi şekli olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Yara merkezindeki oksijen miktarı, yarada enfeksiyon gelişmesi açısından ana belirleyici etkidir. Oksijen yara iyileşmesinde hücrelerin enerji ihtiyaçlarının karşılanması yanında bir antibiyotik gibi davranır (Topal ve Korkmaz, 2008). Diyabetik yaralar, kompartman sendromu (crush injury), gazlı gangren, deri ülserleri, nekrotizan yumuşak doku enfeksiyonları, termal yanıklar, en yaygın görülen problemlili yara çeşitleridir. Bu yaralar, tedavilerinin zor olması nedeniyle genellikle amputasyonla sonuçlanır. İyileşmeleri ise uzun zaman alır ve maliyet yüksektir. Diğeri yaralara kıyasla bu tür yaraların ölümle sonuçlanma olasılığı büyüktür.

Hiperbarik oksijen tedavisi, bu tür yaraların klasik yollarla tedavisinde tedaviye olumlu yanıt alma oranını yükseltme, ölümle sonuçlanma riskini ortadan kaldırma, amputasyonu devre dışı bırakma, tedavi sürecini kısaltma, tedavi maliyetini azaltma amacıyla uygulanan bir destek tedavi yoludur. Destek tedavi yolu olma niteliği hiperbarik oksijenin genel bir niteliği olsa da bazı durumlarda destekten öte, zorunlu bir tedavi yöntemi olarak öne çıktığı görülmektedir. Dolayısıyla HBO'nun destek veya zorunlu bir tedavi yöntemi olmasında belirleyici olan, yaranın türüdür (Hammarlund ve Sundberg, 1994, Tompach ve ark., 1997).

### *Yanıklardaki Etkisi:*

Yanık yarasının ilerlemesi ilk 24 saat boyunca çoğu kez histolojik boyutta olur. Yanık yaralarında pansuman ve sıvı protokollerinin uygulanması kısmi bir koruma sağlar. Germonpre ve ark. (1996) yaptıkları bir çalışmada, sıçanlardaki yanık modelinde HBO'nin yanık yaralarındaki erken ilerlemeyi önemli derecede önlediğini göstermişlerdir. Yanık yaralanmalarında HBO tedavisinin yararlı etkilerinden birisi termal yaralanma sonrası ilk birkaç gün süresince artmış sıvı gereksinimini azaltmasıdır. HBO uygulamasının diğer bir yararı da ihtiyaç duyulan cerrahi prosedür sayısını azaltması ve böylece hastanede kalış süresini kısaltmasıdır.

### *İskemi ve Reperfüzyon Hasarında Doku Canlılığı Üzerine Etkisi:*

Ekstremitelerde travma sonucu oluşan hasarlarda iskemi ile sonuçlanan dolaşım yetersizliği meydana gelebilir. İskemi ise enerji deposu bileşikler olan ATP ve fosfokreatin seviyelerinin azalmasına, kaslardaki laktat seviyesinin artmasına yol açar. İskelet kaslarında iskemiden 10-15 dakika sonra anaerobik metabolizma devreye girer ve 20-25 dakika sonra doku pO<sub>2</sub> seviyesi düşer. Doku glukoz seviyeleri, laktat üretimine ve birikimine yol açan glikoliz ve glikojenoliz artışıyla azalır. Enerji üretiminin çoğu oksijene bağımlı oksidatif fosforilasyonla sağlanır. Yani iskemide glikolizle elde edilen az miktardaki enerji depoları hızla tükenir. Enerji hücrede iyonların taşınması, moleküllerin hücre zarını geçmesi ve hücre membranının korunması gibi birçok faaliyet için gereklidir. Dolayısıyla iskemide kısa bir süre sonra yerine getirilemeyen bu hayati faaliyetler sonucu hücreler ölüme gider (Bouachour ve ark., 1996). Post-iskemik fazda uygulanan HBO tedavisi ile bu etkiler önlenmiştir ancak bu etkinin devamı için HBO tedavisinin tekrarlanması gereklidir. Bu şekilde

tekrarlanan HBO tedavisi ile aerobik metabolizma stimüle edilmiş olur (Yamada ve ark, 1995).

*Sinir Hücresi Rejenerasyonuna Etkisi:*

HBO, serebral hava embolisi, CO zehirlenmesi, vejetatif durumlar, kardiyak arrestin neden olduğu global serebral iskemi, akut spinal kord hasarı, kronik beyin hasarı ve subaraknoid kanama sonrası oluşan serebral vazospazm gibi durumları kapsayan çeşitli nörolojik hastalıklarda kullanılmıştır. HBO'nun nöronları koruma mekanizmaları, beyin metabolizmasındaki düzelme, kan-beyin bariyeri geçirgenliğinde ve beyin ödeminde azalma, inflamatuvar cevabın zayıflatılması ve apoptik hücre ölümünün önlenmesi şeklindedir. Ayrıca HBO iskemik tolerans ve nöronların korunmasına ön hazırlık sağlar (Kihara ve ark., 1995, Zamboni ve ark., 1995).

*Clostridium Perfringens İnhibisyonu:*

Gazlı gangren, inkübasyon süresinin çok kısa olması ve birçok dokuyu hızlı bir şekilde etkilemesi nedeniyle mortalitesi en yüksek olan ve bu yüzden insan hayatını etkileyen bir yumuşak doku enfeksiyonudur. Mortalite oranı %80'leri bulmaktadır (Öztuna ve ark., 2002). Travma veya cerrahi girişimlerin ardından flora bakterilerinin kasları tutmasıyla gelişen hastalık, bakterilerin aktiviteleri sonucunda oluşan gaz ile karakteristiktir. Oluşan bu gaz nedeniyle diğer nekrotizan yumuşak doku enfeksiyonlarından ayrılmaktadır. Bir dönem savaş yaralanmalarında mortalite ve morbidite oranı en yüksek enfeksiyon hastalığı olarak ortaya çıkmış olan gazlı gangren, günümüzde trafik kazalarında yaşanan yaralanmaların artması, kirli yaraların iyi yara bakımı yapılmadan kapatılması, deprem felaketlerinde şartların ağır olması yüzünden kanamalı hastaların yara bakımlarının yetersiz kalması nedeniyle

sivillerin hayatını tehdit eden bir enfeksiyöz hastalık hâline gelmiştir (Aktaş, 2000). Gazlı gangrene neden olan patojen, Clostridium türleridir. Gazlı gangren, özellikle travma ve cerrahi girişimlerin ardından iyi yara bakımı yapılmadan kapatılan yaralarda meydana gelmektedir. Diyabet, kolon kanseri, nekrotizan enterokolit, lösemi, lenfoma gibi hastalıklar ve bu hastalıkların bağışıklık sistemini baskılayan radyoterapi ve kemoterapi gibi tedavi yöntemleri eşliğinde olduğu kadar, periferik dolaşım bozukluğuna neden olan herhangi bir hastalığı bulunan kişilerde de travma meydana gelmeden gazlı gangren enfeksiyonu gelişebilmektedir. Clostridium türü bakteriler, vücut florasında bulunduğu gibi doğada da bol miktarda bulunmaktadır. Kas dokusuna yerleşen *Clostridium perfringens* üretmiş olduğu toksinler (Clostridium türlerinin 20'den fazla toksin ürettiği bilinmektedir, ancak en etkilisi alfa toksindir), kapiller geçirgenliğini artırır ve enfeksiyon bölgesinde trombosit kümelerinin oluşmasına neden olur. Oluşan trombosit kümeleri, dokuda hızlı bir şekilde hemoliz meydana getirir. Oluşan hemoliz, membranlara hasar verir ve miyonekroz gelişir, dolaşım bozulur. Dolaşımın bozulmasıyla birlikte dokunun oksijenlenmesi azalır, böylece doku oksijen basıncı düşer. Oksijenlenmenin azalması sonucu meydana gelen hipoksi, anaerobik basiller için uygun üreme ortamı oluşturur (Karaman ve ark., 2005).

Gazlı gangren enfeksiyonunda Hiperbarik Oksijen Tedavisinin ilk kullanımı, 1961 yılında Boereme ve Brummelkamp tarafından yapılmış ve iyi sonuç alınmıştır. Daha sonra 1963 yılında Amsterdam'da yapılan Hiperbarik oksijen konulu uluslararası ilk toplantıda, Hiperbarik oksijen tedavisinin gazlı gangren enfeksiyonunda genel tedaviye ek olarak kullanımının yararlı olduğu bildirilmiştir (Gökben, 2001). Hiperbarik Oksijen Tedavisi, hipoksiyi önleyerek ortamda bulunan anaerob Clostridium türü bakteriler

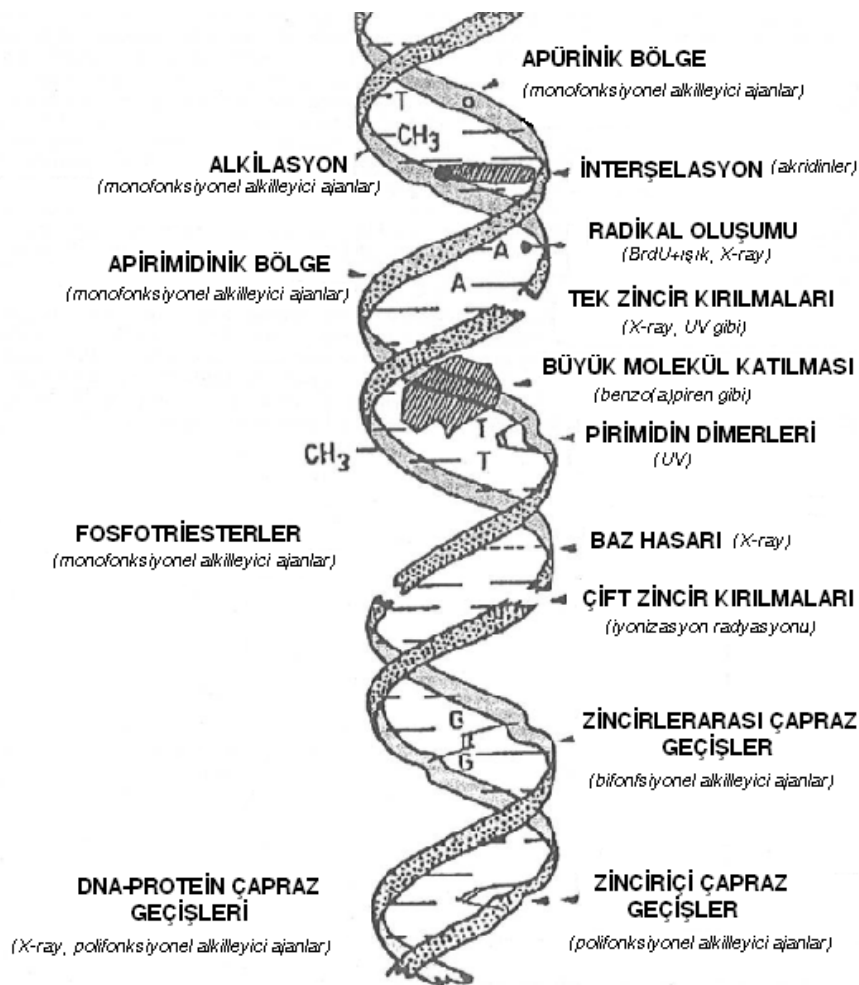
üzerinde bakterisid etki yapar. Hastalığın seyrindeki en büyük sorun toksik olaylardır. Oksijen, ortamda aktif halde bulunan toksinleri elimine eder, ayrıca Clostridium türü yeni toksinlerin oluşumunu bloke eder. Oksijenin antibiyotik tedavisiyle birlikte kullanımı, birkaç seans sonra, dokudaki anaerob bakteri sayısını önemli derecede azaltır (Aktaş, 2000). HBO tedavisinin bu alanda başka bir yararı ise, kapiller permeabiliteyi düzenlemesi ve antibiyotik tedavisinin etkinliğini artırmasıdır. Ayrıca neoanjiogenezi sağlayarak gangrenin ilerlemesini de önlemektedir.

Hiperbarik oksijenin tüm bu etkileri özetlendiğinde, hiperbarik oksijen tedavisi ile aşağıda verilen durumlar sağlanmış olur;

- Yara bölgesindeki lökosit aktivasyonu güçlenir
- Yara bölgesinde yeni damar oluşumu sağlanır
- Yara bölgesinde konnektif doku oluşumu uyarılır
- Plazmada çözünen oksijen miktarı artar
- Hipoksik dokuların oksijenasyonu sağlanır
- Anaerobik bakterilerin üremesi durdurulur
- Bazı antibiyotikler ile sinerjistik etki sağlanır
- Vazokonstriksiyon sayesinde ödem azalır
- CO zehirlenmelerinde sitotoksik etki önlenir

### 1.1.5. DNA Hasarı ve DNA Onarım Mekanizmaları

Organizmada antioksidan savunma sistemi tam olarak etkin çalışmadığında (oksidan/antioksidan dengesi bozulduğunda) serbest radikal oluşumu ile DNA hasarı artar. Bu duruma “oksidatif stres” adı verilir. Oksidatif DNA hasarı; zincir kırılmaları, abazik kısımlar, alkali-işaretli kısımlar ve okside bazlar şeklinde olabilmektedir (Halliwell ve Aruoma, 1991, Wiseman ve Halliwell, 1996).

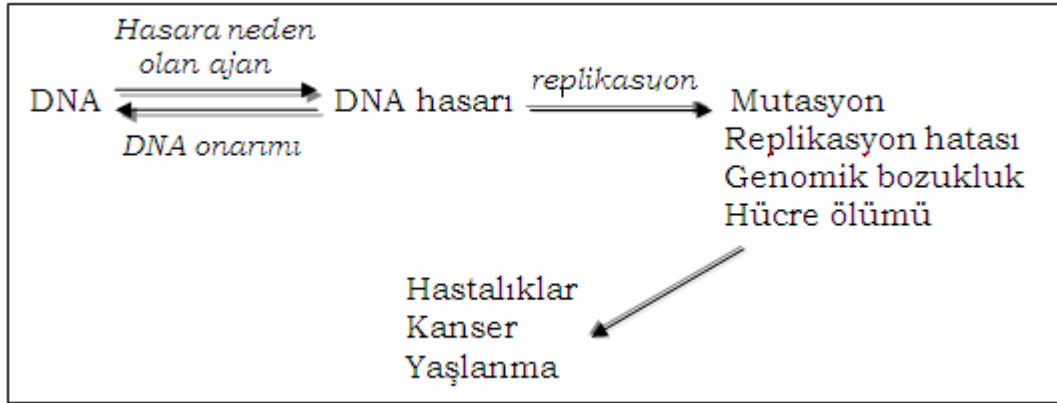


**Şekil 1.3** DNA hasarı çeşitleri

Genetik bilginin stabilitesini sağlamak amacıyla oksidatif DNA hasarı, çeşitli DNA onarım mekanizmaları (Şekil 1.5) tarafından onarılır. Fakat bu onarım tam olarak gerçekleşmezse ROM (reaktif



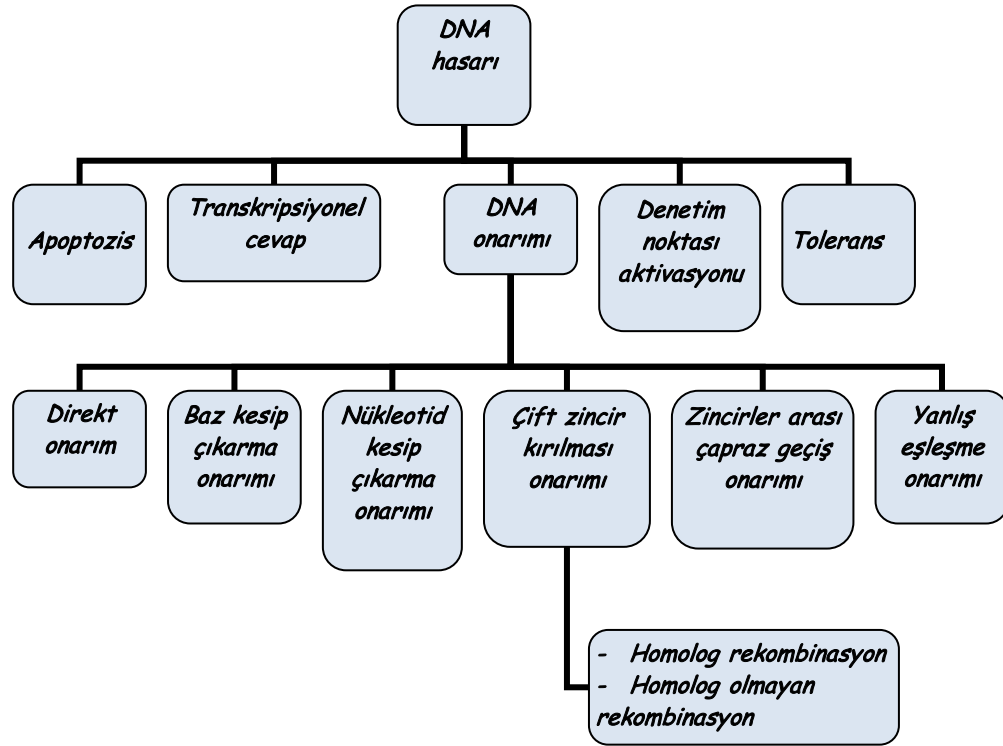
oksijen metabolitleri)'ların neden olduğu DNA hasarı, sonuçta mutasyonlara sebep olabilir (Şekil 1.4). Bu durum özellikle onkojenler ve tümör supresör genler gibi kritik genlerde meydana geldiğinde kanser ile sonuçlanabilir (Barrett, 1995).



**Şekil 1.4.** DNA onarımı gerçekleşmediğinde olası sonuçlar

Bir memeli hücresi DNA hasarına karşı 5 farklı cevap verebilmektedir:

- Ağır hasarlı veya düzensiz hücrelerin eliminasyonu için apoptozis başlar
- Transkripsiyonel cevap başlar; transkripsiyonel profilde hücre için yararlı olabilecek değişimler sağlanır
- DNA onarım mekanizmaları ile hasar uzaklaştırılır
- Hasarlı veya replikasyonu tamamlanmamış kromozomların transmisyonu önlenir ve onarıma olanak verilir
- DNA hasarı tolere edilir (Friedberg, 2003).



**Şekil 1.5** DNA onarım mekanizmaları (Madhusudan ve Middleton, 2005).

DNA hasarına karşı oluşan hücresel cevaplar:

1. Oluşan DNA hasarını direkt olarak tersine çevirme:

- Enzimik fotoreaktivasyon
- DNA alkil transferazlar tarafından onarım
- DNA çift sarmal kırıklarının ligasyonu

2. DNA hasarının kesip çıkarma onarımı:

- Yanlış eşleşme (mismatch) onarımı
- Nükleotid kesip çıkarma onarımı
- Baz kesip çıkarma onarımı

*DNA'daki kesip-çıkarma onarımında rol alan enzimler:*

Escherichia coli (E. coli)'de bulunan 5 protein: MutT, MutY, MutM (Fpg, formamidopirimidin glikozilaz), endonükleaz III (Nth) ve endonükleaz VIII (Nei), ve protein kompleksi UvrABC.

Bu proteinler, oksidatif DNA hasarının mutajenik etkilerinden DNA'yı korumakla görevli onarım enzimleri olarak bilinirler.

*MutT*: nükleotid havuzunda onarım

*MutY*: yanlış eşleşme onarımı

*UvrABC*: nükleotid kesip çıkarma onarımı

*MutM, Nth, Nei*: baz kesip çıkarma onarımında rol alır.

İnsanda E.coli'deki bu onarım enzimlerinin homologları bulunmaktadır.

Mut M homologu: Ogg1 (8-oksoguanin-DNA glikozilaz)

Nth homologu: NTH1 (endonükleaz III-1)

Nei homologu: NEIL1 (endonükleaz VIII-1)

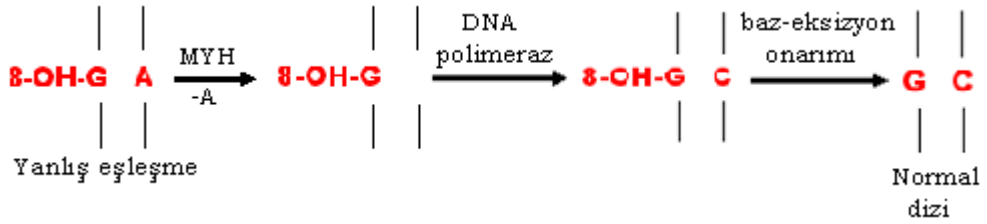
3. DNA hasarının tolere edilmesi (DNA hasarının tolere edilmesi, hasarın uzaklaştırılmasını kapsamadığından dolayı, hücredeki onarım mekanizmalarından kabul edilememektedir)

*a) Yanlış eşleşme onarımı (Mismatch repair, MMR) ve mekanizması*

Yanlış eşleşme onarımı, DNA polimerazlar tarafından yanlış eşleşmiş nüleotidlerin uzaklaştırılmasına dayanır. Başlıca 4 basamaktan oluşur;

- Yanlış eşleşmiş bazın tanınması
- MMR faktörlerin oluşumu

- Yanlış zincirin (yeni sentezlenmiş olan) gösterilmesini sağlayan sinyalin araştırılması
- Kesip çıkarılan alanın yeniden sentezi.



**Şekil 1.6.** Yanlış eşleşme onarım mekanizması.

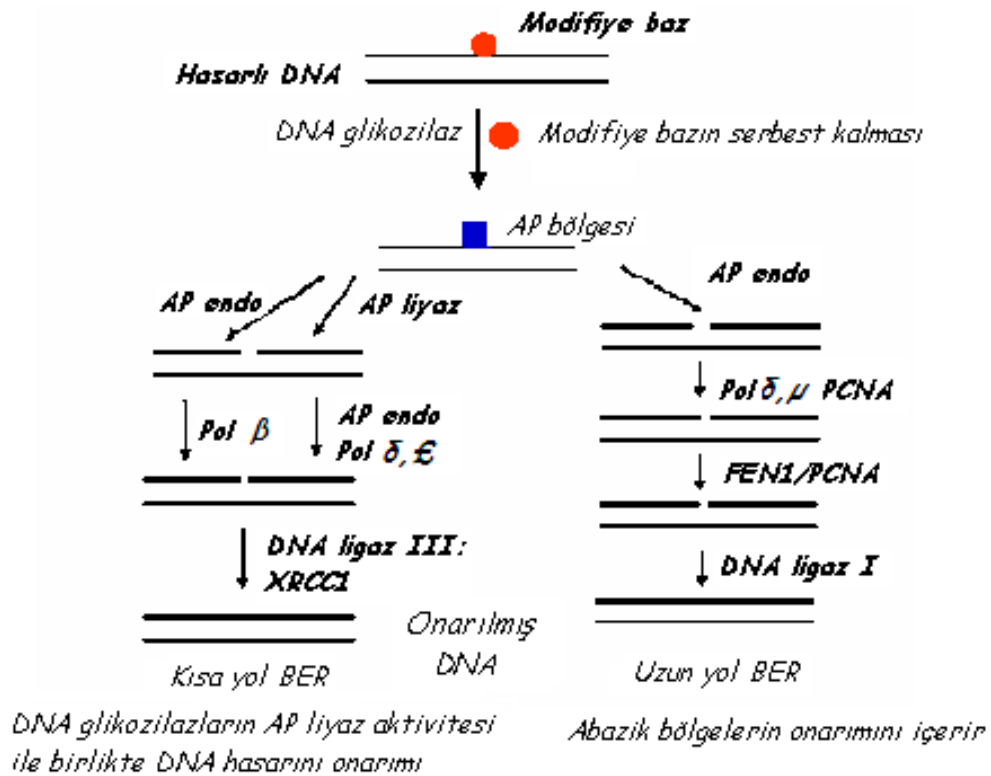
*b) Nükleotid kesip çıkarma onarımı (Nucleotide Excision Repair, NER) ve mekanizması*

Nükleotid kesip çıkarma onarımı, DNA heliks yapısını bozan katım ürünlerini uzaklaştıran bir enzim sistemidir. Bunun yanında NER; O6-guanin veya diğer metillenmiş bazlar gibi DNA heliks yapısını bozmayan lezyonları da uzaklaştırır. Kısaca bu onarım sistemi, “her şeyi” onarır, fakat diğer yollarla onarılamayacak lezyonlar onarıldığı için sonuç olarak hücre NER’i tercih eder. Bu onarımda ATP’ye bağlı eksinükleazlar görev alır.

*c) Baz kesip çıkarma (eksizyon) onarımı (BER) ve mekanizması*

DNA baz hasarları, DNA onarım enzimlerinin spesifik bir sınıfı olan DNA glikozilazlar tarafından onarılırlar. DNA glikozilazlar, modifiye bazlar arasındaki N-glikozidik bağlarının ve DNA’nın şeker-fosfat omurgasının hidrolizini katalize eder.

Modifiye bazların kesip çıkarımı sonucunda, apürinik veya apirimidinik (AP) bölgeler adı verilen bölgeler oluşur ki bu da başka bir DNA hasarıdır. Bazı DNA glikozilazlar ise çift fonksiyonludur ve APliyaz aktivitesi göstererek AP bölgelere de bağlanırlar.



**Şekil 1.7.** Baz kesip çıkarma onarımı (BER) mekanizması

### 1.1.6. HBO'nun Genotoksisitesi

HBO tedavisinin son yıllarda geniş uygulama alanları bulması ve buna bağlı olarak kullanımının yaygınlaşması ile birlikte bu tedavi yöntemi ile ilgili olarak yapılan çalışmalar da artmaya başlamıştır. Son yıllarda en çok üzerinde durulan konulardan biri de HBO'nin sebep olduğu genotoksik etkilerdir. Yüksek basınçlı oksijen, pek çok

tedavi edici özelliğinin yanında, reaktif oksijen metabolitlerinin (ROM) artmasına bağlı olarak DNA hasarına neden olmaktadır (Dennog ve ark., 1996). HBO'nun kansere veya kanser vakalarında ilerlemeye neden olduğu ile ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda böyle bir etkisi gösterilememiştir (Feldmeier ve ark., 1994). HBO'nun potansiyel DNA hasarı üzerine olan bilgi yetersiz olup ancak komet testi ile yapılan çalışmalarda HBO'nun DNA hasarı yapıcı etkisi gösterilmiştir (Dennog ve ark., 1996).

Komet testi, tek hücre düzeyinde DNA hasarını yüksek hassasiyetle tesbit edebilen iyi bir genotoksisite testidir. Alkali komete (pH>13), DNA zincir kırıkları, alkali oynak kısımlar ve DNA onarımı görülebilir ve DNA hasarının derecesi DNA'daki göç miktarı ile tayin edilebilir. Dennog ve ark. (1996) komet testi kullanarak yaptıkları bir çalışmada, HBO tedavisine giren sağlıklı gönüllü insan lökositlerinde, HBO maruziyetinin DNA hasarına neden olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada, sağlıklı erkek gönüllüler HBO tedavisinin protokolüne uygun olarak basınç odalarına girmiştir. HBO maruziyetinden hemen önce ve tedavi seansından hemen sonra alınan kan örnekleri ile komet testini uygulamışlardır. Sonuç olarak, test ettikleri tüm numunelerde HBO maruziyetine bağlı olarak DNA hasarı gözlemlenmiştir.

Standart HBO tedavi protokolü, ortalama 10-20 gün boyunca tekrarlanan seanslardan oluşmaktadır. Bu şekilde tekrarlanan maruziyetler sonucunda, mutajenik risk potansiyelinin, biriken DNA hasarına bağlı olarak artacağı öngörülebilir. Fakat, yapılan çalışmalar sonucunda HBO maruziyetine bağlı olarak artan DNA hasarının yalnızca ilk seanstan sonra oluştuğu, ikinci ve ardından gelen diğer seanslardan sonra oluşmadığı gösterilmiştir (Joenje, 1989, Gille ve

Joenje, 1992, Dennog ve ark., 1996, Rothfussve ark., 1998, Speit ve Hartmann, 1999, Tice ve ark., 2000, O'Reilly, 2001).

Hücreler ROM'un oluşturduğu lezyonları onarabilmek için oldukça etkili DNA onarım mekanizmalarına sahiptir. ROM, canlı hücrelerde metabolik yan ürün gibi ve ekzojen kaynaklı kimyasal maddelerin ve radyasyonun etkisiyle sürekli olarak oluşturulur. ROM'un oluşturduğu lezyonların çoğu baz eksizyon onarımı (BER) yolu ile onarılmaktadır. Nükleotid eksizyon onarımı (NER), spesifik lezyonların çıkarılmasında ve BER doygun hale geldiğinde yedek olarak önemli olabilmektedir

HBO'nun ilk seansından sonra gözlenen DNA hasarı hızla onarılır, bu onarım, oluşan lezyonların zamana bağlı olarak azalmasının (örneğin DNA göçündeki azalma) izlenmesiyle belirlenmektedir. Komet testi kullanılarak yapılan bu deneyler; HBO kaynaklı DNA hasarının hızla onarılmakta, maruziyetten sonra ilk saat içinde oluşan DNA göçünün %50'sinden fazlasında bir azalışa yol açtığını göstermiştir. Fpg protein ile modifiye komet testi ile oluşan oksidatif hasar için benzer bir onarım gözlenmiştir. HBO'dan 6 ya da 24 saat sonra alınan kan, oluşan hasarın tam onarımını gösteren herhangi bir etki göstermemiştir. Hasarlı hücrelerin inkübasyonu (örneğin HBO'dan sonra hemen alınan kan örnekleri), apidikolin (APC) ile HBO maruziyetinden sonra artmış DNA onarım aktivitesi için dolaylı kanıt sağlanmıştır. APC, DNA sentezinin bir inhibitörüdür ve ayrıca kesip çıkarma onarım işlevinde DNA onarım yollarının yeniden sentezini inhibe eder. APC varlığında, tamamlanmamış onarım bölgeleri çoğalır ve artan DNA göçüne yol açar. APC varlığında böyle artan DNA migrasyonu HBO'dan sonra gerçekten gözlenmiştir ve oluşan DNA lezyonlarının hemen onarıldığı belirtilmiştir (Speit ve ark., 2004b).

### 1.1.7. Adaptif Cevap Gelişmesi

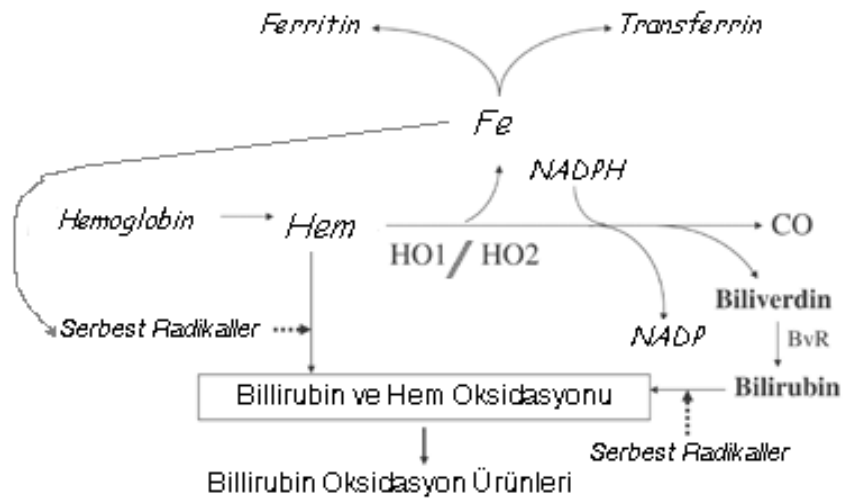
Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, yüksek basınçlı oksijene maruz kalınan HBO tedavisinin, hücrelerde DNA hasarını artırma potansiyeli vardır ve bu DNA hasarı, HBO'ye ilk maruziyet sonrasında gözlenmektedir. HBO'nin sadece ilk seanstan sonra DNA hasarına neden olması, tekrarlanan diğer seanslarda DNA hasarı oluşmaması, insanlarda HBO'nin neden olduğu oksidatif strese karşı koruma olarak lenfositlerde "adaptif cevap" oluşması ile açıklanmaktadır (Speit ve ark., 2000, Rothfuss ve Speit, 2002). HBO'nin neden olduğu DNA hasarı sadece ilk seanstan sonra gözlenmekte ve hızlıca onarılmaktadır (yaklaşık 1-1,5 saat içinde), bu hasara karşı artan antioksidan savunması ise en az 1 hafta sürmektedir (Rothfuss ve ark., 1998, Gröger ve ark., 2009).

Dennog ve ark. (1996) yaptıkları çalışmada, kanda antioksidan enzimler olan SOD (Süperoksit dismutaz), CAT (katalaz) ve GPx (Glutasyon peroksidaz) aktivitelerinde HBO maruziyetinden sonra bir artış gözlememişlerdir. Aynı şekilde Speit ve ark. (2000) da antioksidan savunma mekanizmasından başlıca sorumlu olan bu enzimlerde herhangi bir artış bulamamışlardır. Bunun sebebi, bilindiği üzere, akciğerlerde bu enzimlerin oksidatif hasara bağlı olarak daha farklı etkilenmesidir. Örneğin, bazı çalışmalar, sıçan akciğer hücrelerinde hiperoksi sonucunda SOD aktivitesinin arttığını göstermiştir (Quinlan ve ark., 1994). Buna benzer olarak, sıçanlar ve kobaylarda yapılan çalışmalarda, HBO'nun beyin ve akciğerde antioksidan enzimleri etkilediği bulunmuştur (Harabin ve ark., 1990, Boadi ve ark., 1991). Bu durum, antioksidan enzim aktivitesindeki değişimleri ölçmek için kanın uygun bir ortam olmadığını düşündürmektedir. Lenfositlerdeki muhtemel bir artış, plazma ve



eritrositlerde bulunan yüksek enzim konsantrasyonu tarafından maskelenmekte olabilir.

Hem oksijenaz-1 (HO-1) hücrel homeostazın sağlanmasında hayati fonksiyonu olan ve oksidatif stres durumunda etkilenen bir proteindir. Deney hayvanları ile yapılan *in-vivo* ve memeli hücreleri kullanılarak yapılan çeşitli çalışmalar, oksijen toksisitesinde HO-1'in oluştuğunu göstermiştir (Dennery ve ark., 1997, Poss ve Tonegawa, 1997).



**Şekil 1.8.** Hem metabolizması (Clark ve Sharp, 2006).

HO-1 bulunmayan farelerle yapılan deneyler sonucunda oksidatif strese maruz kalındığında bu strese karşı savunma mekanizmasında azalma gözlenmiştir (Poss ve Tonegawa, 1997). Buna rağmen, HO-1'in antioksidan savunmasındaki rolü ve mekanizması henüz tam olarak açık değildir. Fakat olası mekanizmalar düşünülmektedir. HO-1; CO, biliverdin ve serbest demirin oluştuğu hemin enzimatik degradasyonunda hız kısıtlayıcı basamağı katalizler. HO-1'in sitoprotektif etkisinin oluşan bu

reaksiyon ürünlerinden kaynaklanabileceği de düşünülmektedir (Rothfuss ve Speit, 2002, Li ve ark., 2007). Biliverdin daha sonra bilirubine dönüşür, bilirubin ise oldukça etkili bir antioksidandır. Bilirubin serbest radikalleri yok edici özelliktedir ve bu antioksidanın miktarındaki artış, HBO'nin indüklediği genotoksik etkilere karşı adaptif cevap oluşmasını açıklayabilir (Rothfuss ve ark., 2001). Bilirubinin yanı sıra, karbonmonoksitin *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarla antioksidan kapasitesini artırdığı bulunmuştur (Otterbein ve ark., 1999), ayrıca serbest demir de ferritin indüksiyonuna bağlı olarak rezistans oluşturabilir. Ferritin seviyesinin artmasına bağlı olarak fenton reaksiyonlarında redoks-aktif demir sınırlanır ve bu sayede oldukça reaktif olan ve DNA hasarına neden olan hidroksil radikalinin oluşumu önlenmiş olur. Bu şekilde artan demir kısıtlaması, oksidatif DNA hasarına karşı lenfositlerin adapte oluşunu açıklayabilir. Bunların dışında artan HO-1 aktivitesi ile karbon monoksit oluşumu da artar. CO'nun biyolojik rolü tam olarak açıklanmış olmasa da, hiperoksik akciğer hasarında CO'nun koruyucu etkileri olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Otterbein ve ark., 1999, Otterbein ve ark., 2000).

Adaptif cevap, tek bir standart HBO seansından sonra gözlenmektedir, ayrıca tek seans sonrasında lenfositlerde DNA hasarı oluşmaktadır. Oluşan DNA hasarının ilk tedavi seansının süresiyle ilgili olabileceği akla gelmektedir. Speit ve ark. (2000), HBO tedavi protokolünde değişiklik yaparak (seans süresini kısaltarak) DNA hasarına neden olmadan adaptif cevabın oluşup oluşmayacağını araştırmışlardır. Bu amaçla 4 gönüllü kişiden, 20 dakikaya kısaltılmış bir HBO seansına girmeden önce ve seans sonrasında kan örnekleri almışlardır. Yapılan analizler sonucunda hiçbir numunede HBO'ne bağlı olarak DNA hasarı oluşmadığını gözlemişlerdir.

HBO tedavisi sırasında yüksek basınçlı oksijene maruz kalınmaktadır. Tekrarlanan seanslarda DNA hasarı gözlenmemesi, yalnızca ilk seans sonrasında DNA hasarı oluşması adaptif cevap ile açıklanmaktadır. Benzer şekilde, HBO maruziyeti ile lenfositlerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> genotoksisitesine karşı rezistansın arttığı da bulunmuştur (Rothfuss ve ark., 1998, Speit ve ark., 2000, Chen ve ark., 2005, Li ve ark., 2007). Mikroçekirdek testi ve komet testi kullanılarak yapılmış bir çalışmada, HBO tedavisi öncesinde alınan kan örnekleri H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hidrojen peroksit)'e maruz bırakıldığında DNA ve kromozom hasarında artış gözlenmiştir. Aynı uygulama, HBO tedavisinden 24 saat sonra yapıldığında antioksidan savunmasına bağlı olarak genotoksik etkilerde daha az bir artış gözlemiştir ve bu savunmanın en az bir hafta kadar sürdüğünü görmüşlerdir (Rothfuss ve ark., 1998).

#### **1.1.8. HBO'nin İndüklediği *in-vivo* Gen ve Kromozom Mutasyonları**

Gönüllü insan lenfositleri ile yapılan çalışmalar, tek bir HBO maruziyetinin gen ve kromozom mutasyonlarını indüklediğini göstermektedir (Speit ve ark., 1998, Denog ve ark., 1999). Lenfositler kullanılarak yapılan mikroçekirdek testi, insanlardaki kromozom hasarları belirlemek amacıyla uygun ve hassas bir yöntemdir. Fakat, aynı numunelerle komet testinde DNA göçünde anlamlı artışlar gözlenirken, mikroçekirdek frekanslarında artış gözlenmemiştir (Speit ve ark., 1998). Bu durum, komet testi ve mikroçekirdek testleri arasındaki mekanizma farklılıkları (Bölüm 1.2 ve 1.3'te anlatılmıştır) ile açıklanabilir. Tedavi koşullarında oluşan DNA hasarı, hücreler S-fazına girmeden önce onarılır. Mikroçekirdek testinden elde edilen negatif sonuçların aksine, daha önce yapılan bir çalışmada ise HBO

maruziyetinden sonra kromozom aberasyonu frekanslarında artış gözlenmiştir. Fakat bu çalışmada kullanılan numuneler, çeşitli hastalıkları bulunan ve ilaç tedavisi gören kişilerdir. (Guskov ve ark., 1990).

Yapılan çalışmalar, HBO'nin gen mutasyonlarını indüklediğini göstermiştir. Tek bir HBO maruziyetinden sonra lenfositlerde HPRT (hipoksantin guanin fosforibosil transferaz) lokusunda mutant frekanslarında bir artış bulunmamıştır (Dennog ve ark., 1999). İn-vivo HPRT testi, tek baz süstitasyonlarından dilasyona kadar pek çok gen mutasyonlarını ve 8-oksoguanin ve diğer oksidatif hasarlı DNA bazlarının neden olduğu mutasyonları saptayabilen bir yöntemdir. Fakat, etkilerin küçük bir hedefte ölçülmesi ve arka planda bulunan çok çeşitli HPRT mutant frekansları nedeniyle çok hassas bir test olmadığı için, mutasyon testleri içinde çok fazla tercih edilmez.

**Çizelge 1.1** HBO'nin neden olduğu *in-vivo* ve *in-vitro* genotoksik etkiler

	<i>Kullanılan yöntem</i>	<i>Maruziyet koşulları</i>	<i>Elde edilen cevap</i>	<i>Kaynak</i>
<i>İn-vivo HBO</i>				
Oksidatif baz modifikasyonları	Fpg/EndoIII ile komet testi	1 saat 2,5 ATA	+	Dennog ve ark., 1996
Kromozom aberasyonları	Kromozom aberasyon testi	40 dak. 2,5 ATA	+	Guskov ve ark., 1990
	Mikroçekirdek testi	1 saat 2,5 ATA	-	Speit ve Dennog, 1998
Gen mutasyonları	HPRT T-hücre klonlaması	1 saat 2,5 ATA	-	Dennog ve ark., 1999
<i>İn-vitro HBO</i>				
DNA zincir kırılmaları	<i>Komet testi</i>			
	a. V79 hücreleri	1 saat 2,5 ATA	+	Rothfuss ve ark., 1999
b. İnsan kanı	1 saat 4 ATA	+		
Oksidatif baz modifikasyonları	<i>Fpg ile komet testi</i>			
	a. V79 hücreleri	1 saat 4 ATA	+	Rothfuss ve ark., 2000
b. Fare lenfoma hücreleri	1 saat 4 ATA	+		
Kromozom aberasyonları	V79/ <i>Mikroçekirdek testi</i>	0,5 saat 4 ATA	+	Rothfuss ve ark., 1999
	V79/HPRT <i>testi</i>	3 saat 4 ATA	-	
	<i>SCE testi</i>	1 saat	+	Eken ve ark., 2005 Duydu ve ark., 2006
	<i>SCE testi</i>	2,5 ATA	+	
Gen mutasyonları	Fare lenfoma hücreleri	2 saat 4 ATA	+	Rothfuss ve ark., 2000

### **1.1.9. HBO'nin İndüklediği in-vitro Gen ve Kromozom Mutasyonları**

İnsan veya memeli hücre kültürleri kullanılarak yapılan in-vitro deneylerde, HBO'nin potansiyel mutajenik etkilerini tayin etmek üzere çeşitli modifikasyonlar yapmak mümkündür. Örneğin, hiç ara verilmeksizin 3 saate kadar 2,5-4 ATA basınçta hücreler hiperbarik bir çemberde tutulabilir. Çizelge 1.1'de gösterildiği gibi comet testi kullanılarak tam insan kanı, izole lenfositler, V79 Çin hamster hücrelerinde ve fare lenfoma hücrelerinde genotoksik etkiler araştırılmıştır. Artırılan basınç ve tedavi süresine bağlı olarak V79 hücrelerinde doz-cevap ilişkisi gözlenmiştir (Rothfuss ve ark., 1999). Fpg ile modifiye edilmiş komet testi sonucunda da oksidatif DNA hasarı doza bağımlı olarak arttığı görülmüştür (Rothfuss ve ark., 2000). Eken ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada ise HBOT'ne giren 15 hastada SCE frekansları ölçülmüş ve artan SCE frekanslarına bağlı olarak HBOT'un genotoksik etkileri olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca HBOT sonrasında alınan kan lenfosit hücreleri Mitomisin-C (MMC)'ye maruz bırakıldığında, lenfosit hücrelerinde MMC'nin genotoksik etkilerine karşı hassasiyetin arttığı bulunmuştur (Duydu ve ark., 2006).

İn-vivo ve in-vitro sonuçlar arasında tek fark, HBO'nin tedavi koşullarında (örneğin; 1 saat, 2,5 ATA) maruziyetinden sonra hücre kültürlerinde elde edilmiştir. Sadece V79 hücreleri komet testi ile pozitif sonuç verirken, aynı koşullarda tam kan veya izole lenfositlerde DNA göçünde bir artış gözlenmemiştir (Rothfuss ve ark., 1999). İnsan ve hamster hücrelerinin oksidatif strese cevabı arasındaki bu farklılık, V79 hücrelerinde antioksidan kapasitesinin kan hücrelerine göre daha düşük olması ile açıklanabilir.

Aynı koşullarda hatta daha yüksek basınç ve daha uzun süreli doğrudan *in-vitro* maruziyete kıyasla insan kan hücreleri HBO'na inhalasyon yoluyla *in-vivo* maruz kaldığında DNA göçünde daha anlamlı artış gözlenmiştir. Bu farklılık tam olarak açıklanamasa da *in-vivo* koşullarda DNA'ya etki eden farklı dolaylı etkiler olabilir.

HBO basıncının artırılması (4 ATA) memeli kültürlerinde mutajenik etkilerin artması ile sonuçlanmıştır. V79 hücrelerinde maruziyet süresi artırıldığında (0,5-3 saat) mikroçekirdek testinde kromozom hasarının arttığı, benzer şekilde komet testi ile DNA hasarında artış gözlenmiştir (Rothfuss ve ark., 1999).

Çizelge 1.1'de gösterildiği gibi *in-vitro* sonuçlar bir araya getirildiğinde, yüksek maruziyet koşullarında HBO'nin, klastojenik mekanizma ile mutasyonları indükleme potansiyeli vardır. *İn-vivo* HBO maruziyetinde elde edilen negatif mikroçekirdek testi sonuçları düşük maruziyet ve periferal kan hücrelerindeki koruma mekanizması ile açıklanabilir.

#### **1.1.10. Vitamin Kullanımı**

Hiperbarik oksijenin indüklediği DNA hasarına karşı vitamin uygulanması koruyucu olarak düşünülebilir.

E vitamini yağda çözünen bir vitamindir. Membranlardan geçtikten sonra oldukça etkili zincir-kırıcı bir antoksidandır. E vitaminin diyetle alınması ile hücredeki glutatyon seviyelerinin korunması sağlanır.

N-asetil sistein (NAC), tiyol grubu içeren bir moleküldür. NAC'ın antioksidan olarak kullanılması serbest radikalleri detoksifiye etme özelliğinden kaynaklanır. Bu koruyucu özelliğinin, yapısında sülfür ve sülfidril grupları içermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. NAC, ayrıca glutatyonun kendisini kullanmaktan daha etkili bir glutatyon kaynağıdır. Oksidatif stres ile azalan GSH (glutatyon) miktarını artırmak amacıyla GSH uygulaması etkisiz olur (Moldeus, 1994). Çünkü uygulanan glutatyon, hücre membranından tam olarak penetre olamadığından, glutatyonun ancak yarısından az bir miktarı sindirim sisteminden vücuda geçebilir. Ancak GSH prekürsörü olan NAC verilmesi GSH miktarını artırır. NAC, hücre membranını geçebilir ve GSH sentezinin hız kısıtlayıcı basamağında devreye girer. NAC hücre içinde hızla deasetillenerek L-Sistein'e dönüşür (L-Sistein GSH sentezinde hız sınırlayıcı komponenttir). Bu dönüşümden hemen sonra hücre içinde GSH sentezi hızla artar.

Dennog ve ark. (1999) E vitamini ve NAC kullanarak HBO'nun neden olduğu DNA hasarına karşı koruma oluşup oluşmadığını araştırdıkları çalışmalarında, her iki madde ile de bu hasarın önlenmediğini bulmuşlardır. Fakat çalışma koşulları nedeniyle sonuçlar etkilenmektedir. Örneğin bu çalışmada NAC, HBO tedavisine girmeden 1 saat önce oral yolla verilmiştir. Oysa ki NAC, maksimum plazma konsantrasyonuna oral yolla alımdan 1-2 saat sonra ulaşmaktadır. Bu nedenle çalışmada, NAC'ın GSH seviyesini artırmadığı ve DNA hasarını azaltmadığı gibi bir sonuç elde edilmiş olabilir.

Bir başka çalışmada ise insanlarda çeşitli vitaminlerin kombinasyonu ile komet testi kullanarak etkiler araştırılmıştır. C vitamini,  $\beta$ -karoten ve E vitamini 20 hafta boyunca kullanılmış ve lenfositlerdeki baz oksidasyonunda azalma ve ayrıca hidrojen



peroksitin neden olduğu DNA hasarına harşı daha rezistans kazandıklarını bulmuşlardır (Duthie ve ark., 1996).

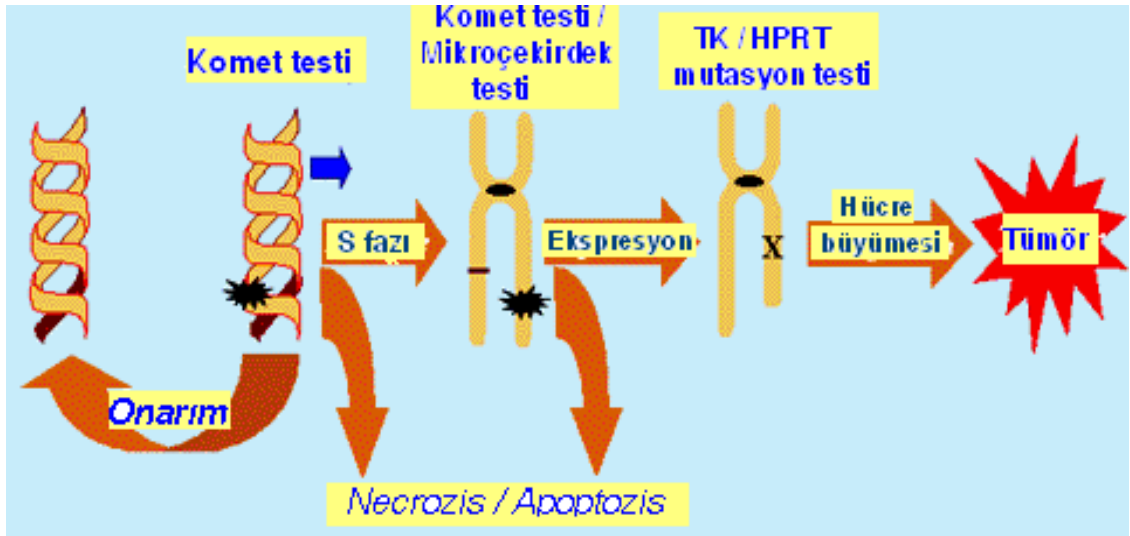
## **1.2. Komet Testi (Tek Hücre Jel Elektroforezi, Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE)**

Komet testi, ökaryotik ve bazı prokaryotik hücreler olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerinde *in-vivo* ve *in-vitro* uygulanabilen, DNA hasarını ve onarımını belirlemek amacıyla kullanılan oldukça gelişmiş bir yöntemdir. Bu yöntem hızlı, hassas, kolay görülebilen, diğer yöntemlere kıyasla daha ucuzdur (Collins, 2004). Özellikle genetik toksikolojide ve insan biyoizlemeleri çalışmalarında önem kazanmış ve hızla yaygınlaşmıştır.

Tek hücre jel elektroforezi veya komet tekniği, ilk olarak Rydberg ve Johanson (1978) tarafından DNA sarmal kırıklarının ölçülmesi amacıyla kurulmuştur. Daha sonra Östling ve Johanson (1984) tarafından geliştirilen teknik nötral pH'daki lizing ve elektroforez şartlarında uygulanmıştır. Bu yöntemle yalnızca DNA çift zincir kırıkları tayin edilmiştir. Mikroskopta görülen kuyruğun kuyruklu yıldız benzemesi nedeniyle yönteme "komet" ismi verilmiştir. Singh ve ark. (1988) tarafından protokolde birtakım değişiklikler yapılarak yöntem alkali lizing koşullarında uygulanmıştır. Bu protokol, bugün küçük değişiklerle dünya genelinde en yaygın kullanılan genotoksisite protokolüdür.

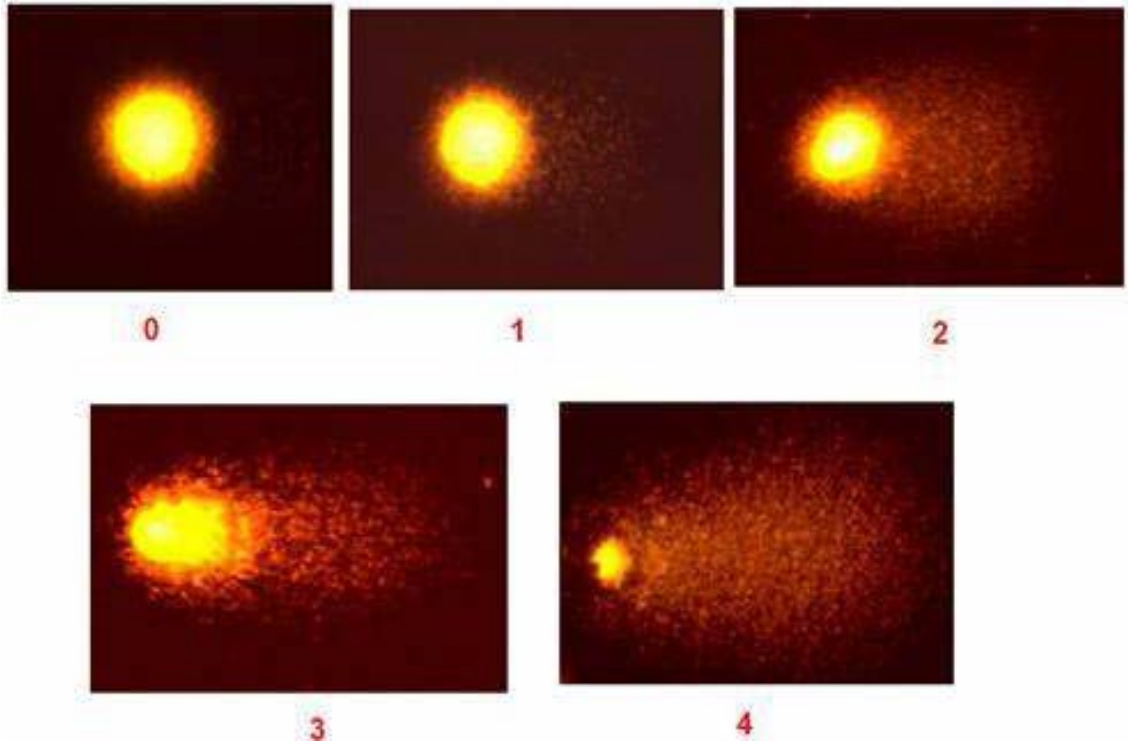
Alkali koşullarda yapılan ( $\text{pH} > 13$ ) komet testi ile Şekil 1.3'te gösterilen DNA hasarlarından çift zincir kırılmaları, tek zincir kırılmaları, alkali oynak bölgeler (alkali komet şartlarında tek zincir kırıklarına dönüşürler) (Collins ve ark., 1997), oksidatif DNA baz

hasarı, DNA-DNA/DNA-protein/DNA-ilaç çapraz geçişleri tayin edilebilir ve DNA onarımı ölçülebilir (Speit ve ark., 2004a). Nötral komet testi (pH:7-10) kullanıldığında ise alkali oynak bölgeler ve tek zincir kırıkları tayin edilemez, yalnızca DNA'daki çift zincir kırıkları gözlenebilir. Bu bakımdan alkali komet testi daha hassastır ve daha fazla DNA hasarı tayin etme olanağı verir.



**Şekil 1.9.** Komet testi ile belirlenen DNA lezyonlarının olası yazgısı

Hasarsız bir DNA, çekirdekdeki matriks proteinlerle oldukça organize bir yapıya sahiptir; fakat DNA'da bir hasar meydana geldiğinde bu yapı bozular. Hasarlı DNA sarmalındaki zincirler kompakt yapılarını kaybeder ve gevşeyerek agar içindeki boşluklara yayılır. Elektroforezde akım uygulanması ile negatif yüklü DNA anoda doğru hareket eder. Hasarsız DNA oldukça büyüktür ve bu akım ile kuyruk bırakmadan göç eder. Hasar nedeniyle parçalanan daha küçük kısımlar ise geride kalarak kuyruk oluştururlar (Mcart ve ark., 2009). Bu nedenle DNA'daki kuyruk miktarı hücredeki hasarın derecesini gösterir. Etidium bromür ile boyanan hücreler, floresan mikroskop altında hasarsız-çok hasarlı arasında Şekil 1.10'da gösterildiği gibi toplam 5 sınıfa ayrılarak değerlendirilir.



**Şekil 1.10.** Floresans mikroskop komet görüntüleri. Hasarsız DNA (0), az hasarlı DNA (1), orta hasarlı DNA (2), hasarlı DNA (3) ve çok hasarlı DNA (4) ile gösterilir (Collins, 2004).

### 1.2.1. Komet Testinin Kullanım Alanları

Komet testi pek çok alanda yaygın olarak kullanılır. Bu alanlardan başlıcaları;

- *Genetik toksikoloji*; Genotoksik kimyasalların in vivo ve in vitro değerlendirilmesi
- *DNA hasarı*; Tek zincir kırıkları, DNA çapraz geçişleri, alkali oynak bölgeler
- *DNA onarımı*; Zincir kırığı onarımı, kesip çıkarma onarımı
- *Ekotoksikoloji*
- *Beslenme*
- *Genotoksisite biyoizlemesi*

- *Çevresel biyoizleme*; Tehlikeli atık bölgelerindeki genotoksik kirleticilerin değerlendirilmesi
- *Hipoksi tayini*
- *İnsan epidemiyolojisi*; Mesleksel, klinik ve çevresel maruziyetlerde DNA hasarının belirlenmesi veya kontrol ile maruz gruplar arasındaki DNA onarım farklılığının değerlendirilmesi
  - Sperm bankası
  - Kan bankası
  - Kanser hastalarında radyoterapi ve kemoterapi izlemeleri

### **1.2.2. Komet Testinin Avantajları**

Komet testinin pek çok avantajı vardır. Bunlar;

- Girişimsel olmayan bir yöntemdir
- Az miktarda hücre ile çalışılabilir (<10.000)
- Kişi başına sadece 50-100 hücre saymak yeterlidir. Özellikle bilgisayar programı kullanıldığında sağlam istatistiksel sonuçlar elde edilir
- DNA hasarını ve onarımını belirlemede oldukça hassastır
- Çok çeşitli hücrelerde analiz yapmak için uygun bir yöntemdir
- Birkaç saat içinde yöntem tamamlanabilir, birkaç gün süren diğer sitogenetik yöntemlerle kıyaslandığında bu önemli bir avantajdır çünkü hücre proliferasyonuna ihtiyaç duymamaktadır
- Tek zincir kırıkları, çift zincir kırıkları, alkali oynak bölgeler tayin edilebilir

- İnsan çalışmalarında sadece 5-10 µl kan, burun veya ağız mukozaya hücreleri, epitel hücreleri, sperm hücresi kullanmak yeterlidir.

Bu özelliklerinin yanında tek bir dezavantajı bulunur. Aslında komet testi yalnız onarım hızını (iplik kırıklarının yeniden birleşme kinetiği) ölçer fakat DNA onarım doğruluğunu ölçmez. Yanlış onarılan DNA kırıkları, komet testinde DNA göçüne neden olmaz.

### **1.2.3. Fpg (Formamido pirimidin glikozilaz) ile Modifiye Komet Testi**

Fpg, *Escherichia coli*'den elde edilmiş olan bir DNA onarım enzimidir. Bu protein, oksidatif DNA baz hasarını, özellikle pürin oksidasyon ürünü olan 8-oksoguanini tayin eden bir endonükleazdır (Albertini ve ark., 2000, Tice ve ark., 2000). Komet testinde DNA zincir kırıklarının tayini, hasarı tam olarak belirtmemektedir. Çünkü bu kırıklar genellikle hızlıca onarılır (Collins, 2004). Komet testinin hassasiyetini ve spesifikliğini artırmak amacıyla, bu test fpg proteini ile birlikte kullanılır (Speit ve ark., 2004a).

Fpg proteini aslında Bölüm 1.1.5'te anlatıldığı gibi DNA'daki kesip-çıkarma onarımında rol alan, hem N-glikozilaz hem de APLiyaz aktivitesi gösteren bir enzimdir (Tchou ve Grollman, 1995, Croteau ve Bohr, 1997). Fakat komet testi in-vitro yapılır ve fpg ile onarımın tamamlanmasına izin verilmeden reaksiyon durdurulur. Bu sayede, fpg proteininin ilavesi ile 8-oksoguanin tarzı DNA katım ürünleri zincir kırıklarına çevrilir ve böylece komet testi ile bu hasar gözlenir hale gelir.

Fpg proteini 8-oksoguanin ve diğer hasarlı pürinleri yüksek hassasiyetle tayin etmesinin yanında, abazik bölgeleri ve açık zincir N-7 guanin katım ürünlerini de tayin edebilmektedir (Speit ve ark., 2004a). 7,8-dihidro-8-oksoguanin (8-oksoguanin), 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin (Fapy-Gua), 4,6-diamino-5-formamidopirimidin (Fapy-Ade) daha az oranda 7,8-dihidro-8-oksoadenin (8-oksoadenin) ve apürinik/apirimidinik bölgeleri (AP-bölgeler) tanıyabilmekte ve bunları DNA zincir kırıklarına dönüştürebilmektedir (Tchou ve ark., 1994). Görüldüğü gibi Fpg protein oksidatif DNA hasarının göstergesi olan 8-oksoguanin için spesifik bir onarım enzimi değildir. Ancak oksidatif DNA hasarının gösterilmesinde en sık kullanılan enzimlerden biridir. Özellikle oksidatif hasar oluşturduğu bilinen maruziyetlerde kullanıldığında çok yüksek oranda 8-oksoguanin oluşumunu tespit edebilmektedir. Çünkü oksidatif hasar oluşturan kimyasal madde maruziyetinde DNA'da oluşan 8-oksoguanin miktarı oluşan Fapy-Gua, Fapy-Ade ve AP-bölgelere göre kıyaslanmayacak derecede yüksektir. Bu nedenle bizim tezimizde komet testinin fpg proteini ile kombine olarak kullanılması çok büyük oranda HBOT esnasında oluşmuş olan 8-oksoguanin varlığına (oksidatif DNA hasarına) işaret edecektir.

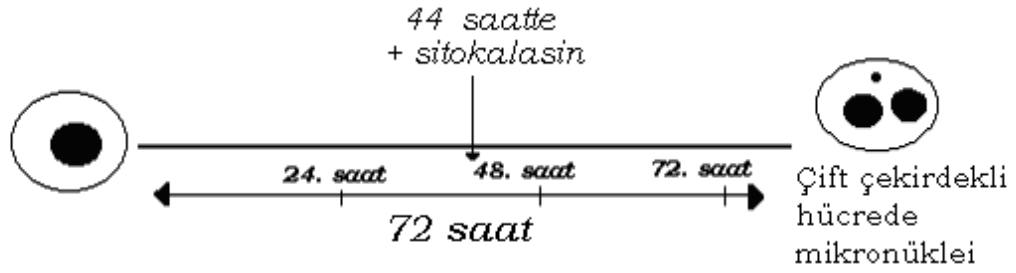
### **1.3. Sitokinezi Bloke Edilmiş Mikroçekirdek (Cytokinesis Blocked Micronuclei, CBMN) Yöntemi**

CBMN, bölünmekte olan hücrenin çekirdeğinden mitoz sırasında kopan kromozom parçalarının veya ayrılan tam kromozomların görülmesine dayanan, genetik hasarın belirlenmesinde oldukça duyarlı bir yöntemdir (Tolbert ve ark., 1992, Holland ve ark., 1994, Tucker ve Preston, 1996, Hagmar ve ark., 2001).

CBMN testleri, pek çok farklı hücre grubunda yapılabiliyor olmasına rağmen biyoizleme çalışmalarında genelde periferik kan lenfositleri kullanılmaktadır. Hücrelerin bölünmesini stimüle etmek amacıyla fitohemaglütinin kullanılır (Fenech ve Morley, 1985, Reali ve ark., 1987).

Mitoz bölünmenin anafaz evresinde sentrik kromozomlar kutuplara çekilirken, genotoksik hasar sonucu oluşan asentrik kromozomlar veya kromozom parçaları kutuplara çekilemeyerek geride kalırlar. Bu kromozomlar hücre bölünmesi sonunda sitoplazmada hücre çekirdeğinden ayrı olarak membranla çevrili bir yapı oluştururlar. Bu yapılara mikroçekirdek denir (Fenech, 1993).

Normal şartlarda hücre bölünürken, önce çekirdek bölünmesi gerçekleşir daha sonra sitoplazma bölünerek iki hücre oluşur. CBMN yönteminde sitokalasin, anafaz evresindeki sitoplazma bölünmesi aşamasında bu bölünmeyi engeller (Fenech ve Morley, 1985, Sarto ve ark., 1990, Fenech, 1993, Holland ve ark., 1996, Volders, 1997, Fenech ve ark., 1999, Bonassi ve ark., 2001, Hagmar ve ark., 2001, Fenech ve ark., 2003, Pastor ve ark., 2003). 72 saatlik bölünmenin 44. saatinde sitokalasin ilavesi sonucu tek bir sitoplazma içinde 2 çekirdek görülür. Bu durumda kromozomlarda bir kırılma var ise kopan parça bir mikroçekirdek olarak iki çekirdekli hücre içerisinde görülebilir. (Şekil 1.11).



**Şekil 1.11.** Hücre bölünmesi sırasında CBMN yöntemi ile çekirdek ve mikroçekirdeklerin görünüşü

### 1.3.1. CBMN Yönteminin Avantajları

Sitokalsin kullanılarak yapılan MN yöntemi (CBMN) ile sitokalsin kullanılmadan yapılan MN yöntemi arasında önemli farklar bulunmaktadır. Sitokalsin kullanılmadan yapılan MN yönteminde mikroçekirdek hücrenin dışında kalabileceğinden oluşan mikroçekirdekleri saymak sorun yaratabilir. Ayrıca hücre proliferasyonu hakkında bilgi edinilemez. Buna karşılık CBMN yöntemi aşağıda sayılan avantajlara sahiptir (Fenech, 1993, Volders ve ark., 2003);

- Bölünmeye uğramış hücreler ile uğramamış hücrelerin birbirinden ayrılmasına olanak verir.
- Disentrik kromozomların, nükleoplazmik köprüler şeklinde tayinine olanak verir.
- Hücre proliferasyonu değerlendirilebilir.
- Oluşan mikroçekirdekler (MN) hücre içinde kalacağından mikroskop altında tayin edilip sayılması çok daha kolaydır.



#### 1.4. Tezin Amacı

Günümüzde hiperbarik oksijen tedavisi pek çok farklı alanda uygulama alanı bulabilen modern bir tedavi yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır. HBOT'nin son yıllarda geniş uygulama alanları bulması ve buna bağlı olarak kullanımının yaygınlaşması ile birlikte bu tedavi yöntemi ile ilgili olarak yapılan çalışmalar da artmaya başlamıştır. Son yıllarda en çok üzerinde durulan konulardan biri de HBOT'nin sebep olduğu genotoksik etkilerdir (Rothfuss ve ark., 1999, Speit ve ark., 2002, Speit ve Bonzheim, 2003). Dünyada komet testi kullanılarak yapılmış olan bütün çalışmalar DNA hasarının özellikle hiperbarik oksijen (HBO) uygulamasına başlanan ilk seansında en yüksek seviyeye ulaştığını ancak daha sonraki seanslarda DNA hasarının adaptif cevap oluşumuna bağlı kademeli olarak azaldığını göstermektedir (Speit ve ark., 2000, Rothfuss ve ark., 2001, Rothfuss ve Speit, 2002a). Bu durumda HBOT uygulanacak hastalar için en kritik dönemin, HBO'nin ilk uygulandığı seans olduğu söylenebilir. Çünkü ilk uygulamada birdenbire artan oksidatif stres nedeni ile lenfositlerdeki DNA hasarının en yüksek seviyeye ulaştığı görülmekte ancak sonraki seanslarda organizmada oluşan adaptif cevap bu hasarın azaldığı gözlenmektedir.

Ancak oluşan bu DNA hasarının biyolojik önemi konusunda şu ana kadar yapılan çalışmalar ışığında kesin bir şey söylemek oldukça zordur. HBO'nin DNA hasarı oluşturma potansiyeli ile ilgili bugüne kadar yapılmış olan çalışmaların önemli bir bölümü farklı hücre kültürlerinde yapılmış in-vitro çalışmalardan oluşmaktadır (Rothfuss ve ark., 1999, Rothfuss ve ark., 2000). Bu çalışmalarda HBO'nin oksidatif DNA hasarı oluşturduğu kesin olarak gösterilmektedir. Son yıllarda HBO uygulanan hastaların kan hücrelerinde yapılan çalışmaların sonuçları da, in-vitro çalışmaların sonuçlarını

desteklemektedir (Dennog ve ark., 1996, Eken ve ark., 2005). HBOT uygulanan insanlardan alınan kan örnekleri üzerinde yapılan çalışmalar özellikle tedavinin ilk uygulama seansında DNA hasarının maksimum düzeyde meydana geldiğini göstermektedir (Speit ve ark., 2000, Rothfuss ve ark., 2001, Speit ve Bonzheim, 2003). Ancak önceden de söz edildiği gibi oluşan bu hasarın biyolojik öneminin olup olmadığının aydınlatılmasını sağlayacak çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu sınırlı sayıdaki çalışmalarda HBOT'nin, DNA hasarına sebep olduğu ancak mutasyona sebep olmadığı belirtilmektedir (Rothfuss ve ark., 1999). Ancak bu değerlendirmeyi yapan sınırlı sayıdaki çalışmalar ya in-vitro koşullarda hücre kültürü ile yapılmış olan çalışmalardır ya da sadece kan hücrelerinin incelendiği *in-vivo* çalışmalardır. Buna karşılık insan organizmasında HBO maruziyetinde daha fazla maruz kalabilen başka hedef hücreler de bulunmaktadır (akciğer hücreleri gibi). Ancak HBOT esnasında bu hücrelerde mutasyon meydana gelip gelmediği ile ilgili çalışmalar bulunmamaktadır. Bu nedenle HBO uygulamalarının test edilen hücrelerde mutasyona neden olmadığını belirten bu sınırlı sayıdaki çalışmaya rağmen, HBO uygulamalarının insanlarda mutasyona neden olup olmadığı kesin olarak bilinmemektedir. Çünkü çeşitli sebeplerle artan oksidatif stres nedeni ile oluşan reaktif oksijen metabolitlerinin (ROM) indüklediği DNA hasarının, mutasyonu ve neticede kanseri indükleyebileceği bilim dünyasında uzun bir zamandan beri bilinmektedir. Bu durumda, özellikle HBOT'nin ilk seansında gözlenen genotoksik etkiler (DNA hasarı), HBOT'nin aslında istenmeyen yan etkileri olarak değerlendirilmelidir. Günümüz bilgileri ışığında, HBO uygulamasının özellikle akciğer hücreleri gibi daha fazla maruz kalan hücrelerde mutasyona neden olabileceği göz ardı edilmemelidir. Bunlara ilave olarak genetik farklılıklar nedeni ile her bir bireyin oksidatif stres sırasında oluşan ROM'u bertaraf edebilme kabiliyeti farklılık gösterebilecek ve sonuç olarak toplumda bu tedaviye daha hassas bireyler bulunabilecektir.

*Tezin Amaçları:*

1. Tez çalışmamızda HBOT'ne giren hastalardan ilk seans öncesinde ve seans bitiminden hemen sonra alınan kan örneklerinde komet testi ile oksidatif DNA hasarı, sitokinezi bloke edilmiş mikroçekirdek testi ile de olası klastojenik etkiler araştırılacaktır.

2. Tedavi sonrasında izole edilen lenfositlerde *in-vitro* koşullarda DNA onarımının gerçekleşip gerçekleşmediği, veya ne kadar zamanda gerçekleştiği gözlenecektir.

3. Fpg proteini ile birlikte komet testi uygulanarak HBO'nin neden olduğu DNA hasarının yaklaşık ne kadarının 8-oksoguanin olduğu tespit edilecektir.

4. HBOT'ne giren hastalardan tedaviye başlamadan ve tedaviden hemen sonra alınan örnekler dışında, ayrı bir grup oluşturulup, bu gruptaki hastalardan 5. seans (10 seanslık bir tedavinin ortası) öncesi ve sonrasında da kan örneği alınacaktır. Bu örnekler H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e maruz bırakılacaktır. Elde edilen sonuçlara göre HBOT esnasında oluştuğu düşünülen adaptif cevabın *in-vitro* koşullarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oluşturulan DNA hasarı üzerindeki etkileri incelenecektir.

5. Dünyada HBOT nedeni ile insanlarda oluşan ve yukarıda sayılmış olan bu genotoksik etkilerin önlenmesine ilişkin insanlar üzerinde yapılmış olan çalışmalar yok gibidir. Yapılan çalışmalar daha çok *in-vitro* koşullarda hücre kültürleri ile yapılmıştır. Hastalarda yapılan çalışmalar çok az sayıdadır ve bu çalışmalarda kullanılan hasta sayısı yetersizdir. Bu bakımdan bu çalışma bu alandaki önemli bir boşluğun doldurulması hedeflenmiştir.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Gereç

#### 2.1.1. Kullanılan Maddeler

Fötal Calf Serum (Sigma, ABD)  
L-Glutamin-Penisilin-Streptomisin (Sigma, ABD)  
RPMI 1640 Medyum (Sigma, ABD)  
Metanol (Merck, Almanya)  
Sitokalsin-B (Sigma, ABD)  
PBS (Fosfat tampon çözeltisi)(Sigma, ABD)  
Dimetilsülfoksit (DMSO) (Sigma, ABD)  
Fitohemaglütinin (Seromed, Almanya)  
Sodyum hidroksit (Merck, Almanya)  
Hidroklorik asit (Merck, Almanya)  
Mitomisin-C (Sigma, ABD)  
Histopaque 1077 (Lenfosit ayırma çözeltisi) (Sigma, ABD)  
Sodyum klorür (Amresco, ABD)  
Na<sub>2</sub>EDTA (Disodyum etilen diamin tetra asetik asit)(Amresco, ABD)  
Tris.HCl (Amresco, ABD)  
Sodyum lauril sarkosinat (Amresco, ABD)  
Triton x-100 (Amresco, ABD)  
Etidium bromür (Sigma, ABD)  
Hidrojen peroksit (Riedel-de Haen, ABD)  
Bovine Serum Albumin (BSA) (Amresco, ABD)  
Giemsa boyası (Fluka, ABD)  
Düşük erime noktalı agar (LMA) (Sigma, ABD)  
Normal erime noktalı agar (NMA) (Amresco, ABD)

### **2.1.2. Kullanılan Aletler ve Malzemeler**

CO<sub>2</sub> inkübatör (Sanyo, Japonya)

Vorteks (Nüve NM110, Türkiye)

Otomatik otoklav (Sanyo, Japonya)

Laminar air flow (Clean Air, Biohazard EN 12469)

Mikroskop (CETİ, Belçika)

Fluoresan mikroskop (Leica DM 1000, Almanya)

Su banyosu (Huber, Almanya)

Soğutmalı santrifüj (Sigma, ABD)

Sitospin santrifüj (Rotina 38, Hettich, ABD)

pH metre (WTW pH330i/SET, Almanya)

Terazi (Sartorius, Türkiye)

Rotator (Labinco BV, Hollanda)

Otomatik pipet (Sealpette, Finlandiya)

Membran filtre (0,20 µm, MFS, Japonya)

Steril tüpler (TPP, İsviçre)

Lam, lamel (Menzel Glaser, Almanya)

Lenfosit izolasyon tüpleri (Leucosep 12 ml) (Greiner bio-one, Almanya)

Sayım lamı (Neubauer improved) (Marienfeld, Almanya)

Elektroforez tankı (C.B.S., ABD)

Güç kaynağı (Thermo EC250-90, ABD)

### **2.1.3. Çalışmamızda Yer Alacak Olan Hasta Grubu ve Hasta Sayısı**

Çalışmamıza, diyabetik yaralar, kronik osteomyelit, burger hastalığı gibi çeşitli sebeplerle (Çizelge 3.1'de gösterilmiştir) GATA Deniz ve Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı'na HBO tedavisi (HBOT) için başvuran hastalar arasından, gönüllü olan 100 hasta katılmıştır. Çalışmamıza katılan tüm hastalardan HBOT öncesinde ve

HBOT seansı sonunda 10 ml kan alındı ve lenfositlerdeki DNA hasarı Tek Hücre Jel Elektrophorez Tekniği (Komet Analizi) ve Sitokinezi Bloke Edilmiş Mikroçekirdek Testi (CBMN) ile değerlendirildi. CBMN testi, 100 hastadan ancak 90 hasta için uygulanabildi.

Spesifik olarak DNA hasarının belirlenmesi amacıyla 100 hastaya ait tedavi öncesi ve tedavi sonrası lenfosit örneklerine fpg proteini ilavesiyle modifiye edilmiş komet testi uygulandı. Bu amaçla HBOT'ne giren hastalara ait tedavi öncesi ve tedavi sonrası kan numunelerinden izole edilen lenfosit hücreleri, -80°C'de saklandı. 100 hastaya ait numunelerin hepsi toplandıktan sonra bu numuneler -80°C'den çıkarılarak fpg proteini ile kombine edilen komet testi uygulandı.

Çalışmamıza katılan hastalardan 5 tanesi tedavi süresince izlendi ve tedavinin ortasına denk gelen 5. seans öncesinde ve seans sonrasında bu hastalardan kan örneği alınarak komet testi uygulandı. Ayrıca yine bu örnekler H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e maruz bırakılarak HBOT esnasında oluştuğu düşünölen adaptif cevabın, *in-vitro* koşullarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oluşturulan DNA hasarı üzerindeki etkileri araştırıldı.

#### **2.1.4. GATA Deniz ve Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalında uygulanacak HBOT'si protokolü**

Çalışmamızdaki hastalara uygulanmış olan tedavi protokolü, GATA'nın rutin olarak hastalarına uyguladığı tedavi protokolünün aynısıdır. Bu protokola göre hastalar tek kişilik bir hiperbarik çembere alındı ve burada 75 dakika boyunca 2.5 ATA (atmosfer absolut) da %100 oksijene maruz bırakılmışlardır. Bu uygulama 1 tedavi seansını oluşturmaktadır. Bu tedavi her gün aynı koşullarda yapılmak üzere 10 gün yani 10 seans devam etmektedir.

## 2.2. Yöntem

### 2.2.1. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Medyum: %15 fotal calf serum, %1 L-glutamin streptomisin/penisilin steril bir tüpe alındı, RPMI 1640 ile 100 ml'ye tamamlandı. +4°C'de saklandı.

Saklama medyum: %50 fotal calf serum, %10 DMSO steril bir tüpe alındı, RPMI 1640 ile 100 ml'ye tamamlandı. +4°C'de saklandı.

Giemsa boyası: 5 ml Giemsa çözeltisi alındı, 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ve 0,1 M HCl (3:1) çözeltisi ile 100 ml'ye tamamlandı.

Sitokalsin-B: 1ml/mg stok çözeltisi DMSO içinde çözülerek hazırlandı ve -20°C'de saklandı. Taze olarak RPMI 1640 ile hazırlanarak 4,5 µg/ml kullanıldı.

Mitomisin-C çözeltisi: 1 ml 100 ng/5µl'lik stok çözeltisi steril suda çözülerek hazırlandı ve ışıktan korunarak +4°C'de saklandı.

Lizing çözeltisi: 2,5 M NaCl, 10 mM Tris, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA tartıldı ve distile suda çözüldükten sonra pH:10'a ayarlandı. %1 sodyum lauril sarkosinat ilave edilerek 1-2 gün karıştırıldı ve oda sıcaklığında saklandı. Kullanılacağı gün taze olarak %1 triton ve %10 DMSO ilave edilerek +4 °C'de soğuması sağlandı.

Nötralize lizing çözeltisi: 0,4 M Tris distile suda çözülerek pH:10'a ayarlandı, oda sıcaklığında saklandı.

Elektroforez çözeltisi: 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA ve 300 mM NaOH distile suda çözülerek pH>13'e ayarlandı, +4 °C'de saklandı.

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

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

Normal erime noktalı agar (NMA): %1'lik çözeltisi PBS ile çözülerek hazırlandı. Çözelti henüz sıcak iken lamlar bu çözeltinin içine daldırılarak agar ile kaplandı ve kurutuldu.

Fpg enzim reaksiyon tamponu: 20 mM Tris, 100 mM NaCl ve 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA distile suda çözüldü ve pH:7,5'a ayarlandı. Bu çözelti +4°de saklandı. Kullanılacağı esnada taze olarak 0,5 mg/ml bovine serum albumin (BSA) ilave edildi.

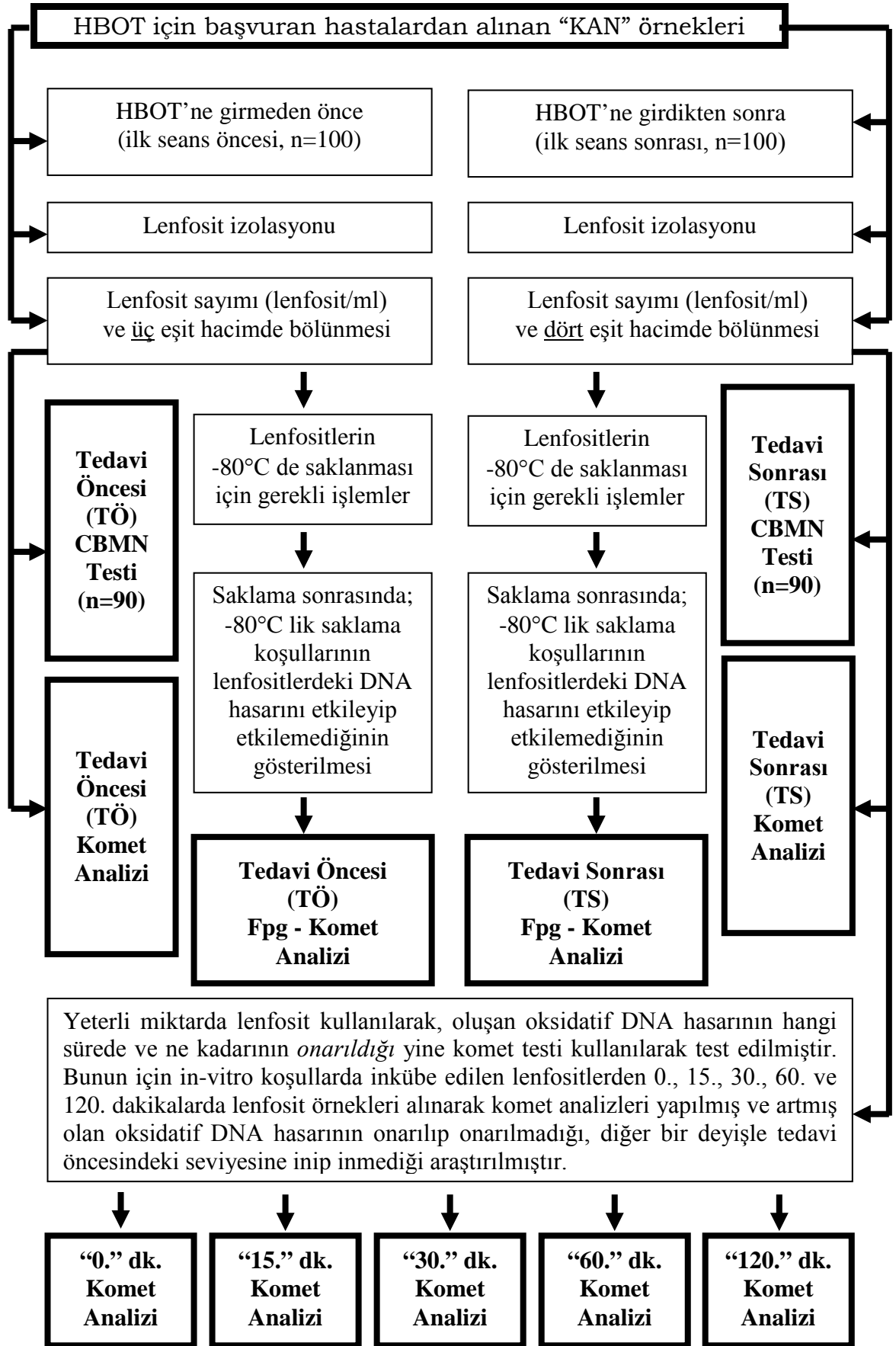
Fpg enziminin dilüsyonu: -80°de saklanan fpg proteini 1,45µl/ml olacak şekilde fpg enzim reaksiyon tampon çözeltisine kullanılacağı esnada taze olarak ilave edildi.



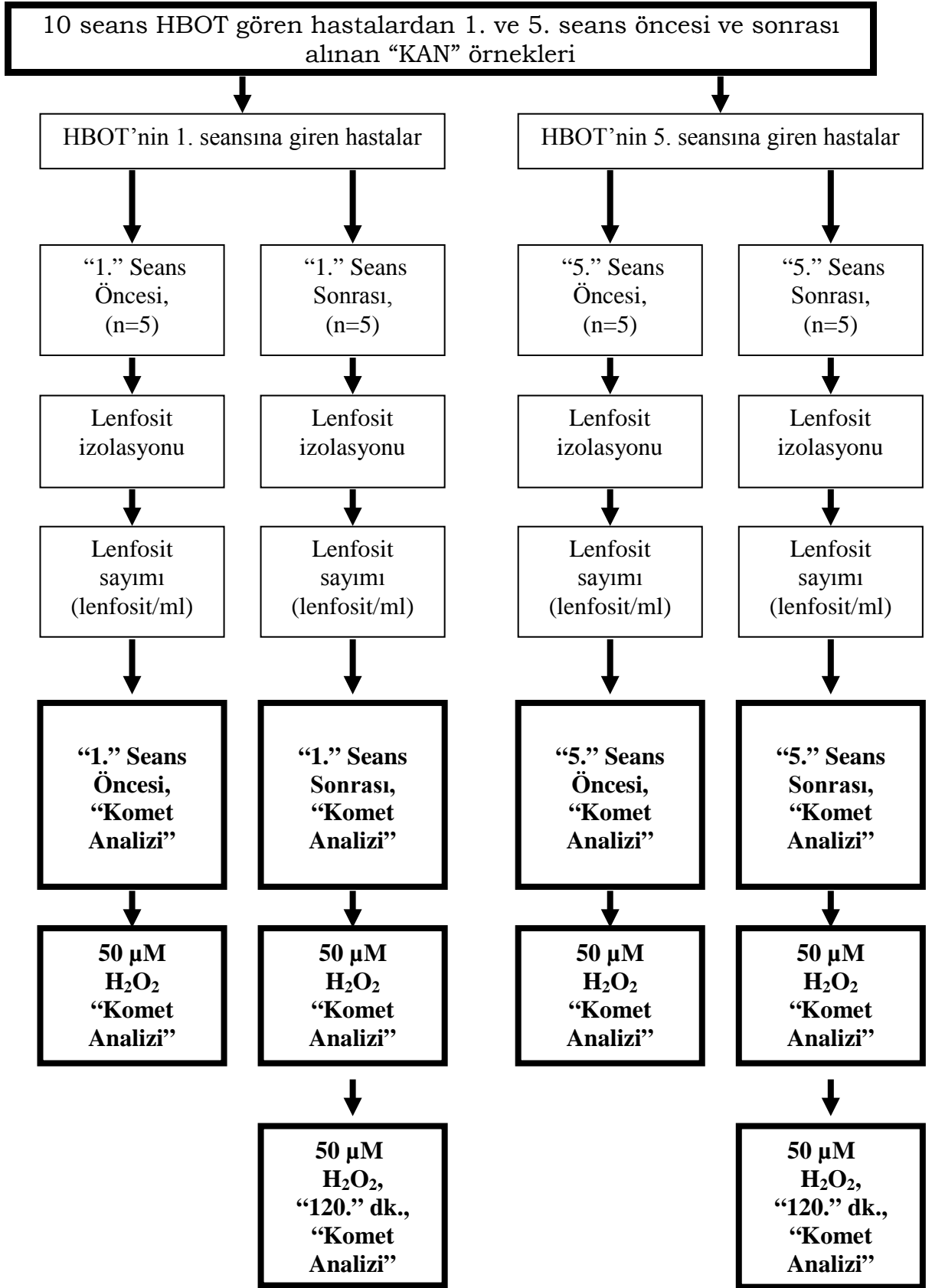
### **2.2.2. Yöntem Basamakları**

Şekil 2.1’de şematik olarak gösterilen işlemlerden sonra her bir hastada, HBOT’ne bağlı olarak oluşması muhtemel oksidatif DNA hasarı (Komet analizi + Fpg-Komet analizi) ve klastojenik etkilerin (CBMN testi) incelenmesi hedeflenmiştir.

10 seans boyunca HBOT gören hastalardan 1. seans öncesi ve sonrası ile 5. seans öncesi ve sonrasında da kan örnekleri alınmış ve 1. seans sonrasında oluşan oksidatif DNA hasarı ile 5. seans sonrasında oluşan oksidatif DNA hasarları karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmada uygulanan işlemlerin özetle şematik olarak gösterilmesi Şekil 2.2’de görülmektedir.



**Şekil 2.1.** HBOT için gelen hastalardan alınan kan örneklerinde uygulanan işlemlerin özetle şematik olarak gösterilmesi

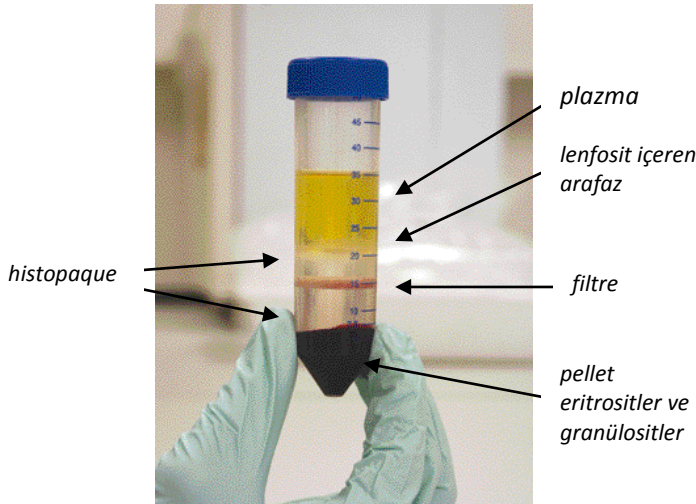


**Şekil 2.2.** 10 seans boyunca HBOT gören hastalarda ilk 5 seans içinde oluşan oksidatif DNA hasarının karşılaştırılması.

### 2.2.2.1. Kandan Lenfosit İzolasyonu

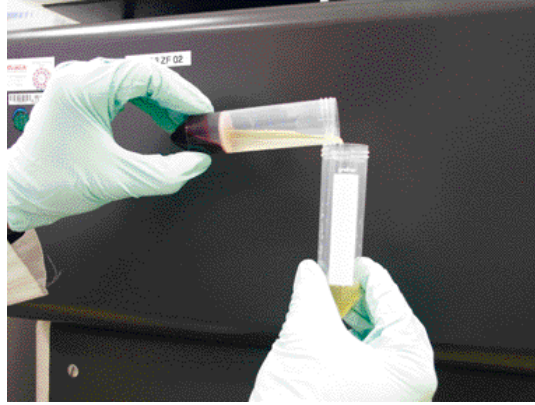


Öncelikle lenfosit ayırma çözeltisi (histopaque) ışıktan korunarak oda sıcaklığına getirildi. 12 ml'lik LeucoSep tüplere 3 ml histopaque kondu. 1000 g'de 30 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi. 4-5 ml kan tüpe aktarıldı. 1000 g'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi.



Santrifüjden sonra tüpteki fazların sıralaması yukarıdan aşağıya plazma - lenfosit içeren arafaz - histopaque - filtre-histopaque - pellet (eritrositler ve granülositler) şeklindedir. Lenfosit içeren disk üzerinde tüm fazlar başka bir tüpe aktarıldı (Bu aşamada tüpte bulunan filtre, eritrositler ve granülositleri içeren pellet ile kontaminasyonu önlemektedir).

**Şekil 2.3.** Lenfosit izolasyon basamakları

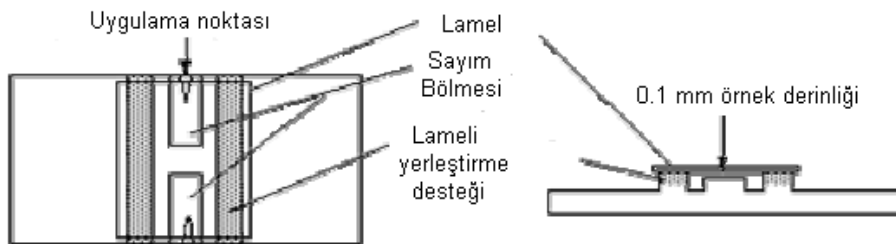


**Şekil 2.3. Devam** Lenfosit izolasyon basamakları.

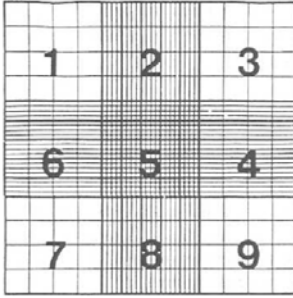
Diğer bir tüpe aktarılan lenfositli fazın üzerine 5 ml PBS ilave edildi. Vorteksledikten sonra 250 g'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üst faz atıldı, tekrar 5 ml PBS ilave edilerek 250 g'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Son santrifüjden sonra üst faz atıldı ve pelletin üzerine 1 ml RPMI ilave edilerek iyice karıştırıldı.

### 2.2.2.2 Lenfositlerin Mikroskopta Sayılması

Bölüm 2.2.2'de anlatıldığı şekilde elde edilen 1 ml'lik lenfosit çözeltisinden 40 µl alındı ve üzerine 40 µl tripan mavisi eklendi (dilüsyon faktörü=2) ve karıştırıldı. Neubauer sayım lamı alındı, üzerine lamel kapatıldı. Lenfosit-tripan mavisi karışımı bekleme yapılmadan sayım lamına uygulandı.



1, 3, 5, 7 ve 9 numaralı karelerdeki hücreler sayıldı.



1, 3, 7 ve 9 numaralı karelerin (köşe kareler) içerisinde 16 adet küçük kareler, 5 numaralı karenin (merkez kare) içerisinde ise 25 adet küçük kare bulunmaktadır. 9 büyük kareden her biri  $1\text{mm}^2$ 'dir ve derinlik  $0.1\text{ mm}$ 'dir, buna göre her karedeki hacim  $0.1\text{ mm}^3$  'tür ( $0.0001\text{ml}$ )

Sayım yapılırken soldan sağa, yukarıdan aşağıya gidildi. Aynı hücreyi iki kez saymamak amacıyla, karelerin sol ve üst çizgilerine temas eden hücreler sayıldı, alt ve sağ çizgilere temas eden hücreler sayılmadı. Sayılan 5 karedeki hücrelerin ortalaması alındı, dilüsyon faktörü ve  $10^4$  ile çarpılarak  $1\text{ ml}$ 'deki hücre sayısı hesaplandı.

$$\frac{\text{Toplam hücre sayısı}}{5} \times 10^4 \times 2 = 1\text{ ml'deki hücre sayısı.}$$

### 2.2.2.3 Lenfositlerin $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 'de Saklanması

Tam kandan elde edilen lenfositler, saklama medyumunu içerisinde  $3\text{ milyon}/1,5\text{ ml}$  olacak şekilde hesaplanarak ilave edildi. Kademeli olarak önce  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 'de yaklaşık 1-2 saat donması sağlandı, daha sonra  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 'ye alınarak lenfositler fpg proteini ilave edilerek yapılan komet testi için saklandı.

### 2.2.3. Komet Analizi

*Hücreleri agara alma işlemi:*

Bölüm 2.2.2'de anlatıldığı şekilde sayılan lenfosit hücreleri her bir lamda 10.000-20.000 arasında hücre olacak şekilde hesaplanarak 50 µl hücre süspansiyonu ile 37°C'de eritilmiş 100 µl % 0.5'lik LMPA karıştırıldıktan sonra önceden % 1'lik NMPA çözeltisine daldırılıp agar ile kaplanmış lamlara yayıldı ve üzerine lamel kapatıldıktan sonra buzlu metal yüzey üzerinde yaklaşık olarak 5 dakika bekletilerek agarın katılaşması sağlandı.

*H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanması:*

Hücrelere; pozitif kontrol olarak 50 µM ve 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulandı. +4°C'de 900 µl PBS ve 100 µl uygun miktarlarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisinden ilave edildi ve 5 dakika buz banyosunda bekletildi. +4°C'de 2500 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı.

*Lizing:*

Lamlar daha önceden hazırlanıp buzdolabında bekletilen soğuk lizing çözeltisine daldırılarak en az 1 saat süreyle buzdolabında bekletildi.

*Alkali uygulaması ve elektroforez:*

Elektroforez tankı soğuk elektroforez çözeltisi ile uygun miktarda dolduruldu (Bu tampon çözelti, lamların üzerini 0,5-1 cm geçecek kadar olmalıdır). Lysing çözeltisinden çıkarılan lamlar agar yayılan kısımları üste gelecek şekilde elektroforez tankının içine yerleştirildi.

Lamlar, 20 dakika akım uygulamadan bu çözeltide bekletildikten sonra, 25 V ve 300 mA akım uygulayarak 20 dakika elektroforez uygulandı.

*Nötralizasyon:*

Elektroforez aşaması bittikten sonra elektroforez tankından çıkarılan lamlar üç kez nötralizasyon çözeltisi ile yıkandı. Hücreleri lamlara fikse etmek amacıyla alkol içerisine daldırılan lamlar okuma yapıncaya kadar nemli ortamda saklandı.

*Boyama ve mikroskopta değerlendirme:*

Lamların üzerine 60 µl (20 µg/ml) etidium bromür çözeltisi ilave edildi ve en az 10 dakika beklenip fluoressan mikroskopta okuma yapıldı.

Her lamda 100 hücre, floresan mikroskopunda değerlendirilerek DNA hasar derecesi çekirdekten çıkan kuyruk uzunluğunun durumuna göre hasarsız (0), az hasarlı (1), orta derecede hasarlı (2), yüksek derecede hasarlı (3) ve hasarlı (4) olmak üzere 5 kategoride değerlendirildi.

Aşağıdaki formül ile Arbitrary Units değerleri hesaplanarak değerlendirme yapıldı.

$$\text{Arbitrary Units (AU)} = (0 \times \text{hasarsız hücre sayısı}) + (1 \times \text{az hasarlı hücre sayısı}) + (2 \times \text{orta derecede hasarlı hücre sayısı}) + (3 \times \text{yüksek derecede hasarlı hücre sayısı}) + (4 \times \text{hasarlı hücre sayısı}) / 100$$

Elde edilen kometlerin fluoressan mikroskoptaki görüntüleri Bölüm 3.4'te gösterilmiştir.



#### **2.2.4. Oluşan Oksidatif DNA Hasarının Onarımının Gösterilmesi**

Bölüm 2.2.3'de anlatılmış olan komet testi prosedürü, tedavi sonrasında alınan örnekler için (aynı zamanda tedavi sonra 0. dak., TS 0. dak.) hemen uygulandıktan sonra örnekler DNA hasarının onarımını izleyebilmek amacıyla 37°'de inkübe edildi ve inkübasyonun 15. dak., 30. dak., 60. dak. ve 120. dak.'larında aynı şekilde lamlara uygulama yapılarak fluoresan mikroskopta değerlendirildi.

#### **2.2.5. Formamidopirimidin Glikozilaz (Fpg) Enziminin Kullanıldığı Modifiye Komet Analizi**

Okside pirimidinleri saptamak üzere klasik komet testinde fpg enzimi kullanıldı. -80°C'de saklama medyumunu içerisinde saklanmış olan 100 tedavi öncesi ve 100 tedavi sonrasına ait lenfosit örnekleri çıkarılarak 37°C'de hızlıca çözüldü. 37°C'ye getirilmiş olan medyum içerisine alınarak 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra bir kez daha medyum ile yıkanarak santrifüj edildi. Elde edilen lenfositlerde, Komet analizi Bölüm 2.2.3'de anlatıldığı şekilde elektroforez aşamasına kadar aynı biçimde gerçekleştirildi. Lamlar elektroforeze konulmadan önce, fpg enzim reaksiyon tamponu (pH:7,5) ile 3 kez yıkandı. Fpg enzimi -80°C'den çıkarılarak aynı tamponla dilüsyonu yapıldı, bu enzimlerden lamlara eklendi ve lamelle üzerleri kapandı. 37°C'lik nemli inkübatörde yarım saat inkübe edildi. Daha sonra komet testindeki elektroforez, nötralizasyon, boyama ve değerlendirme işlemleri aynı şekilde uygulandı. Hücrelere; pozitif kontrol olarak 50 µM ve 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulandı.

### **2.2.6. 10 Seanslık HBOT'ne Giren Hastaların 1. ve 5. Seansında Alınan Kan Örneklerine Uygulanan Komet Testi**

Çalışmamıza katılan hasta grubundan tedavinin başında 1. seans öncesi ve sonrasında, ayrıca tedavinin ortasına denk gelen 5. seans öncesinde ve seans sonrasında bu hastalardan kan örneği alınarak komet testi uygulandı. Bu amaçla ancak 5 hasta takip edilebilmiştir.

Bu örnekler ayrıca, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e maruz bırakılarak HBOT esnasında olduğu düşünülen adaptif cevabın, *in-vitro* koşullarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oluşturulan DNA hasarı üzerindeki etkileri araştırıldı. 5. seans öncesinde alınan örnekler 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulandı. İlk seans sonrası ve 5. seans sonrası alınan örnekler ise 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulandı ve komet testi kullanılarak DNA hasarlarına bakıldı. Ayrıca ilk seans ve 5. seans sonrası alınan örnekler 2 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra onarım tayin edildi.

### **2.2.7. Sitokinezi Bloke Edilmiş Mikroçekirdek Testi (Cytokinesis-Blocked Micronuclei, CBMN)**

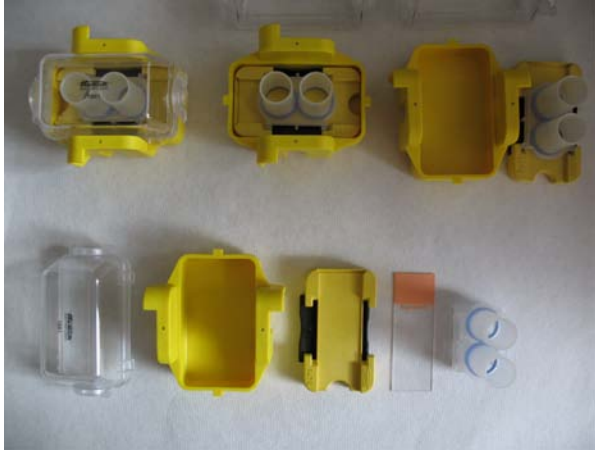
*İnkübasyon:*

Laminar air flow altında steril tüplere izole edilen lenfosit örneğinden her bir tüpe 1 milyon olacak şekilde hesaplanarak konuldu. Daha önceden hazırlanan ve çalışmadan en az bir saat önce 37°C'de bekletilip ısıtılan medyum çözeltilisinden 2.5 ml tüplere ilave edildi. Lenfositlerin bölünmesini stimüle etmek amacıyla tüplere fitohemaglutinin ilave edildi. Tüplerin kapakları laminar air flow altında kapatıldı. Vortekste hafifçe karıştırıldı ve 72 saatlik inkübasyon, tüpler 37°C'lik CO<sub>2</sub> inkübatöre kaldırılarak başlatıldı.

44.saatte tüpler CO<sub>2</sub> inkübatörden alındı ve laminar air flow altında her bir tüpe 4,5 µg/ml sitokalsin-B (CYT-B) ilave edildi, vorteksle hafifçe karıştırıldı ve 37°C'lik inkübatöre kaldırıldı.

*Sitospin ile santrifüj işlemi:*

72. saatte tüpler CO<sub>2</sub> inkübatörden çıkarıldı ve temiz lamlar üzerine hücreler 600g'de 5 dakika sitospin santrifüjde santrifüj edilerek alındı. Oda sıcaklığında lamlar kurumaya bırakıldı.



**Şekil 2.4.** Sitospin santrifüj

*Mitomisin-C (MMC) uygulaması:*

Lenfositler 10, 20, 40 ve 60 ng/ml MMC'ye pozitif kontrol olarak maruz bırakılarak aynı test prosedürü izlendi.

*Boyama:*

Lamlar kuruduktan sonra temiz bir şale içine aktarılan metanol çözeltisine daldırıldı ve bu şekilde 10 dakika bekletildi. Lamlar daha sonra şaleye doldurulan Giemsa çözeltisi içine daldırıldı ve 10 dakika bekletildi. Son olarak lamlar distile su ile yıkandı ve kurumak üzere bırakıldı.

*Mikroskopta İnceleme:*

Her kan numunesine karşılık gelen lamlarda 40x objektif ile ışık mikroskobunda 1000 adet çift çekirdekli hücre (M2) sayıldı. Bu 1000 hücre içinde bulunan mikroçekirdekler (MN)'ler sayıldı.

Işık mikroskobu altında CBMN testi görüntüleri Bölüm 3.5'te verilmiştir.

Aşağıdaki formül kullanılarak NDI (Nuclear Division Index) hesaplandı.

$$NDI = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / 500$$

### **2.3. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler**

Tez çalışmamızda, HBO'ya maruz kalan hastaların lenfositlerinde gözlenen çift çekirdekli hücrelerdeki mikroçekirdek (Binucleated cells with micronuclei, BNMN) sayılarının, HBO uygulanmadan önceki BNMN sayıları ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olup olmadığı Student-*t* -testi ile test edilmiştir. CBMN testinde HBO uygulamadan önce ve uygulandıktan sonra elde edilen lenfositlerde hesaplanan "NDI" değerlerinin istatistiksel olarak farklılık gösterip göstermediği ise Student-*t* testi ile test edilmiştir.

HBO'ya maruz kalan lenfositlerde komet testi uygulanarak hesaplanan Arbitrary Units (AU) değerlerinin, HBO uygulanmadan önceki AU değerleri ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı "one-way ANOVA" testi ile test edilmiştir. Aynı şekilde fpg proteini uygulaması ile elde edilen AU değerleri de "one-way ANOVA" testi ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Toplam 5 hastadan 1. ve 5. seans öncesi ve sonrasında alınan örneklerle ve bu örneklerle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması ile elde edilen AU değerleri de "one-way ANOVA" kullanılarak test edilmiştir.

Bu testler, "SPSS for Windows-Release 11" programı kullanılarak yapılmıştır.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Tez Çalışmamıza Katılan Grubun Özellikleri

GATA Deniz ve Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı'na HBO tedavisi için başvuran hastalar arasından gönüllü olarak tez çalışmamıza katılan 100 hastaya ait cinsiyet, yaş, sigara ve kahve içme alışkanlığı, alkol kullanma alışkanlığı, ışın tedavisi görüp görmediği ve mevcut olan hastalık durumu ile ilgili bilgiler Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.1.** GATA Deniz ve Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı'na HBO tedavisi için başvuran hastalar arasından gönüllü olarak tez çalışmamıza katılan 100 hastanın özellikleri.

##### a. Yaş ve cinsiyet özellikleri

<i>Özellikler</i>		<i>Sayı (n)</i>
<i>Cinsiyet</i>	Kadın	23
	Erkek	77*
<i>Yaş</i>	Ort. 41 (12-79)	
	<30	28
	30-45	34
	45-60	25
	>60	13

(\*p<0.05, student t-test)

##### b. Son aylarda röntgen çekirme durumları

<i>Röntgen (son aylarda)</i>	<i>Sayı (n)</i>
çektiren	34
çektirmeyen	66*

(\*p<0.05, student t-test)

**Çizelge 3.1. Devam** GATA Deniz ve Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik TıpAnabilim Dalı'na HBO tedavisi için başvuran hastalar arasından gönüllü olarak tez çalışmamıza katılan 100 hastanın özellikleri.

*c. Sigara, alkol ve kahve içme alışkanlıkları*

<i>Sayı (n)</i>		<i>Özellikler</i>	
<i>Sigara içme</i>		İçmeyen	72*
		İçen (günde 1 paketten az)	18
		İçen (günde 1 paketten fazla)	10
<i>Alkol Kullanma</i>		Kullanmayan	88*
		Kullanan	12
<i>Kahve İçme</i>		İçmiyor	69*
		1-2 fincan	29
		3 fincandan fazla	2

(\*p<0.05, student *t*-test)

*d. HBOT'ye başvurmalarına neden olan hastalık durumları*

<i>Hastalık durumu</i>	<i>Sayı</i>	<i>Hastalık durumu</i>	<i>Sayı</i>
diyabetik ayak	23*	kordi tamiri	1
CO zehirlenmesi	2	mayın	1
ani işitme kaybı	37*	gözde kimy. yanık	1
burger	4	behçet	1
donma	4	anoksik ensefalopati	1
testis torsiyonu	4	aşıl tendivit	1
osteomyelit	3	ayakta akıntılı yara (silahla)	1
ülseratif kolit	3	kornea ülseri	1
ateşli silah yaralanması	2	ameloblastom	1
aküler-sol femur başı	2	crohn-fistül	1
anal fistül	1	enterokutan fistül	1
hipofarenks	1	diz altı ampultasyonu	1
periferik damar hastalığı	1	diskitis	1
kornea nakli	1		

(\*p<0.05, student *t*-test)

### 3.2. Komet Testi Uygulamaları ile Elde Edilen Sonuçlar

#### 3.2.1. Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile Elde Edilen Sonuçlar

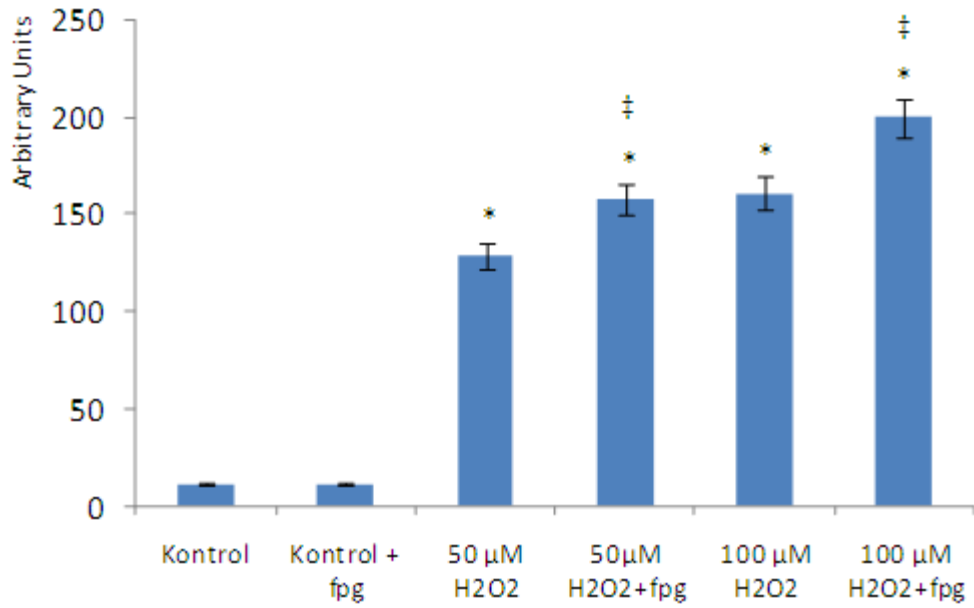
Bölüm 2.2.3'te anlatıldığı şekilde lenfosit hücrelerine pozitif kontrol olarak 50 µM ve 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanarak komet testi ve fpg ile modifiye edilmiş komet testi ile analiz edildi. 3 kez tekrarlanarak elde edilen sonuçlar, AU değerleri hesaplanarak Çizelge 3.2 ve Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Lenfosit hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan 50 µM ve 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile komet testi ve fpg ile modifiye edilmiş komet testi sonuçları (Komet testi 3 kez uygulanmış ve ortalamaları alınmıştır).

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , µM	Ortalama Arbitrary Units (AU)	Stand. sapma
Kontrol	11	1,63
Kontrol + fpg	11	0,81
50 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	129*	5,31
50µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +fpg	158*	5,90
100 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	161*	2,50
100 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> +fpg	200*	5,43

(\*p<0.05, one-way ANOVA)





**Şekil 3.1.** Lenfosit hücrelerine pozitif kontrol olarak uygulanan 50 µM ve 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile komet testi ve fpg ile modifiye edilmiş komet testi sonuçları.

\* Kontrolle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlenmiştir

‡ fpg proteini ilave edildiğinde elde edilen değerlerle aynı konsantrasyonlar karşılaştırıldığında anlamlı artış gözlenmiştir (p<0.05, one-way ANOVA).

Elde edilen sonuçlara göre, 50 µM ve 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> komet testi ve fpg ile modifiye edilmiş komet testinde DNA hasarını anlamlı bir şekilde artırmaktadır. Fpg proteini ilavesinde ise her iki konsantrasyonda da fpg ilave edilmeksizin elde edilen sonuçlara göre istatistiksel olarak artış gözlenmiştir (p<0.05, one-way ANOVA).

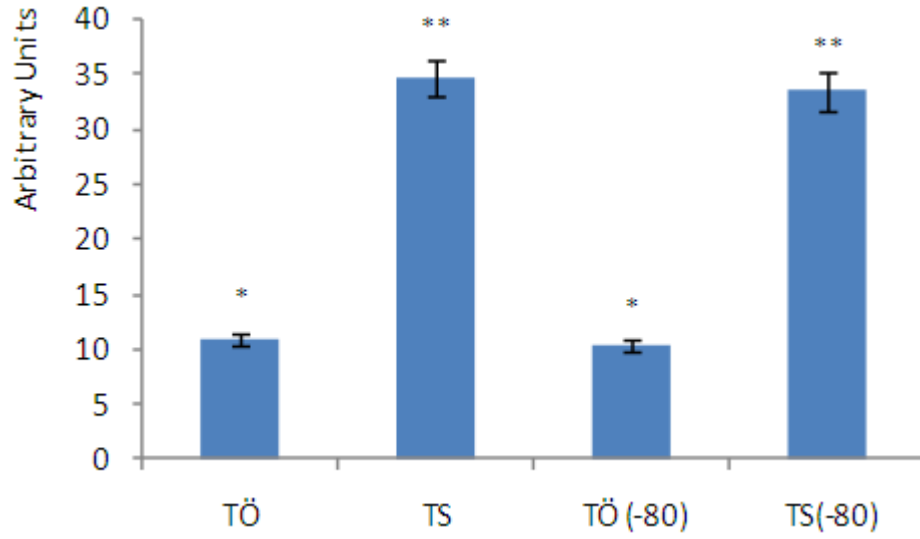
### **3.2.2. HBO Tedavisi Gören Hastalardan Elde Edilen Komet Testi Sonuçları**

#### **3.2.2.1 HBOT'den Önce ve İlk Seanstan Sonra Alınan Örneklerle Ait Sonuçlar**

HBO tedavisi gören hastalardan tedavi öncesinde (TÖ) ve tedavi sonrasında (TS) alınan ve taze olarak çalışılan örnekler ile  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılan lenfositlerde uygulanan komet testi sonuçları Çizelge 3.3'te ve Şekil 3.2'de gösterilmiştir, bu değerler arasında istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamıştır ( $p>0.05$ , one-way ANOVA).

**Çizelge 3.3** Tedavi öncesi ve tedavi sonrası taze olarak çalışılan örneklerle -80°C'den çıkarılarak çalışılan örneklerin sonuçları arasında istatistiksel olarak bir farklılık bulunmamıştır ( $p>0.05$ , one-way ANOVA).

	<b>T.Ö</b>	<b>TS</b>	<b>T.Ö (-80)</b>	<b>TS(-80)</b>		<b>T.Ö</b>	<b>TS</b>	<b>T.Ö (-80)</b>	<b>TS(-80)</b>
<b>1</b>	12	35	11	33	<b>52</b>	9	35	9	34
<b>2</b>	12	35	12	33	<b>53</b>	12	36	10	36
<b>3</b>	10	28	9	30	<b>54</b>	10	35	10	35
<b>4</b>	11	31	11	30	<b>55</b>	11	34	11	34
<b>5</b>	8	34	8	35	<b>56</b>	10	35	11	37
<b>6</b>	12	35	11	35	<b>57</b>	11	33	10	34
<b>7</b>	15	33	14	32	<b>58</b>	8	34	9	29
<b>8</b>	13	35	13	31	<b>59</b>	12	35	12	32
<b>9</b>	12	36	11	35	<b>60</b>	9	37	8	35
<b>10</b>	12	33	12	31	<b>61</b>	8	33	8	31
<b>11</b>	13	33	13	38	<b>62</b>	9	38	10	36
<b>12</b>	14	33	13	34	<b>63</b>	8	33	8	32
<b>13</b>	13	34	12	33	<b>64</b>	11	35	12	32
<b>14</b>	11	37	10	36	<b>65</b>	9	37	9	36
<b>15</b>	12	31	12	32	<b>66</b>	9	35	10	34
<b>16</b>	10	32	10	30	<b>67</b>	11	30	11	29
<b>17</b>	11	34	11	32	<b>68</b>	9	36	10	31
<b>18</b>	9	42	9	38	<b>69</b>	10	35	10	33
<b>19</b>	10	34	9	30	<b>70</b>	10	36	9	35
<b>20</b>	14	31	13	33	<b>71</b>	8	32	8	34
<b>21</b>	8	34	8	35	<b>72</b>	11	38	10	36
<b>22</b>	8	32	9	32	<b>73</b>	15	33	12	32
<b>23</b>	10	37	10	35	<b>74</b>	10	37	11	35
<b>24</b>	11	36	11	34	<b>75</b>	7	39	8	36
<b>25</b>	11	35	10	36	<b>76</b>	7	37	8	35
<b>26</b>	11	37	11	35	<b>77</b>	7	32	9	33
<b>27</b>	12	37	11	31	<b>78</b>	9	33	8	35
<b>28</b>	11	36	10	35	<b>79</b>	8	33	9	35
<b>29</b>	11	36	11	35	<b>80</b>	9	34	9	33
<b>30</b>	9	32	10	34	<b>81</b>	8	33	8	32
<b>31</b>	9	36	9	33	<b>82</b>	11	36	11	30
<b>32</b>	11	33	10	35	<b>83</b>	7	36	7	34
<b>33</b>	12	37	11	36	<b>84</b>	10	33	9	34
<b>34</b>	13	37	12	26	<b>85</b>	8	33	8	34
<b>35</b>	11	36	11	34	<b>86</b>	7	33	7	33
<b>36</b>	10	32	10	33	<b>87</b>	9	34	10	33
<b>37</b>	11	35	10	29	<b>88</b>	9	36	9	34
<b>38</b>	9	34	10	32	<b>89</b>	14	38	12	35
<b>39</b>	9	35	8	35	<b>90</b>	9	36	10	36
<b>40</b>	9	38	10	31	<b>91</b>	8	34	9	35
<b>41</b>	13	30	12	33	<b>92</b>	11	30	10	30
<b>42</b>	9	35	8	35	<b>93</b>	10	35	9	34
<b>43</b>	13	40	13	39	<b>94</b>	9	34	8	31
<b>44</b>	8	39	8	36	<b>95</b>	8	34	8	34
<b>45</b>	10	36	10	34	<b>96</b>	7	37	7	35
<b>46</b>	8	34	8	32	<b>97</b>	10	34	9	34
<b>47</b>	10	35	9	34	<b>98</b>	7	34	8	32
<b>48</b>	8	34	9	36	<b>99</b>	9	32	8	27
<b>49</b>	12	38	11	35	<b>100</b>	8	34	8	30
<b>50</b>	10	34	10	35	<b>Ort.</b>	10,84	34,7059	10,4902	33,549
<b>51</b>	12	34	11	35	<b>Std. Sapma</b>	1,753	2,51501	1,51298	2,42789



**Şekil 3.2.** Tedavi öncesi ve tedavi sonrası taze olarak çalışılan örneklerle -80°C'den çıkarılarak çalışılan örneklerin sonuçları.

\*  $p > 0.05$ , one-way ANOVA, Taze olarak çalışılan TÖ numuneleri ile -80°C'den çıkarılarak çalışılan TÖ numuneleri arasında istatistiksel olarak bir fark yoktur.

\*\*  $p > 0.05$ , one-way ANOVA, Taze olarak çalışılan TS numuneleri ile -80°C'den çıkarılarak çalışılan TS numuneleri arasında istatistiksel olarak bir fark yoktur.

HBO tedavisi gören hastalardan, tedaviye başlamadan hemen önce ve ilk tedavi seansından sonra alınan 100 hastaya ait kan örneklerinde uygulanan komet testi sonuçları ve -80°C'den çıkarılan lenfositlerde uygulanan fpg proteini ile modifiye edilmiş komet testi toplu sonuçları Çizelge 3.4 gösterilmiştir.

**Çizelge 3.4.** 100 hastaya ait tedavi öncesi (Tö) ve tedavi sonrası (TS) komet testi ve fpg proteini ile modifiye edilmiş komet testi sonuçları. TS (0. dakika aynı zamanda tedavi sonrası temsil etmektedir) numunelerinin 15., 30., 60. ve 120. dakikalardaki komet testi sonuçları.

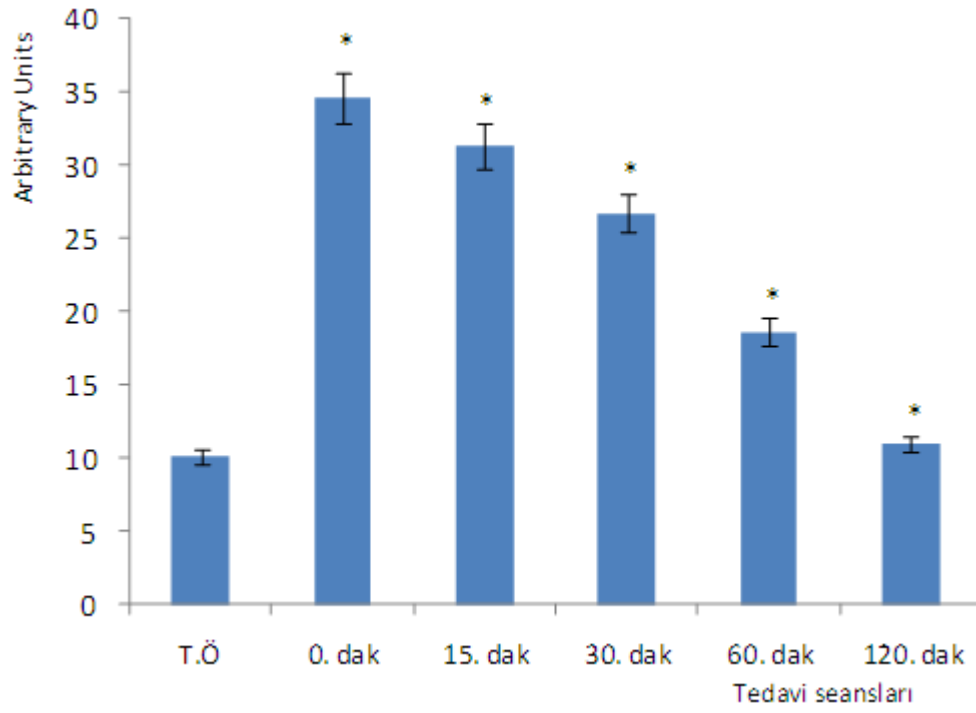
	T.ö	TS	0. dak	15. dak	30. dak	60. dak	120. dak	fpg Tö	fpg TS
<b>1</b>	12	35	35	21	18	17	10	12	48
<b>2</b>	12	35	35	22	13	14	11	11	50
<b>3</b>	10	28	28	23	22	17	13	9	43
<b>4</b>	11	31	31	29	22	14	12	10	41
<b>5</b>	8	34	34	25	25	16	10	9	47
<b>6</b>	12	35	35	26	25	23	15	10	48
<b>7</b>	15	33	33	30	24	25	14	14	45
<b>8</b>	13	35	35	32	26	20	14	12	43
<b>9</b>	12	36	36	31	28	22	15	11	47
<b>10</b>	12	33	33	28	24	23	13	11	49
<b>11</b>	13	33	33	28	24	23	14	13	50
<b>12</b>	14	33	33	35	32	24	15	13	47
<b>13</b>	13	34	34	32	30	24	13	12	47
<b>14</b>	11	37	37	33	28	22	12	11	50
<b>15</b>	12	31	31	31	26	27	13	11	46
<b>16</b>	10	32	32	28	29	22	11	9	42
<b>17</b>	11	34	34	32	31	31	11	9	48
<b>18</b>	9	42	42	39	33	27	10	10	51
<b>19</b>	10	34	34	31	29	25	11	10	44
<b>20</b>	14	31	31	30	28	25	12	13	45
<b>21</b>	8	34	34	26	24	22	8	9	44
<b>22</b>	8	32	32	27	23	17	10	10	43
<b>23</b>	10	37	37	36	31	20	13	9	48
<b>24</b>	11	36	36	33	24	18	14	13	43
<b>25</b>	11	35	35	32	26	14	10	11	45
<b>26</b>	11	37	37	33	23	15	13	10	44
<b>27</b>	12	37	37	38	37	29	15	11	46
<b>28</b>	11	36	36	28	23	18	10	11	48
<b>29</b>	11	36	36	32	26	19	11	10	46
<b>30</b>	9	32	32	29	20	13	8	9	46
<b>31</b>	9	36	36	30	27	16	12	9	47
<b>32</b>	11	33	33	30	24	17	13	11	44
<b>33</b>	12	37	37	29	25	16	13	10	47
<b>34</b>	13	37	37	35	28	17	14	12	41
<b>35</b>	11	36	36	34	28	20	13	9	43
<b>36</b>	10	32	32	27	21	15	12	11	44
<b>37</b>	11	35	35	33	28	19	10	11	44
<b>38</b>	9	34	34	31	24	13	10	9	47
<b>39</b>	9	35	35	36	34	20	11	8	45
<b>40</b>	9	38	38	30	25	18	9	9	44
<b>41</b>	13	30	30	30	29	20	13	13	49
<b>42</b>	9	35	35	32	28	18	10	9	44
<b>43</b>	13	40	40	39	29	16	12	12	54
<b>44</b>	8	39	39	36	35	21	9	9	49
<b>45</b>	10	36	36	33	23	17	12	10	46
<b>46</b>	8	34	34	32	24	16	8	9	47
<b>47</b>	10	35	35	35	31	18	12	10	48
<b>48</b>	8	34	34	33	30	18	11	9	47
<b>49</b>	12	38	38	34	29	19	14	11	46
<b>50</b>	10	34	34	32	22	20	13	10	47
<b>51</b>	12	34	34	31	32	17	11	10	48
<b>52</b>	9	35	35	35	31	19	10	9	51

**Çizelge 3.4. Devam** 100 hastaya ait tedavi öncesi (Tö) ve tedavi sonrası (TS) komet testi ve fpg proteini ile modifiye edilmiş komet testi sonuçları. TS (0. dakika aynı zamanda tedavi sonrası temsil etmektedir) numunelerinin 15., 30., 60. ve 120. dakikalardaki komet testi sonuçları.

<b>53</b>	12	36	36	32	28	18	13	12	50
<b>54</b>	10	35	35	34	27	18	11	10	50
<b>55</b>	11	34	34	33	29	19	11	12	44
<b>56</b>	10	35	35	30	25	19	11	10	57
<b>57</b>	11	33	33	26	23	18	11	12	52
<b>58</b>	8	34	34	32	25	13	8	8	49
<b>59</b>	12	35	35	31	29	23	12	11	52
<b>60</b>	9	37	37	37	33	20	10	10	49
<b>61</b>	8	33	33	32	22	13	7	9	49
<b>62</b>	9	38	38	32	28	14	9	11	51
<b>63</b>	8	33	33	32	29	16	8	9	48
<b>64</b>	11	35	35	35	33	21	12	10	50
<b>65</b>	9	37	37	37	33	23	7	11	46
<b>66</b>	9	35	35	30	28	19	10	9	49
<b>67</b>	11	30	30	27	25	16	14	11	49
<b>68</b>	9	36	36	34	31	18	12	10	48
<b>69</b>	10	35	35	35	22	16	10	8	53
<b>70</b>	10	36	36	36	33	18	11	9	53
<b>71</b>	8	32	32	29	29	15	10	9	49
<b>72</b>	11	38	38	41	35	19	12	11	52
<b>73</b>	15	33	33	29	28	22	15	13	45
<b>74</b>	10	37	37	40	33	22	9	10	50
<b>75</b>	7	39	39	34	29	18	9	7	43
<b>76</b>	7	37	37	36	25	21	9	7	46
<b>77</b>	7	32	32	22	16	13	6	10	47
<b>78</b>	9	33	33	32	29	20	11	9	48
<b>79</b>	8	33	33	31	26	18	11	8	50
<b>80</b>	9	34	34	35	33	22	11	8	43
<b>81</b>	8	33	33	30	30	14	9	8	48
<b>82</b>	11	36	36	29	25	13	13	10	46
<b>83</b>	7	36	36	33	29	19	9	8	55
<b>84</b>	10	33	33	26	25	15	10	10	44
<b>85</b>	8	33	33	30	23	18	10	7	48
<b>86</b>	7	33	33	30	25	14	6	8	47
<b>87</b>	9	34	34	28	28	17	9	9	48
<b>88</b>	9	36	36	30	25	18	11	10	50
<b>89</b>	14	38	38	28	24	24	15	12	45
<b>90</b>	9	36	36	33	27	18	10	9	50
<b>91</b>	8	34	34	33	20	20	7	8	51
<b>92</b>	11	30	30	31	26	16	10	9	49
<b>93</b>	10	35	35	29	26	19	12	9	48
<b>94</b>	9	34	34	29	24	15	10	9	53
<b>95</b>	8	34	34	28	29	12	9	8	51
<b>96</b>	7	37	37	29	25	19	7	8	49
<b>97</b>	10	34	34	32	27	18	11	10	50
<b>98</b>	7	34	34	26	25	17	8	7	52
<b>99</b>	9	32	32	31	21	14	8	8	47
<b>100</b>	8	34	34	34	22	14	7	9	48
<b>Ort.</b>	10,1	34,66	34,66	31,3	26,73	18,62	10,9798	9,93	47,57
<b>Std.</b>									
<b>Sapma</b>	1,9	2,2525	2,2525	3,7403	4,11434	3,70116	2,1701	1,5238	3,0806

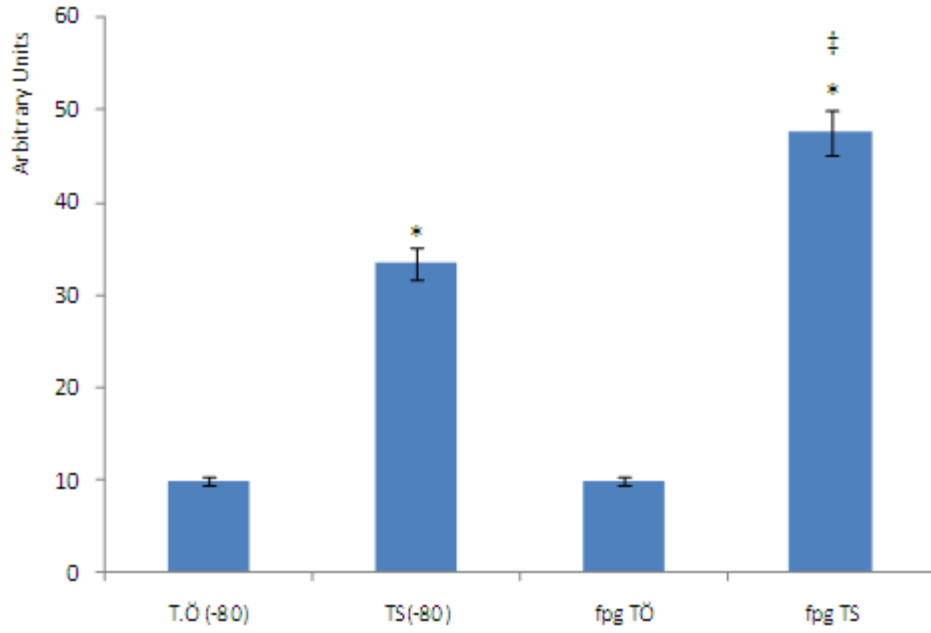
HBO tedavisi gören hastalardan, tedaviye başlamadan hemen önce (TÖ) ve ilk tedavi seansından sonra (TS) alınan 100 hastaya ait kan örneklerinde uygulanan komet testi sonuçları ve tedavi sonrası (TS, aynı zamanda 0. dak.) numunelerin 15., 30., 60. ve 120. dakikalarda inkübasyonu ile elde edilen komet testi sonuçları Şekil 3.3'de gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, hiperbarik oksijen tedavisi oksidatif DNA hasarını anlamlı bir şekilde artırmaktadır. Aynı zamanda tedavi sonrasında alınan örneklerin 15., 30., 60. ve 120. dakikalarda inkübasyonu ile elde edilen komet testi sonuçları da tedavi öncesi ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur.

Aynı numuneler Bölüm 2.2.2.3'de anlatıldığı şekilde saklandıktan sonra  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarıldı ve fpg proteini kullanılarak komet testi uygulandı. HBO tedavisi gören hastalardan, tedaviye başlamadan hemen önce ve ilk tedavi seansından sonra alınan 100 hastaya ait lenfositler kullanılarak elde edilen sonuçlar Şekil 3.4'te gösterilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi  $-80^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılan lenfositlerde tedavi öncesi ile kıyaslandığında ilk tedavi seansı sonrası komet testi ve fpg proteini ile modifiye edilmiş komet testi sonuçlarında istatistiksel olarak artış gözlenmiştir. İlk tedavi seansı sonrası sonuçları ile karşılaştırıldığında ve fpg proteini ilave edilmiş tedavi sonrası değerlerde istatistiksel olarak artış gözlenmiştir ( $p<0.05$ ).



**Şekil 3.3.** 100 hastaya ait tedavi öncesi, tedavi sonrası ve 15., 30., 60. ve 120. dakikalardaki komet testi sonucunda elde edilen ortalama arbitrary units (AU) değerleri. Tedavi öncesi ile kıyaslandığında artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA).





**Şekil 3.4.** 100 hastaya ait tedavi öncesi, tedavi sonrası fpg proteini kullanılarak uygulanan komet testi sonucunda elde edilen ortalama arbitrary units (AU) değerleri.

\* Tedavi öncesi ile kıyaslandığında tedavi sonrası ve tedavi sonrası+fpg sonuçlarındaki artışlar istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.05$ ).

‡ Tedavi sonrası değerlerle fpg ilavesi ile elde edilen tedavi sonrası değerler arasındaki artış anlamlıdır ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA).

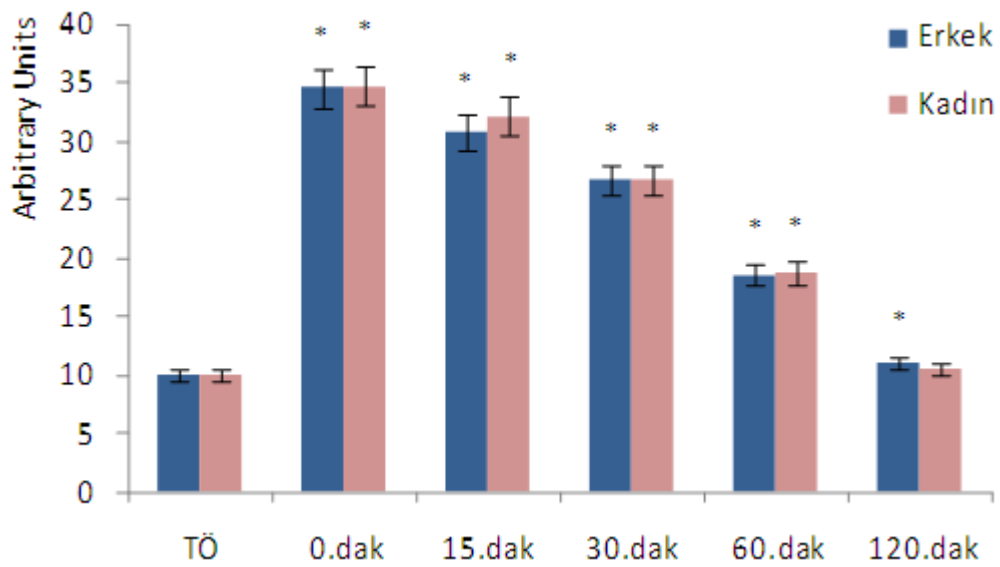
### 3.2.2.2 HBOT'den Önce ve İlk Seanstan Sonra Alınan Örneklerin Hasta Grubunun Özelliklerine Göre Değerlendirilmesi

*Cinsiyete bağlı olarak değerlendirme:*

GATA Deniz ve Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı'na HBO tedavisi için başvuran hastalar arasından gönüllü olarak tez çalışmamıza katılan 100 hastaya ait komet testi sonuçlarının "cinsiyete bağlı" olarak değerlendirilmesi Şekil 3.4'te gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre; tedavi öncesi ile kıyaslandığında tedavi sonrası ve tedavi sonrası inkübasyonun 15., 30. ve 60. dakikalarında kadın ve erkek sonuçlarında cinsiyete bağlı olarak bir

farklılık olmayıp, her ikisinde de istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlenmiştir. İnkübasyonun 120. dakikasında ise farklı olarak erkeklerde görülen DNA hasarı, TÖ'ne göre hala yüksek iken ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA) kadınlarda bu fark anlamlı değildir. Yani kadınlardaki DNA hasarı 120 dakika sonrasında TÖ seviyesine dönmektedir. Kadın ve erkek sonuçları birbiriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır (one-way ANOVA).



**Şekil 3.5.** Tez çalışmamıza katılan 100 hasta ile elde edilen komet testi sonuçlarının erkek (n:77) ve kadın (n:23) olmak üzere cinsiyete bağlı olarak sonuçları. Tedavi öncesi ile kıyaslandığında tedavi sonrası ve tedavi sonrası inkübasyonun 15., 30. ve 60. dakikalarında her iki cinsiyette istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlenmekte iken ( $p < 0.05$ ), inkübasyonun 120. dakikasında erkeklerde DNA hasarı TÖ seviyesine dönmezken ( $p < 0.05$ ), kadınlarda TÖ seviyesine dönmektedir ( $p > 0.05$ , one-way ANOVA).

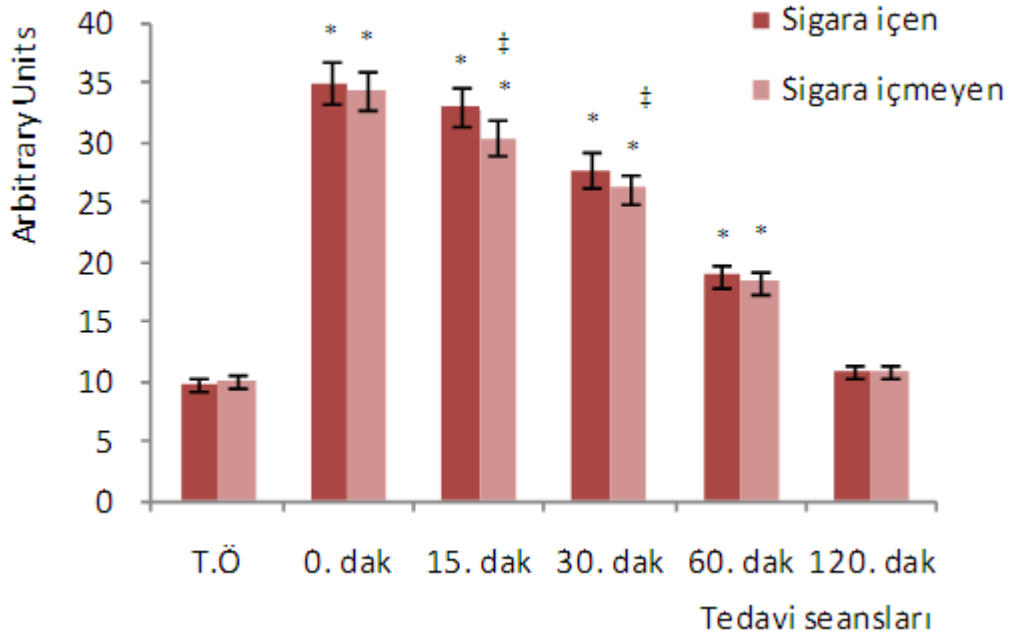
*Sigara içimine bağlı olarak değerlendirme:*

GATA Deniz ve Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı'na HBO tedavisi için başvuran hastalar arasından gönüllü olarak tez çalışmamıza katılan 100 hastaya ait komet testi sonuçlarının "sigara içimine" bağlı olarak değerlendirilmesi Şekil 3.6'da gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre; tedavi öncesi ile kıyaslandığında tedavi sonrası ve tedavi sonrası inkübasyonun 15., 30. ve 60. dakikalarında hem sigara içen hem de sigara içmeyenlerde istatistiksel olarak DNA hasarı TÖ değerlere göre yüksektir ( $p < 0.05$ ). İnkübasyonun 120. dakikasında ise hem sigara içen hem de sigara içmeyenlerde istatistiksel olarak tedavi öncesi değerlerle bir fark görülmemektedir ( $p > 0.05$ ).

Sigara içenler ile sigara içmeyenler birbirleriyle kıyaslandığında; inkübasyonun 15. ve 30. dakikalarında sigara içenler ile sigara içmeyenler arasında anlamlı fark vardır ( $p < 0.05$ ), sigara içmeyen kişilerde DNA onarımı daha hızlı gerçekleşmektedir.

Tedavi sonrası ilk alınan örnekle (0. dak.) inkübasyonun 60. ve 120. dakikalarındaki değerler arasında sigara içimine bağlı olarak fark yoktur ( $p > 0.05$ ) (one-way ANOVA).



**Şekil 3.6.** Tez çalışmamıza katılan 100 hasta ile elde edilen komet testi sonuçlarının sigara içen (n:28) ve sigara içmeyen (n:72) olmak üzere gruplandırılmasıyla elde edilen sonuçlar.

\* Tedavi öncesi ile kıyaslandığında tedavi sonrası ve tedavi sonrası inkübasyonun 15., 30. ve 60. dakikalarında hem sigara içen hem de sigara içmeyenlerde istatistiksel olarak DNA hasarı artmıştır ( $p < 0.05$ ).

† Sigara içenler ile sigara içmeyenler birbirleriyle kıyaslandığında; inkübasyonun 15. ve 30. dakikalarında aradaki fark anlamlıdır ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA).

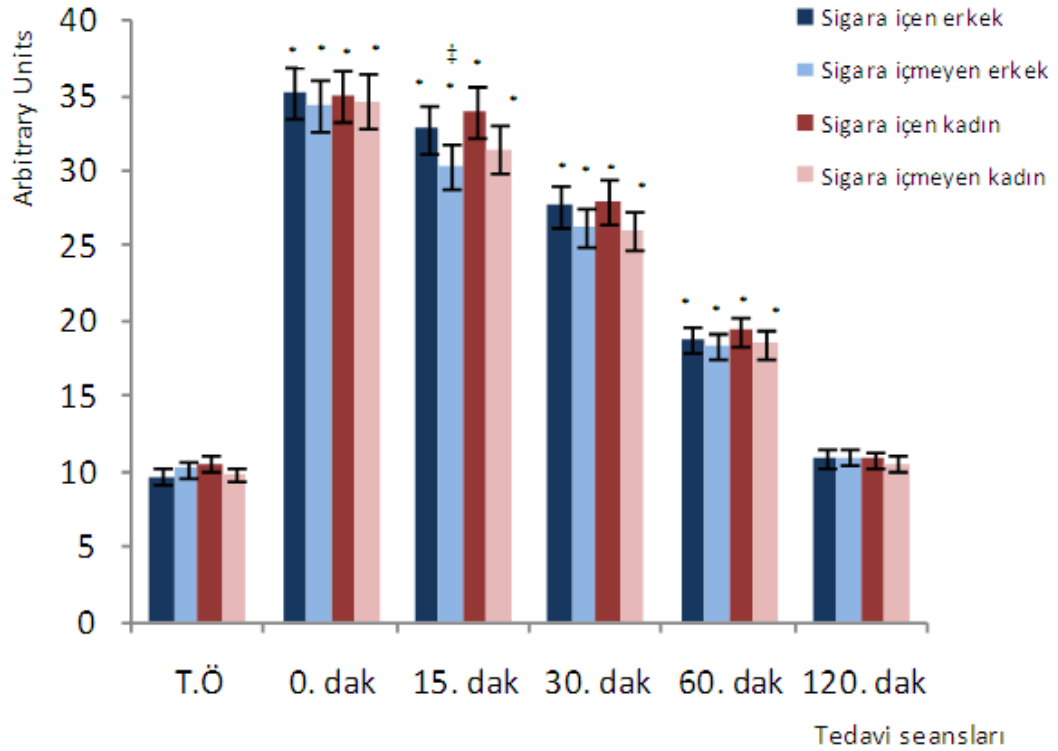
#### *Cinsiyet ve sigara içimine bağlı olarak değerlendirme:*

GATA Deniz ve Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı'na HBO tedavisi için başvuran hastalar arasından gönüllü olarak tez çalışmamıza katılan 100 hastaya ait komet testi sonuçlarının "cinsiyet ve sigara içme" durumuna bağlı olarak değerlendirilmesi Şekil 3.7'de gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre; tedavi öncesi ile kıyaslandığında tedavi sonrası ve tedavi sonrası inkübasyonun 15., 30. ve 60.

dakikalarında hem sigara içen hem de sigara içmeyen erkek ve kadınlarda DNA hasarı istatistiksel olarak artmıştır ( $p < 0.05$ ). İnkübasyonun 120. dakikasında ise hem sigara içen hem de sigara içmeyen erkek ve kadınlarda tedavi öncesi değerlerle istatistiksel olarak bir fark görülmemektedir ( $p > 0.05$ ).

Erkeklerde sigara içenler ile sigara içmeyenler birbirleriyle kıyaslandığında; inkübasyonun 15. dakikasında aradaki fark anlamlı ( $p < 0.05$ ) iken, tedavi sonrası ilk alınan örneklerle (0. dak.) inkübasyonun 30., 60. ve 120. dakikalarındaki değerler arasında erkeklerde sigara içimine bağlı olarak fark yoktur ( $p > 0.05$ ). Kadınlarda sigara içenler ile sigara içmeyenler birbirleriyle kıyaslandığında sigara içimine bağlı olarak fark gözlenmemiştir ( $p > 0.05$ ). Sigara içen erkek ve kadınlar birbirleriyle, sigara içmeyen erkek ve kadınlar kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak bir fark olmadığı bulunmuştur ( $p > 0.05$ , one-way ANOVA).



**Şekil 3.7.** Tez çalışmamıza katılan 100 hasta ile elde edilen komet testi sonuçlarının sigara içen erkek (n:21), sigara içmeyen erkek (n:56), sigara içen kadın (n:7) ve sigara içmeyen kadın (n:16) olmak üzere gruplandırılmasıyla elde edilen sonuçlar.

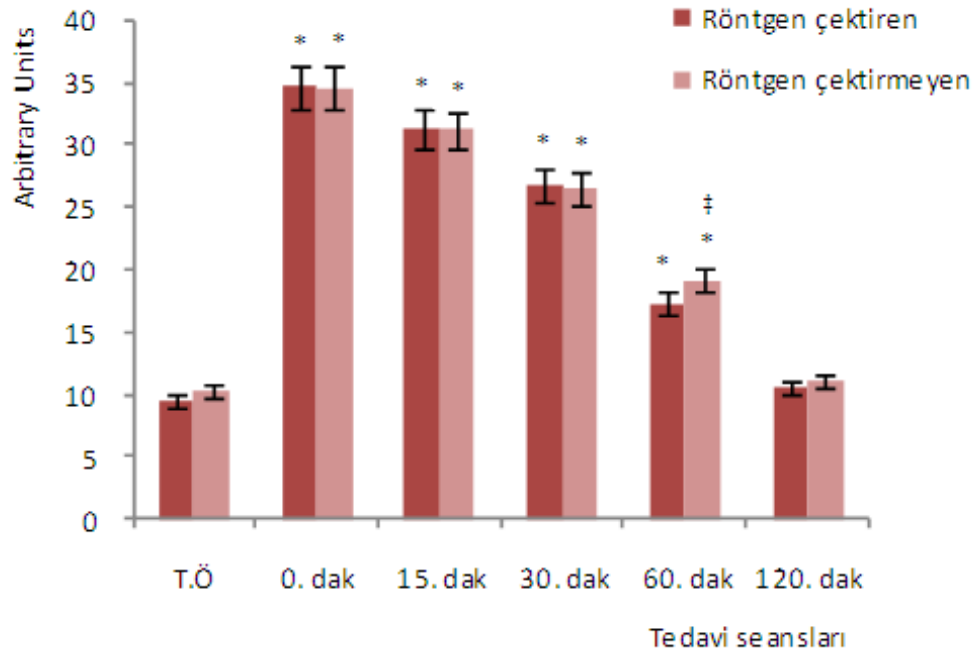
\* Tedavi öncesi ile kıyaslandığında tedavi sonrası ve tedavi sonrası inkübasyonun 15., 30. ve 60. dakikalarında hem sigara içen hem de sigara içmeyen erkek ve kadınlarda DNA hasarı istatistiksel olarak artmıştır ( $p < 0.05$ ).

‡ Erkeklerde sigara içenler ile sigara içmeyenler birbirleriyle kıyaslandığında; inkübasyonun 15. dakikasında aradaki fark anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA).

*Röntgen çekirme durumuna bağlı olarak değerlendirme:*

GATA Deniz ve Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı'na HBO tedavisi için başvuran hastalar arasından gönüllü olarak tez çalışmamıza katılan 100 hastaya ait komet testi sonuçlarının "röntgen çekirme" durumuna bağlı olarak değerlendirilmesi Şekil 3.8'de gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre; tedavi öncesi ile kıyaslandığında tedavi sonrası ve tedavi sonrası inkübasyonun 15., 30. ve 60. dakikalarında röntgen çektiren ve çektirmeyenlerde DNA hasarı istatistiksel olarak artmıştır ( $p<0.05$ ). İnkübasyonun 120. dakikasında ise hem röntgen çektiren hem de çektirmeyenlerde tedavi öncesi değerlerle istatistiksel olarak bir fark görülmemektedir ( $p>0.05$ ). Röntgen çektirmiş hastalarla röntgen çektirmemiş hastalar birbirleriyle kıyaslandığında, yalnızca inkübasyonun 60. dakikasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ( $p<0.05$ , one-way ANOVA).



**Şekil 3.8.** Tez çalışmamıza katılan 100 hasta ile elde edilen komet testi sonuçlarının röntgen çektiren (n:34) ve röntgen çektirmeyen(n:66) olmak üzere gruplandırılmasıyla elde edilen sonuçlar.

\* Tedavi öncesi ile kıyaslandığında tedavi sonrası ve tedavi sonrası inkübasyonun 15., 30. ve 60. dakikalarında röntgen çektiren ve çektirmeyenlerde DNA hasarı istatistiksel olarak artmıştır ( $p<0.05$ ).

‡ Röntgen çektirmiş hastalarla röntgen çektirmemiş hastalar birbirleriyle kıyaslandığında, yalnızca inkübasyonun 60. dakikasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ( $p<0.05$ , one-way ANOVA).

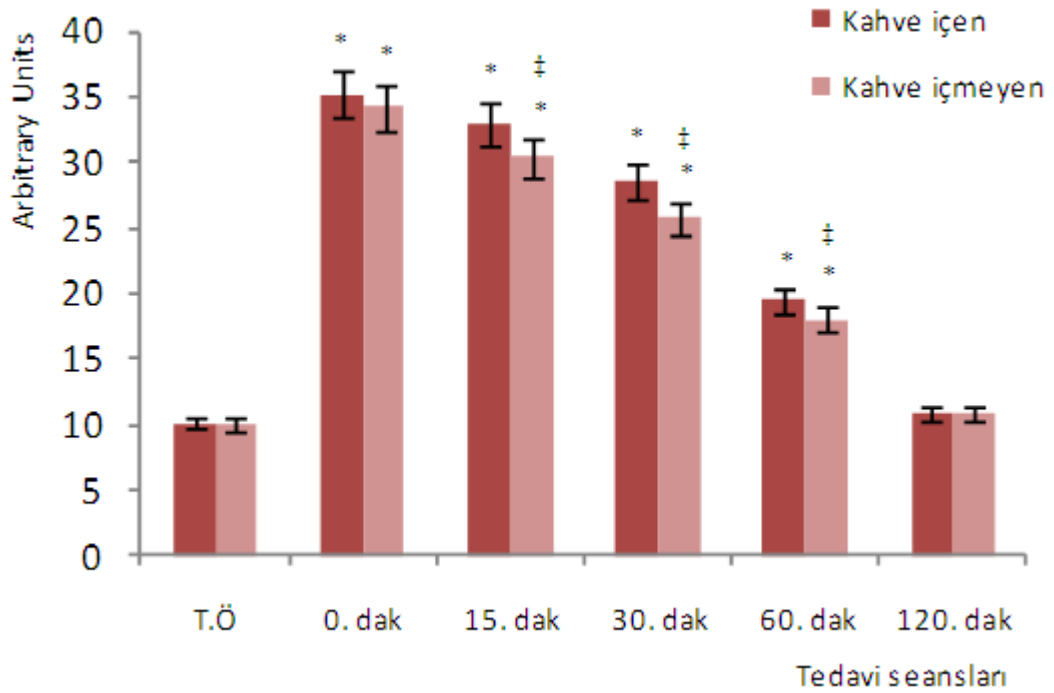
*Kahve içimine bağlı olarak değerlendirme:*

GATA Deniz ve Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı'na HBO tedavisi için başvuran hastalar arasından gönüllü olarak tez çalışmamıza katılan 100 hastaya ait komet testi sonuçlarının "kahve içimine" bağlı olarak değerlendirilmesi Şekil 3.9'da gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre; tedavi öncesi ile kıyaslandığında tedavi sonrası ve tedavi sonrası inkübasyonun 15., 30. ve 60. dakikalarında kahve içen ve içmeyenlerde DNA hasarı istatistiksel olarak artmıştır ( $p < 0.05$ ). İnkübasyonun 120. dakikasında ise hem kahve içen hem de içmeyen hastalarda tedavi öncesi değerlerle istatistiksel olarak bir fark görülmemektedir ( $p > 0.05$ ).

Kahve içen hastalarla kahve içmeyen hastalar birbirleriyle kıyaslandığında, inkübasyonun 15., 30., 60. dakikasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ( $p < 0.05$ ), kahve içmeyen hastalarda DNA onarımı daha hızlı gerçekleşmektedir. Tedavi sonrasında alınan örneklerle (0. dak.) tedavi sonrası inkübasyonun 120. dakikasında ise kahve içimine bağlı olarak DNA hasarında bir fark görülmemiştir ( $p > 0.05$ , one-way ANOVA).





**Şekil 3.9.** Tez çalışmamıza katılan 100 hasta ile elde edilen komet testi sonuçlarının kahve içen (n:31) ve kahve içmeyen (n:69) olmak üzere gruplandırılmasıyla elde edilen sonuçlar.

\* Tedavi öncesi ile kıyaslandığında tedavi sonrası ve tedavi sonrası inkübasyonun 15., 30. ve 60. dakikalarında kahve içen ve içmeyenlerde DNA hasarı istatistiksel olarak artmıştır ( $p < 0.05$ ).

‡ Kahve içen hastalarla kahve içmeyen hastalar birbirleriyle kıyaslandığında, inkübasyonun 15., 30., 60. dakikasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA).

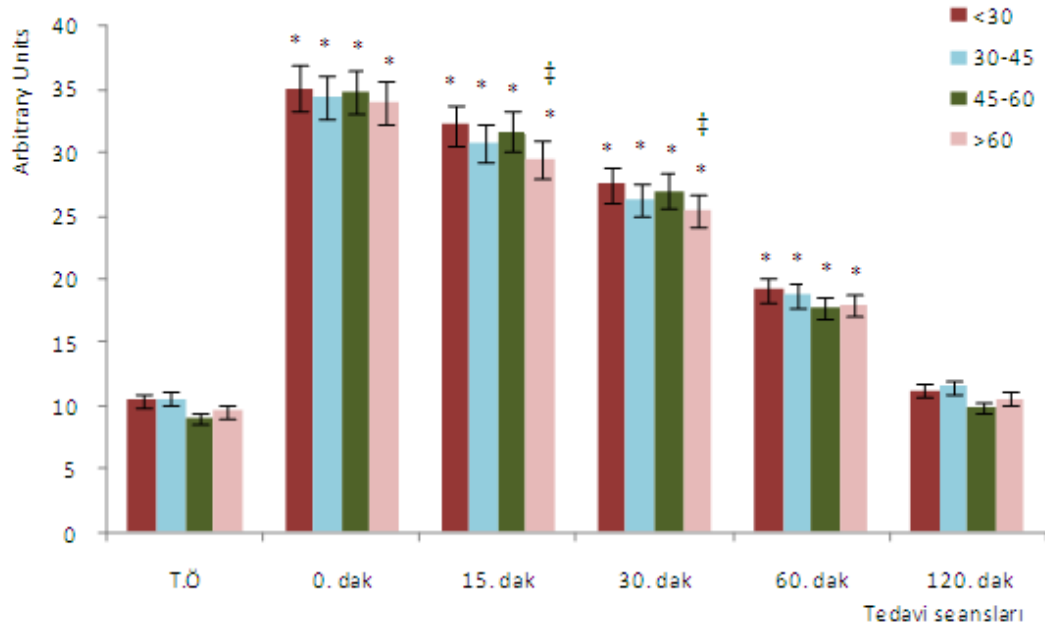
*Yaş durumuna bağlı olarak değerlendirme:*

GATA Deniz ve Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı'na HBO tedavisi için başvuran hastalar arasından gönüllü olarak tez çalışmamıza katılan 100 hastaya ait komet testi sonuçlarının hastaların "yaş dağılımına" bağlı olarak değerlendirilmesi Şekil 3.10'da gösterilmiştir.

Şekil 3.10'da görüldüğü gibi; tedavi öncesi ile kıyaslandığında test edilen tüm yaş gruplarında (<30, 30-45, 45-60 ve >60 olmak üzere 4 grup) tedavi sonrası ve tedavi sonrası inkübasyonun 15., 30. ve 60. dakikalarında DNA hasarı istatistiksel olarak artmış iken ( $p<0.05$ ), inkübasyonun 120. dakikasında ise tedavi öncesi değerlerle istatistiksel olarak bir fark görülmemektedir ( $p>0.05$ ).

60 yaşın üzerindeki hastalar diğer yaş grupları ile kıyaslandığında, *in-vitro* inkübasyonun 15. dakikasında, 30 yaşından küçük hastalarda ve 45-60 yaş arasındaki hastalarda görülen DNA hasarları 60 yaşın üzerindeki hasta grubundan istatistiksel olarak farklıdır ( $p<0.05$ ).

Ayrıca inkübasyonun 30. dakikasında, 60 yaşın üzerindeki hastalar ile 30 yaşından küçük hastalar birbirleriyle kıyaslandığında oluşan DNA hasarları istatistiksel olarak farklıdır ( $p<0.05$ , one-way ANOVA).



**Şekil 3.10.** Tez çalışmamıza katılan 100 hasta ile elde edilen komet testi sonuçlarının yaş dağılımına bağlı olarak; <30 (n:28), 30-45 (n:34), 45-60 (n:25) ve >60 (n:13) olmak üzere gruplandırılmasıyla elde edilen sonuçlar.

\* Tedavi öncesi ile kıyaslandığında test edilen tüm yaş gruplarında tedavi sonrası ve tedavi sonrası inkübasyonun 15., 30. ve 60. dakikalarında kahve içen ve içmeyenlerde DNA hasarı istatistiksel olarak artmıştır ( $p < 0.05$ ).

‡ 60 yaşın üzerindeki hastalar diğer yaş grupları ile kıyaslandığında, *in-vitro* inkübasyonun 15. dakikasında, 30 yaşından küçük hastalarda ve 45-60 yaş arasındaki hastalarda görülen DNA hasarları 60 yaşın üzerindeki hasta grubundan istatistiksel olarak farklıdır ( $p < 0.05$ ).

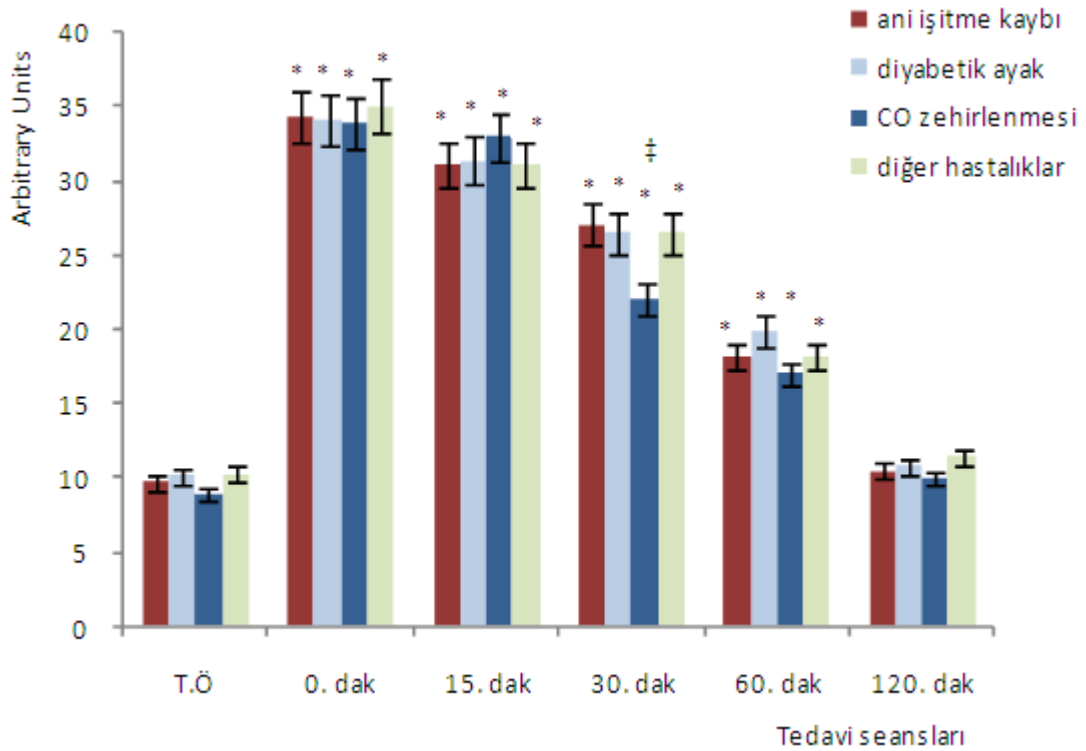
İnkübasyonun 30. dakikasında, 60 yaşın üzerindeki hastalar ile 30 yaşından küçük hastalar birbirleriyle kıyaslandığında oluşan DNA hasarları istatistiksel olarak farklıdır ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA).

#### *Hastalık durumuna bağlı olarak değerlendirme:*

GATA Deniz ve Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı'na HBO tedavisi için başvuran hastalar arasından gönüllü olarak tez çalışmamıza katılan 100 hastaya ait komet testi sonuçlarının "hastalık durumuna" bağlı olarak değerlendirilmesi Şekil 3.11'de gösterilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre; tedavi öncesi ile kıyaslandığında test edilen tüm hastalık gruplarında (ani işitme kaybı, diyabetik ayak ve CO zehirlenmesi ve diğer hastalıklar olmak üzere 4 grup) tedavi sonrası ve tedavi sonrası inkübasyonun 15., 30. ve 60. dakikalarında DNA hasarı istatistiksel olarak artmış iken ( $p < 0.05$ ), inkübasyonun 120. dakikasında tedavi öncesi değerlerle hastalık grupları arasında bir fark görülmemektedir ( $p > 0.05$ ).

Hastalık grupları birbirleriyle kıyaslandığında, inkübasyonun 30. dakikasında, CO zehirlenmesi nedeniyle hiperbarik oksijen tedavisi gören hastalarda görülen DNA hasarı ile ani işitme kaybı ve diyabetik ayak hastalıkları nedeniyle hiperbarik oksijen tedavisi gören hastalarda görülen DNA hasarı arasında istatistiksel olarak fark gözlenmiştir. ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA).



**Şekil 3.11.** Tez çalışmamıza katılan 100 hasta ile elde edilen komet testi sonuçlarının hastalık durumuna bağlı olarak; ani işitme kaybı (n:36), diyabetik ayak (n:22), CO intoksikasyonu (n:2) ve diğer hastalıklar (n:40) olmak üzere gruplandırılmasıyla elde edilen sonuçlar.

\* Tedavi öncesi ile kıyaslandığında test edilen tüm hastalık gruplarında (ani işitme kaybı, diyabetik ayak ve CO zehirlenmesi olmak üzere 3 grup) tedavi sonrası ve tedavi sonrası inkübasyonun 15., 30. ve 60. dakikalarında DNA hasarı istatistiksel olarak artmıştır.

‡ CO zehirlenmesi nedeniyle hiperbarik oksijen tedavisi gören hastalarda gözlenen DNA hasarı ile kıyaslandığında, inkübasyonun 30. dakikasında, ani işitme kaybı, diyabetik ayak ve diğer hastalıklar nedeniyle hiperbarik oksijen tedavisi gören hastalarda görülen DNA hasarı istatistiksel olarak artmıştır ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA).

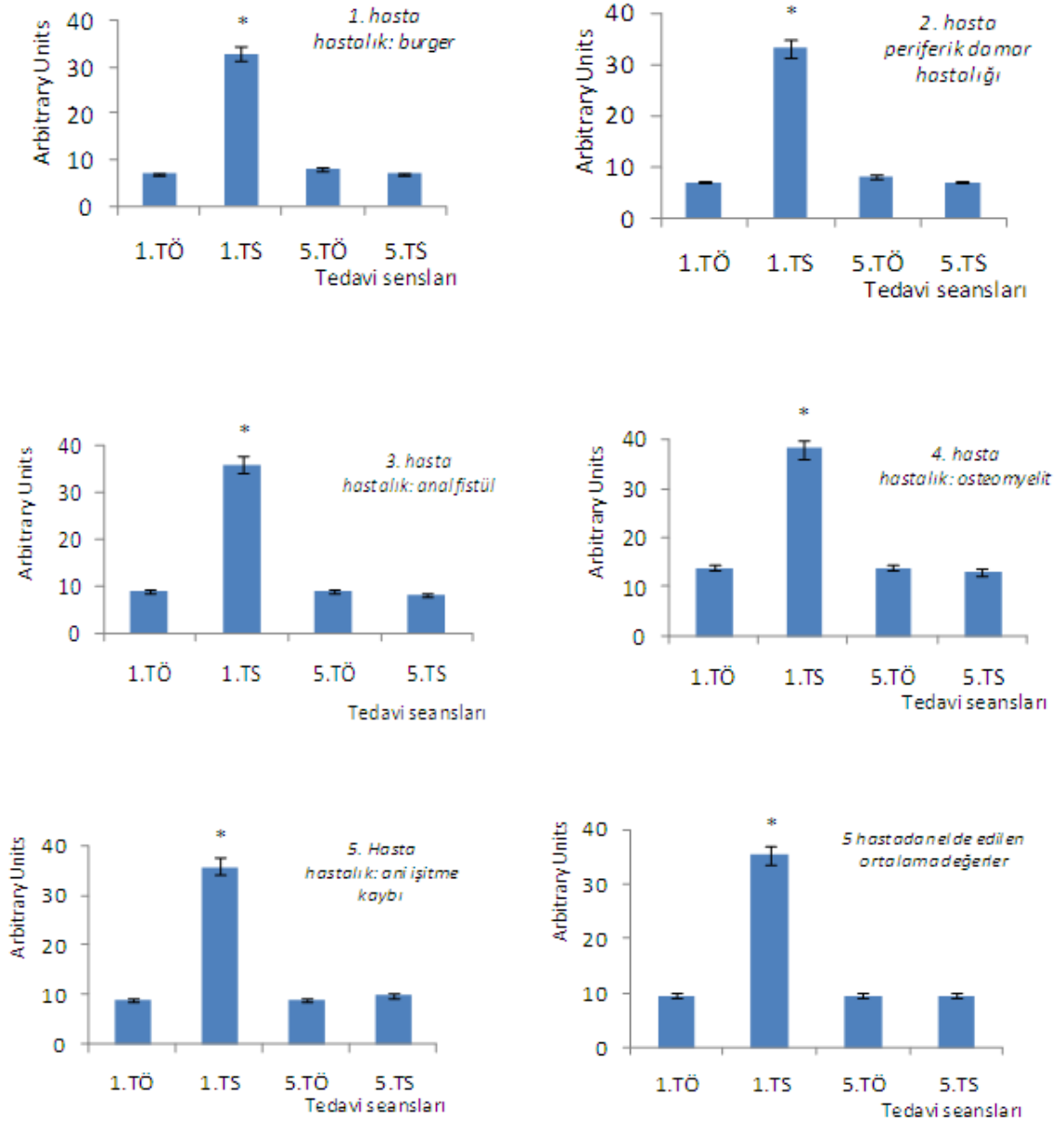
### **3.2.2.3. HBOT'nin 1. ve 5. Seansından Önce ve Sonra Alınan Örneklerle Ait Sonuçlar**

10 seanslık HBOT için başvuran hastalardan 5 tanesi (86.-90. hastalar) tedavi süresince (ilk 5 seans) izlendi. Bu hastalardan tedaviye başlamadan önce ve ilk seans sonrasında alınan kan örneklerinin yanı sıra, tedavinin ortasına denk gelen 5. seans öncesinde ve seans sonrasında kan örneği alınarak komet testi uygulandı. Bu hastaların ayrı ayrı komet testi sonuçları ve ortalama değerlerle elde edilen sonuçlar Şekil 3.12'de gösterilmiştir.

Şekil 3.12'de görüldüğü gibi, 5 hastaya ait ayrı ayrı sonuçlar ve ortalama değerlerle elde edilen sonuçlarda, HBOT'un 1. seans sonrasında çalışılan komet testinde DNA hasarı istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).

Tedavi öncesi değerle kıyaslandığında, tedavinin ortasına denk gelen 5. seans öncesinden ve bu seansın hemen sonrasında alınan örneklerdeki DNA hasarında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır ( $p > 0.05$ , one-way ANOVA).

1. seans sonrası alınan örneklerdeki DNA hasarları ile 5. seans sonrası alınan örnekler karşılaştırıldığında, 1. seans sonrasındaki DNA hasarı istatistiksel olarak yüksektir. 5. seans sonrasındaki değerler tedaviye başlamadan önceki değerlerdedir.



**Şekil 3.12.** 5 hastaya ait tedaviye başlamadan önce ve ilk seans sonrasında ve tedavinin ortasına denk gelen 5. seans öncesinde ve seans sonrasında uygulanan komet testi sonuçları ve bu 5 hastaya ait sonuçların ortalaması. Hiperbarik oksijen tedavisinin ilk seansından sonraki örneklerde DNA hasarı istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ( $p < 0.05$ , one-way ANOVA).

Ayrıca yine bu örneklerle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanarak HBO tedavisi sırasında oluşan adaptif cevabın, *in-vitro* koşullarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile oluşturulan DNA hasarı üzerindeki etkileri araştırıldı. Bu amaçla ilk seans sonrası ve 5. seans sonrası alınan örneklerle ise 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulandı ve komet testi kullanılarak DNA hasarlarına bakıldı. Ayrıca ilk seans ve 5. seans sonrası alınan örnekler 2 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra DNA onarımı tayin edildi. Her bir hastaya ait ayrı ayrı komet testi sonuçları ve ortalama değerlerle elde edilen sonuçlar Şekil 3.13'te gösterilmiştir.

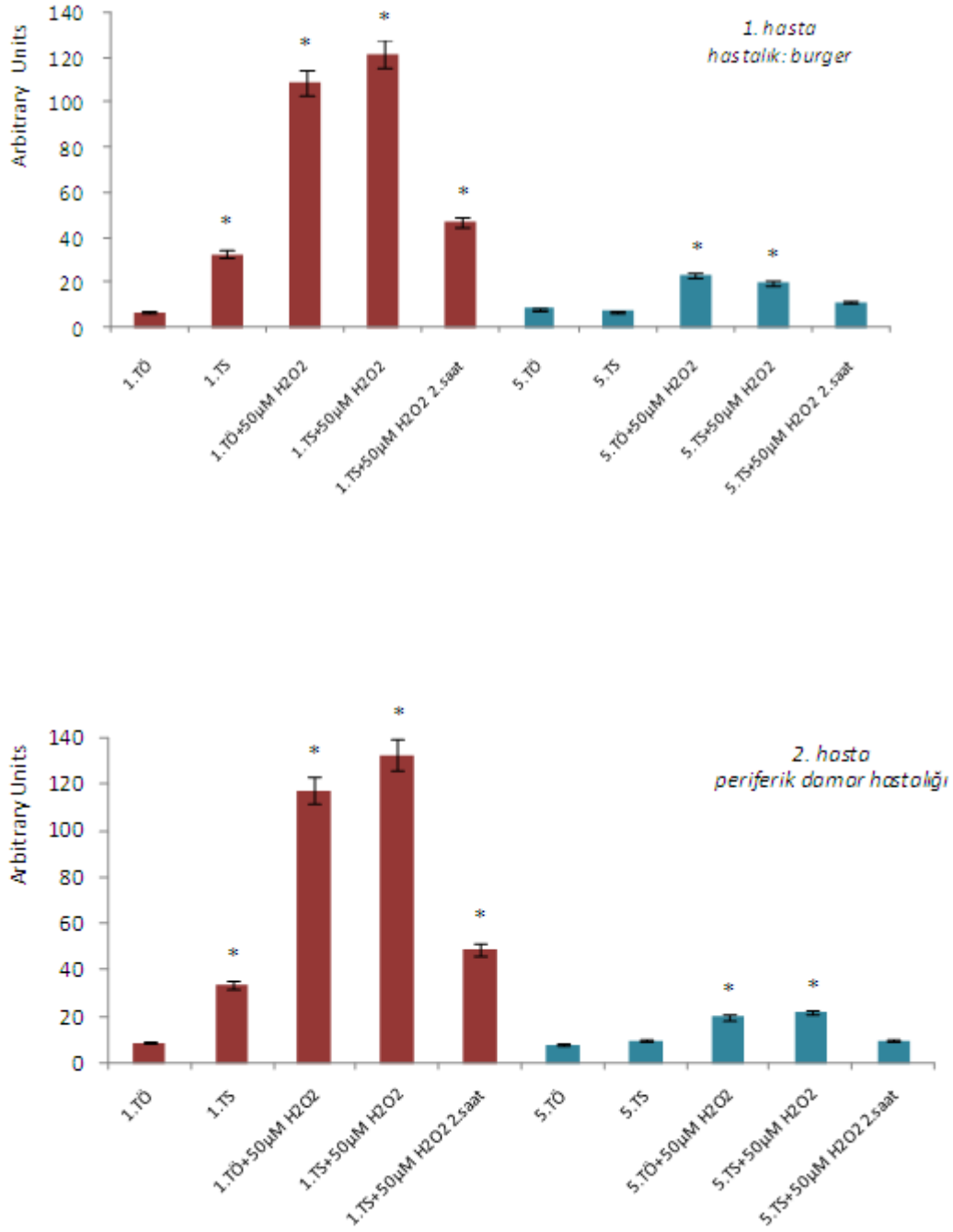
Elde edilen sonuçlara göre, 5 hastaya ait ayrı ayrı sonuçlar ve ortalama değerlerle elde edilen sonuçlarda, tedavi öncesi değerle kıyaslandığında, 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması ile DNA hasarı istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur (p<0.05). 5. seans sonrasında alınan örneklerle 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanıp 2 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen değerler tedavi öncesi değerle istatistiksel olarak farklı değildir (p>0.05).

5. seans öncesi ve 5. seans sonrası alınan örneklerle 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması ile elde edilen sonuçlar, 1. seans sonrası örneklerle 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak gözlenen DNA hasarları azalmıştır (p<0.05). Ayrıca 5. seans öncesi ve 5. seans sonrası alınan örneklerle 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması ile elde edilen sonuçlarda istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır (p>0.05).

50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması ardından 2 saatlik inkübasyon sonrasında elde edilen değerler kıyaslandığında; 1. seans sonrasındaki hasar 5. seansa göre istatistiksel olarak fazla gözlenmiştir (p<0.05, one-way ANOVA).

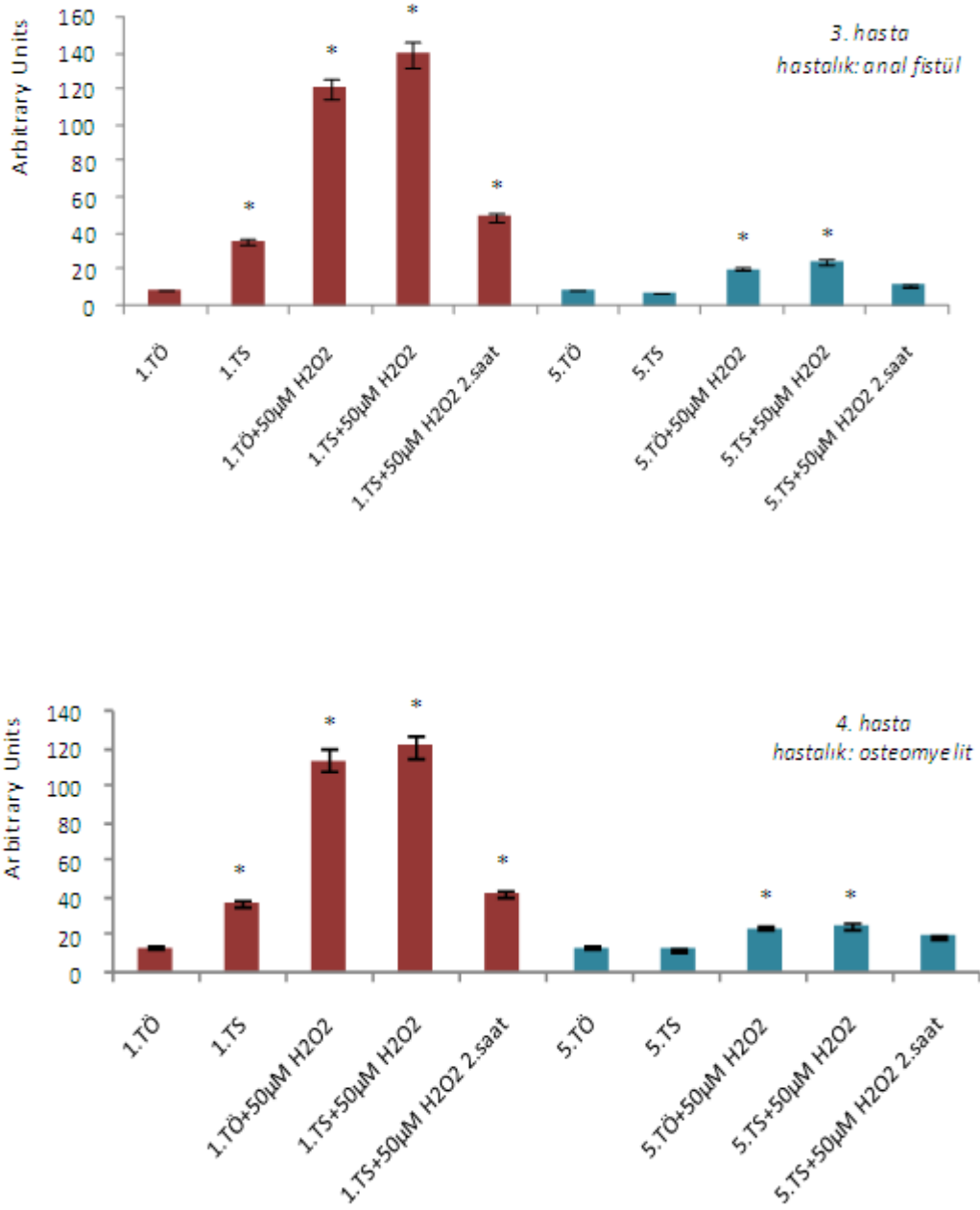
5 hastaya ait değerler toplu olarak Çizelge 3.5'te gösterilmiştir.





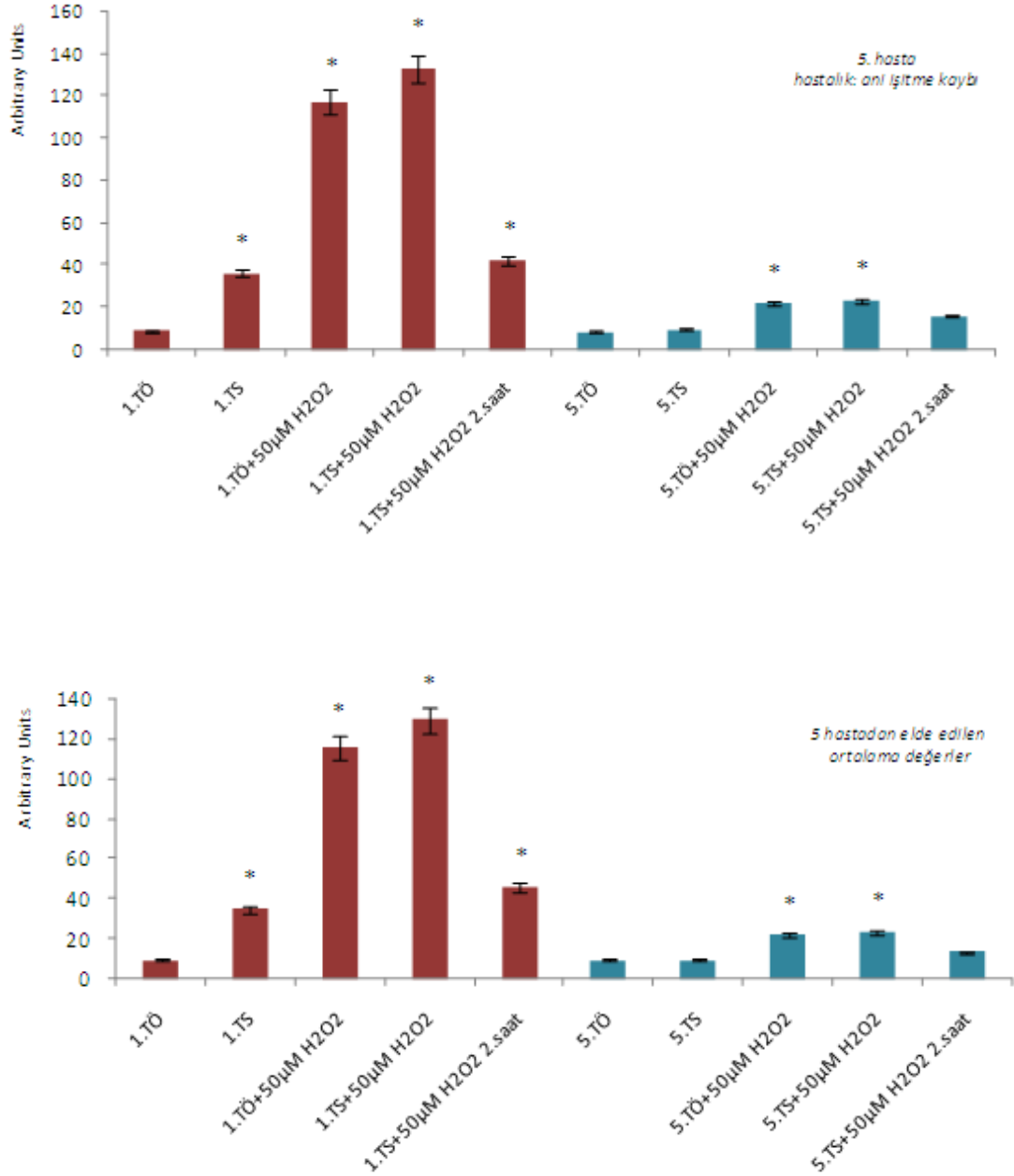
**Şekil 3.13.** 5 hastaya ait tedaviye başlamadan önce ve ilk seans sonrasında ve tedavinin ortasına denk gelen 5. seans öncesinde ve seans sonrasında alınan örneklerle 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması ve 2 saatlik inkubasyon ile elde edilen komet testi sonuçları ve bu 5 hastaya ait sonuçların ortalaması. Tedavi öncesi değerle kıyaslandığında, 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması ile DNA hasarı istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur (p<0.05). 5. seans sonrasında alınan örneklerle 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanıp 2 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen değerler

tedavi öncesi değerle istatistiksel olarak farklı değildir ( $p>0.05$ , one-way ANOVA).



**Şekil 3.13. Devam** 5 hastaya ait tedaviye başlamadan önce ve ilk seans sonrasında ve tedavinin ortasına denk gelen 5. seans öncesinde ve seans sonrasında alınan örneklerle 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması ve 2 saatlik inkübasyon ile elde edilen komet testi sonuçları ve bu 5 hastaya ait sonuçların ortalaması. Tedavi öncesi değerle kıyaslandığında, 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması ile DNA hasarı istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). 5. seans sonrasında alınan örneklerle 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanıp 2 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen değerler

tedavi öncesi değerle istatistiksel olarak farklı değildir ( $p>0.05$ , one-way ANOVA).



**Şekil 3.13. Devam** 5 hastaya ait tedaviye başlamadan önce ve ilk seans sonrasında ve tedavinin ortasına denk gelen 5. seans öncesinde ve seans sonrasında alınan örneklerle 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması ve 2 saatlik inkubasyon ile elde edilen komet testi sonuçları ve bu 5 hastaya ait sonuçların ortalaması. Tedavi öncesi değerle kıyaslandığında, 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulaması ile DNA hasarı istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ). 5. seans sonrasında alınan örneklerle 50 µM

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanıp 2 saatlik inkübasyondan sonra elde edilen değerler tedavi öncesi değerle istatistiksel olarak farklı değildir ( $p>0.05$ , one-way ANOVA).

**Çizelge 3.5.** 5 hastaya ait ilk seans öncesi ve sonrası, 5. seans öncesi ve sonrası alınan örneklerde uygulanan ve bu örneklerin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye maruz bırakılması ile komet testi uygulanarak elde edilen arbitrary units (AU) değerleri.

<i>Hastaların 1. seanstaki durumları</i>						<i>Hastaların 5. seanstaki durumları</i>				
1.TÖ	1.TS	1.TÖ+50µM H2O2	1.TS+50µM H2O2	1.TS+50µM H2O2 2.saat		5.TÖ	5.TS	5.TÖ+50µM H2O2	5.TS+50µM H2O2	5.TS+50µM H2O2 2.saat
1	7	33*	109*	122*	47*	8	7	23*	20*	11
2	9	34*	118*	133*	49*	8	10	20*	22*	10
3	9	36*	121*	140*	50*	9	8	21*	25*	12
4	14	38*	114*	122*	43*	14	13	24*	25*	20
5	9	36*	117*	133*	42*	9	10	22*	23*	16
<b>Ort.</b>	9,6	35,4*	115,8*	130*	46,2*	9,6	9,6	22*	23*	13,8

(\* p<0.05, one-way ANOVA)

### 3.3. Sitokinezi Bloke Edilmiş Mikroçekirdek (CBMN) Testi Kullanılarak Elde Edilen Sonuçlar

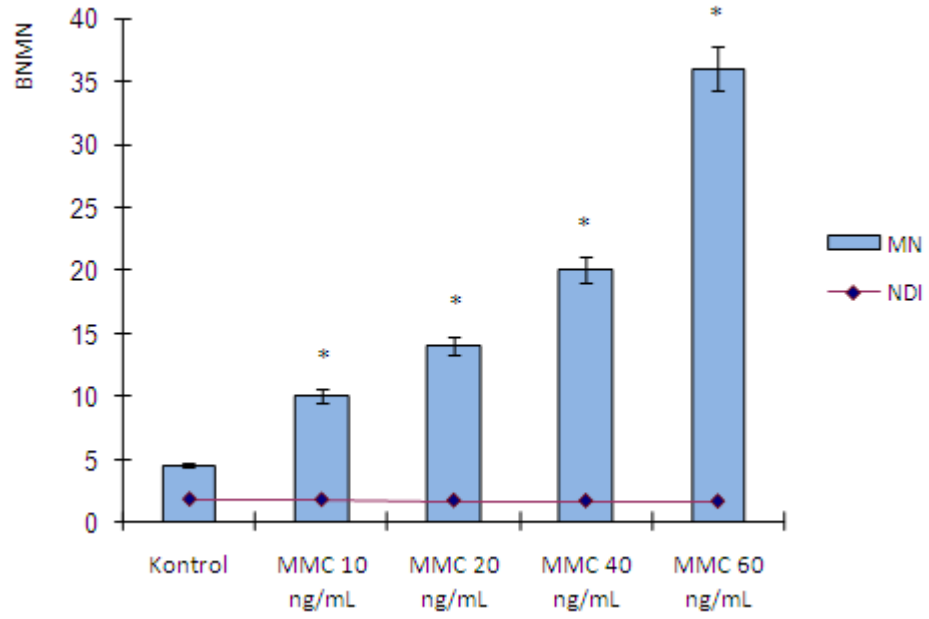
#### 3.3.1. Pozitif Kontrol Olarak Kullanılan MMC (Mitomisin-C) ile Elde Edilen CBMN Testi Sonuçları

Bölüm 2.2.7’de anlatıldığı şekilde lenfosit hücrelerine pozitif kontrol olarak 10, 20, 40 ve 60 ng/ml MMC uygulanarak CBMN testi ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlar, NDI değerleri de hesaplanarak Çizelge 3.6 ve Şekil 3.14’de gösterilmiştir. MMC’nin uygulanan tüm konsantrasyonlarındaki BNMN sayıları, kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak yüksektir ( $p<0.05$ ,  $t$ -test).

**Çizelge 3.6.** Lenfositlere pozitif kontrol olarak uygulanan 10, 20, 40 ve 60 ng/ml MMC ile elde edilen mikroçekirdek sayıları ve NDI değerleri.

	<i>BNMN</i>	<i>NDI</i>
Kontrol	4,5	1,7676
MMC 10 ng/mL	10*	1,736
MMC 20 ng/mL	14*	1,678
MMC 40 ng/mL	20*	1,648
MMC 60 ng/mL	36*	1,61

$p<0.05$ ,  $t$ -test



**Şekil 3.14.** Lenfositlere pozitif kontrol olarak uygulanan 10, 20, 40 ve 60 ng/ml MMC ile elde edilen mikroçekirdek sayıları ve NDI değerleri. Kontrolle kıyaslandığında MMC'nin uygulanan tüm konsantrasyonlarındaki BNMN sayıları istatistiksel olarak fazladır ( $p < 0.05$ ). NDI değerleri arasında istatistiksel olarak bir fark yoktur ( $p > 0.05$ ,  $t$ -test).

### **3.3.2. HBOT'den Önce ve İlk Seanstan Sonra Alınan Örneklerle Ait Sitokinezi Bloke Edilmiş Mikroçekerdek Testi Sonuçları**

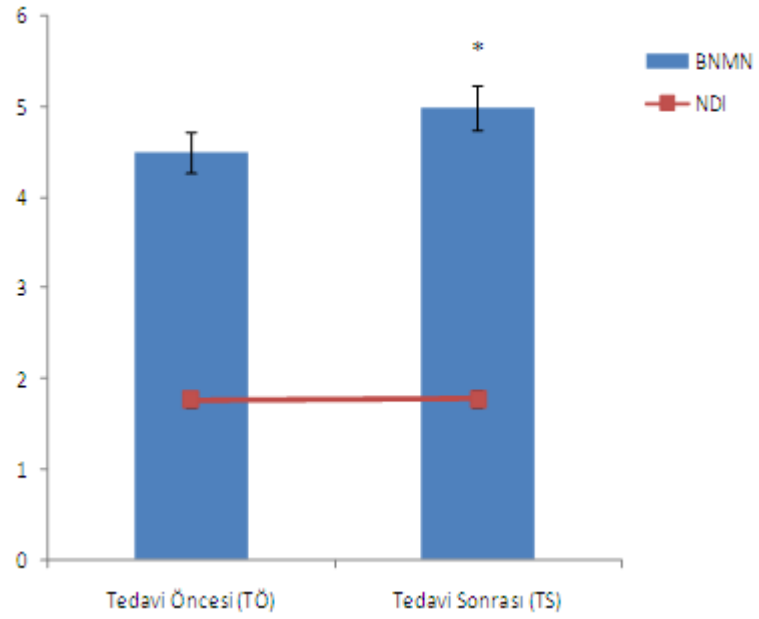
HBO tedavisi gören 100 hastadan 90'nına, tedaviye başlamadan hemen önce ve ilk tedavi seansından sonra alınan kan örneklerinde uygulanan CBMN testi sonuçlarına ait ortalama BNMN ve NDI değerleri Şekil 3.15'de gösterilmiştir. 90 hastaya ait BNMN ve NDI değerleri, ortalama değerler ve standart sapma değerleri Çizelge 3.7'de gösterilmiştir.

Tedavi öncesi ve tedavi sonrası alınan örneklerdeki BNMN sayıları karşılaştırıldığında TS örneklerindeki BNMN sayıları, TÖ örneklerindeki BNMN sayılarına göre istatistiksel olarak yüksektir ( $p>0.05$ ). TÖ ve TS örneklerinin NDI değerleri arasında istatistiksel olarak bir fark yoktur ( $p>0.05$ ,  $t$ -test).



**Çizelge 3.7.** 90 hastaya ait MN ve NDI değerleri, ortalama değerler ve standart sapma değerleri.

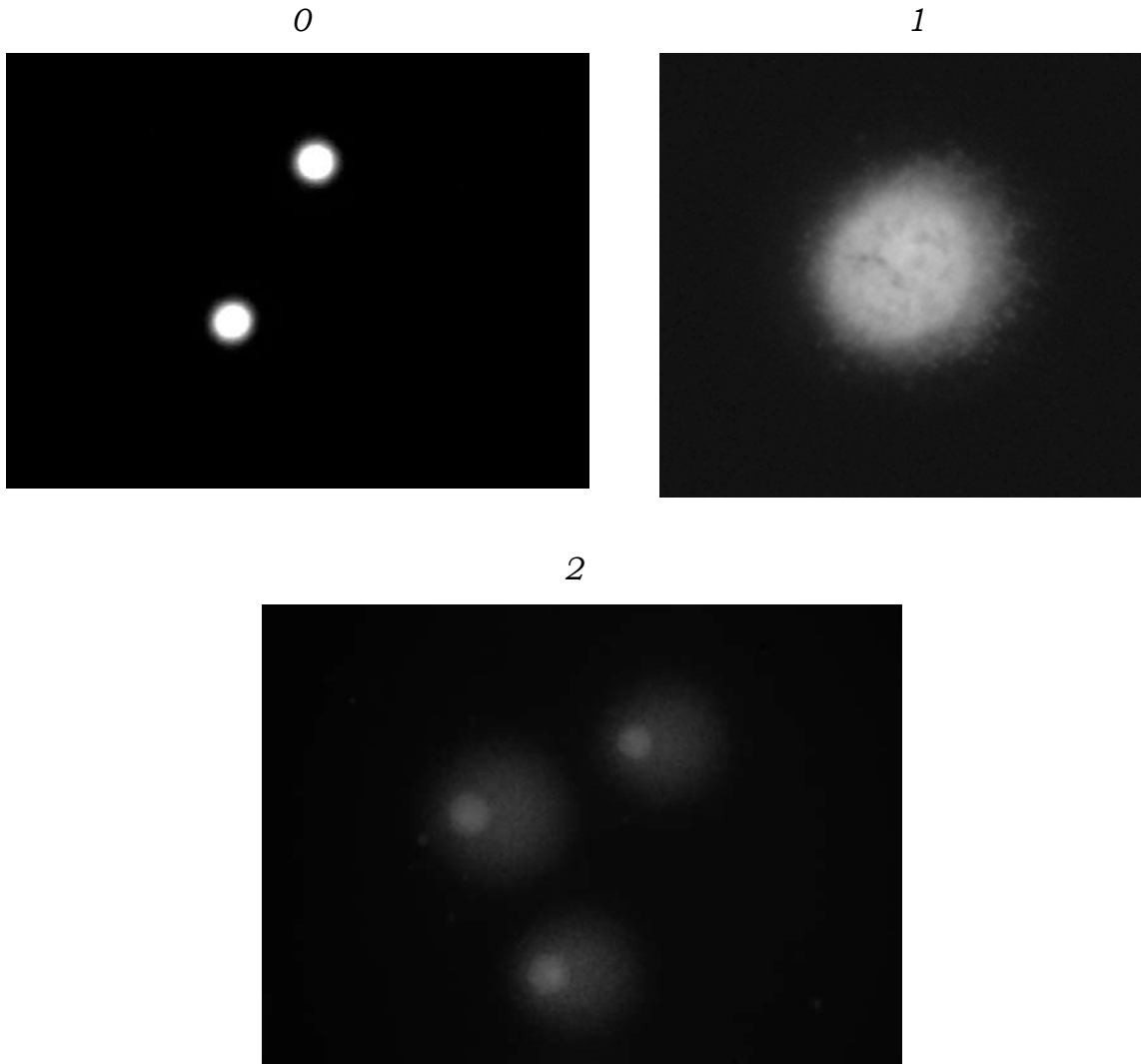
	BNMN	TÖ	TS	NDI	TÖ	TS		BNMN	TÖ	TS	NDI	TÖ	TS
1		3	3		1,75	1,71	47	4	5		1,806	1,824	
2		5	6		1,63	1,664	48	5	4		1,836	1,822	
3		3	4		1,4	1,808	49	4	6		1,744	1,782	
4		4	3		1,74	1,706	50	2	5		1,804	1,792	
5		5	4		1,69	1,766	51	3	5		1,782	1,762	
6		4	5		1,72	1,67	52	3	3		1,796	1,76	
7		4	4		1,78	1,744	53	4	3		1,692	1,732	
8		3	4		1,69	1,426	54	4	6		1,732	1,746	
9		4	3		1,75	1,738	55	5	6		1,832	1,82	
10		4	3		1,69	1,684	56	5	5		1,768	1,896	
11		5	4		1,75	1,752	57	6	6		1,758	1,782	
12		4	4		1,71	1,724	58	5	7		1,76	1,788	
13		4	4		1,74	1,702	59	3	6		1,836	1,838	
14		4	4		1,78	1,762	60	5	5		1,81	1,812	
15		3	3		1,7	1,698	61	4	5		1,826	1,792	
16		4	5		1,77	1,732	62	3	5		1,762	1,766	
17		5	5		1,77	1,748	63	4	4		1,826	1,802	
18		4	6		1,8	1,774	64	5	4		1,856	1,766	
19		5	7		1,78	1,732	65	3	5		1,82	1,822	
20		4	4		1,72	1,836	66	7	7		1,752	1,788	
21		4	5		1,77	1,748	67	5	6		1,838	1,828	
22		5	4		1,84	1,79	68	5	5		1,864	1,854	
23		6	4		1,87	1,852	69	4	5		1,83	1,832	
24		5	5		1,8	1,818	70	3	6		1,796	1,812	
25		6	7		1,7	1,722	71	5	6		1,782	1,786	
26		5	5		1,8	1,788	72	5	4		1,728	1,78	
27		6	5		1,75	1,772	73	4	4		1,756	1,792	
28		5	7		1,78	1,742	74	5	7		1,76	1,75	
29		4	7		1,74	1,772	75	6	8		1,77	1,78	
30		7	6		1,86	1,83	76	5	4		1,812	1,816	
31		6	5		1,82	1,826	77	5	5		1,776	1,776	
32		4	5		1,78	1,806	78	5	7		1,754	1,794	
33		6	6		1,74	1,79	79	4	6		1,742	1,756	
34		4	6		1,81	1,796	80	5	3		1,782	1,764	
35		4	4		1,77	1,808	81	3	4		1,736	1,746	
36		2	6		1,75	1,812	82	5	6		1,76	1,764	
37		5	5		1,75	1,786	83	5	4		1,746	1,84	
38		4	6		1,76	1,766	84	5	5		1,826	1,764	
39		6	5		1,74	1,768	85	3	4		1,744	1,75	
40		5	7		1,73	1,808	86	4	4		1,828	1,822	
41		6	4		1,86	1,83	87	5	5		1,786	1,784	
42		7	6		1,7	1,734	88	5	4		1,72	1,812	
43		6	6		1,72	1,766	89	3	5		1,696	1,764	
44		4	6		1,86	1,846	90	5	5		1,796	1,858	
45		5	5		1,81	1,796	<i>Std.sapma</i>	1,1	1,2		0,0732	0,069	
46		4	3		1,82	1,848	<i>Ort.</i>	4,6	4,9		1,7534	1,7608	



**Şekil 3.15.** HBO tedavisi gören 90 hastaya ait tedaviye başlamadan hemen önce (TÖ) ve ilk tedavi seansından sonra (TS) alınan kan örneklerinde uygulanan CBMN testi sonuçlarına ait ortalama MN ve NDI değerleri ( $p < 0.05$ ,  $t$ -test).

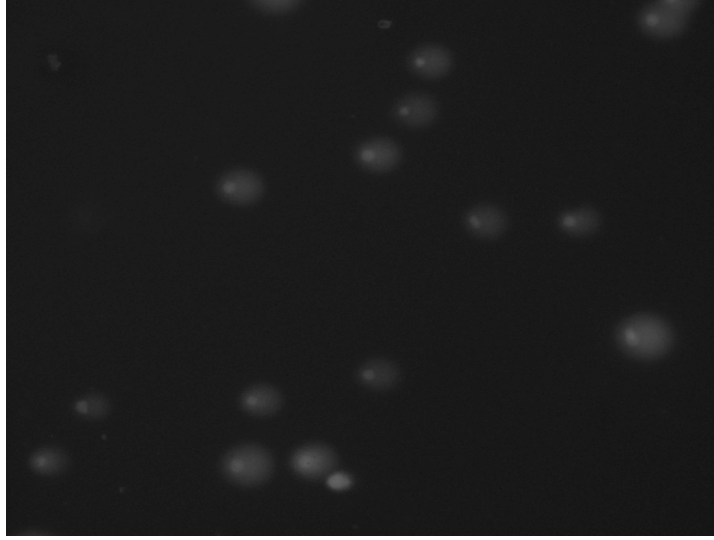
### 3.4. Komet Testi İle Gözlenen DNA Hasarının Floresan Mikroskop Altındaki Görüntüleri

Komet testi uygulanarak elde edilen hasarsız (0), az hasarlı (1), orta hasarlı (2), hasarlı (3) ve çok hasarlı (4) hücrelere ait floresan mikroskop altındaki görüntüler Şekil 3.16'da verilmiştir.

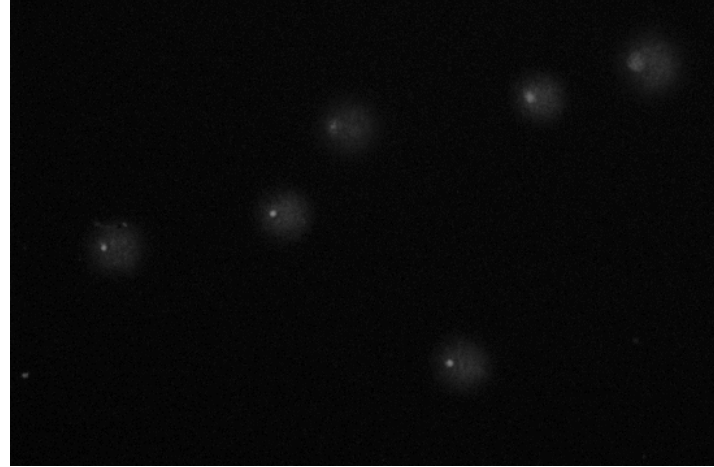


**Şekil 3.16.** Floresan mikroskop altındaki hasarsız (0) (mikroskop büyütmesi: 40x0.65), az hasarlı (1) (mikroskop büyütmesi: 10x0.25), orta hasarlı (2) (mikroskop büyütmesi: 40x0.65), hasarlı (3) (mikroskop büyütmesi: 40x0.65) ve çok hasarlı (4) (mikroskop büyütmesi: 40x0.65) DNA'ya ait komet görüntüleri.

3



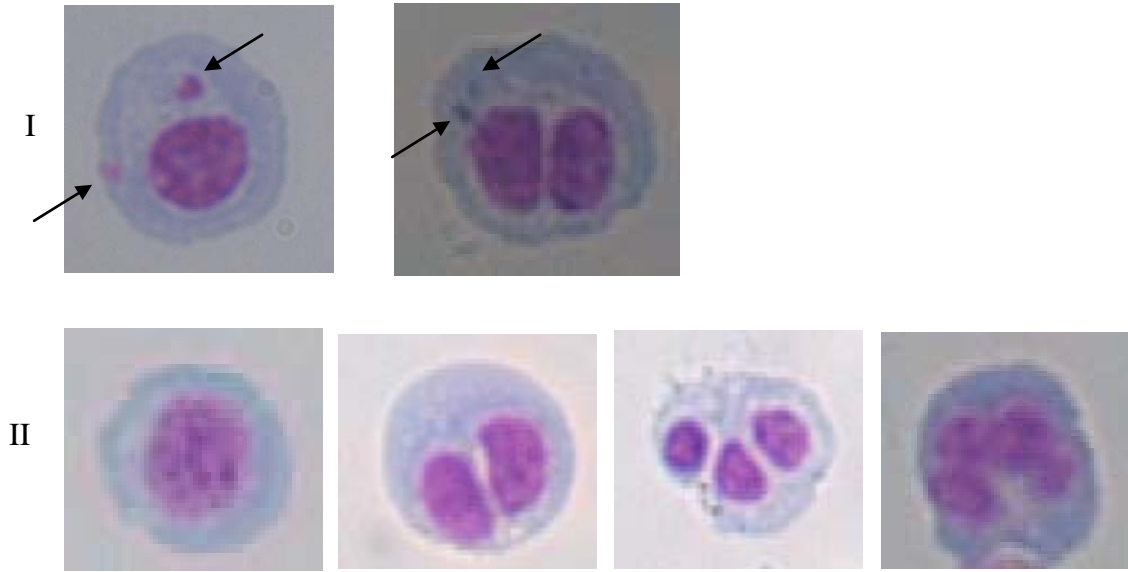
4



**Şekil 3.16. Devam** Fluoresan mikroskop altındaki hasarsız (0) (mikroskop büyütmesi: 40x0.65), az hasarlı (1) (mikroskop büyütmesi: 10x0.25), orta hasarlı (2) (mikroskop büyütmesi: 40x0.65), hasarlı (3) (mikroskop büyütmesi: 40x0.65) ve çok hasalı (4) (mikroskop büyütmesi: 40x0.65) DNA'ya ait komet görüntüleri.

### 3.5. CBMN Testi İle Gözlenen BNMN'lerin Işık Mikroskobu Altındaki Görüntüleri

CBMN yönteminde değerlendirmeye alınan ve alınmayan mikroçekirdek görüntülerine ait örnekler Şekil 3.17'de gösterilmiştir.



**Şekil 3.17.** CBMN yöntemiyle değerlendirmeye alınan ve alınmayan çekirdeklerin ve mikroçekirdeklerin mikroskop görüntüleri (20x0.40 mikroskop büyütmesi ile).

I: Tek çekirdekli ve çift çekirdekli hücrelerde mikroçekirdekleri göstermektedir (mikroçekirdekler oklarla gösterilmiştir). Yalnızca çift hücreli çekirdeklerdeki mikroçekirdekler değerlendirmeye alınmıştır.

II: NDI hesaplamasında kullanılan bir, iki, üç ve dört çekirdekli hücreleri göstermektedir.

## 4. TARTIŞMA

Dünya'da bugüne kadar HBOT'nin oluşturduğu genotoksik etkiler ile ilgili olarak pek çok çalışma bulunmasına rağmen, HBOT'ne giren gerçek hastalarda (tezimizde yapılmış olan çalışma kadar detaylı) bir çalışma bulunmamaktadır. Rothfuss ve ark.'nın (1998) 14 sağlıklı gönüllüde yaptığı benzer bir çalışma dışında insanlarda yapılmış başka bir çalışmaya rastlanamamıştır. Dünya'da bu konudaki çalışmaların öncülüğünü Alman bilim adamı Günter Speit yürütmektedir. Ancak Günter Speit ve ekibinin çalışmalarındaki amacı HBOT esnasında oluşan genotoksik etkilerin mutasyona neden olup olmadığını saptamak ve tedavi esnasında oluşan adaptif cevabın mekanizmasını tespit etmektir. Bu amaç doğrultusunda da genelde hücre kültürlerinde çalışmalarını yürütmektedirler. Halbuki bizim tezimizin temel amaçları;

- HBOT'ne giren gerçek hastalarda oluşan DNA hasarını görmek,
- Deneysel hücre kültürü ve sağlıklı bireylerde meydana gelen adaptif cevabın gerçek hastalarda da oluşup oluşmadığını görmek,
- HBOT esnasında artan oksidatif DNA hasarının tedavi sonrasında zamana bağlı olarak onarılıp onarılmadığını tespit etmektir.

Bilindiği gibi pek çok farklı hastalık nedeni ile HBOT uygulanabilmektedir. Bu hastalıkların durumu ve şiddetine göre de oluşabilecek DNA hasarı farklılık gösterebilecektir. Bu nedenle hücre kültürlerinde elde edilen cevapların gerçek hastalarda da gözlenip gözlenemeyeceği sorusunun cevaplanması gerekmektedir. Tezimizin sonuçları bu alandaki boşluğu dolduracaktır.

Tez çalışmamızda, komet testinde pozitif kontrol olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılmıştır. Çalışmamızda yapılan tüm komet uygulamaları ve fpg proteini ile kombinasyonlar pozitif kontrol olarak kullanılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 ve 100 µM) ile paralel yürütülmüştür. Şekil 3.1’de gösterildiği gibi, uygulanan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonları için DNA hasarları kontrole göre anlamlı bir artış göstermiştir.

Tez çalışmamızda, mikroçekirdek testinde pozitif kontrol olarak mitomisin-C (MMC) kullanılmıştır. Çalışmamızda yapılan tüm mikroçekirdek uygulamaları pozitif kontrol olarak kullanılan MMC (10, 20, 40 ve 60 ng/ml) ile paralel yürütülmüştür. Şekil 3.14’de gösterildiği gibi, uygulanan her MMC konsantrasyonu için BNMN sayıları kontrole göre anlamlı bir artış göstermiştir.

Çalışmamızda her hasta aynı zamanda kendi kontrol grubunu oluşturmaktadır. Her hastanın HBOT öncesinde tespit edilen DNA hasarı, tedavi sonrasında artan DNA hasarı için “kontrol” olarak kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında hiperbarik oksijen tedavisinin lenfositler üzerinde oluşturduğu genotoksik etkiler ve bu etkilere karşı lenfositlerde gözlenen cevaplar araştırılmıştır. Elde edilen sonuçların daha anlaşılır bir biçimde değerlendirilebilmesi için tez çalışmamızın sonuçları 6 ana başlık altında incelenmiştir;

1. *HBOT’ne giren 100 hastadaki tedavi öncesi (TÖ) ve tedavi sonrası (TS) gözlenen DNA hasarları*

Hiperbarik oksijen (HBO) tedavisine giren 100 hastada tedavi öncesi ve tedavinin hemen sonrasında alınan kan örneklerinde DNA hasarını ölçmek amacıyla komet testi uygulanmıştır.

Şekil 3.3’de görüldüğü gibi HBO tedavisinden hemen sonra alınan örneklerde gözlenen DNA hasarı, kontrol olarak kullandığımız tedavi öncesi alınan örneklerle göre artmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar daha önceki çalışmalar ile uyumludur (Dennog ve ark., 1996, Speit ve ark., 1998, Rothfuss ve ark., 1999, Rothfuss ve ark., 2000, Speit ve ark., 2002, Speit ve ark., 2004b).

## 2. *HBOT’ne giren hastalarda 8-oksoguanin oluşumuna bağlı olarak oluşan DNA hasarı*

HBOT’ne giren 100 hastada tedavi öncesi ve tedavinin hemen sonrasında alınan kan örneklerinde oksidatif DNA hasarını (8-oksoguanin) tespit etmek amacıyla “fpg-komet testi” kombinasyonu uygulanmıştır.

Tezimizde uygulamış olduğumuz Komet testinde pH>13’tür (alkali komet). Komet testi bu haliyle DNA çift zincir kırıklarını (DSB), DNA tek zincir kırıklarını (SSB) ve Alkali oynak bölgeleri (ALS) tespit edebilmekte ve mümkün olan en yüksek hassasiyete ulaşmaktadır.

Fpg, *Escherichia coli*’den elde edilen bir DNA onarım enzimidir. 7,8-dihidro-8-oksoguanin (8-oksoguanin), 2,6-diamino-4-hidroksi-5-formamidopirimidin (Fapy-Gua), 4,6-diamino-5-formamido-pirimidin (Fapy-Ade) daha az oranda 7,8-dihidro-8-oksoadenin (8-oksoadenin) ve apürinik/apirimidinik bölgeleri (AP-bölgeler) tanıyabilmekte ve bunları DNA zincir kırıklarına dönüştürebilmektedir (Tchou ve ark., 1994). Görüldüğü gibi Fpg protein oksidatif DNA hasarının göstergesi olan 8-oksoguanin için spesifik bir onarım enzimi değildir. Ancak oksidatif DNA hasarının gösterilmesinde en sık kullanılan enzimlerden biridir. Özellikle oksidatif hasar oluşturduğu bilinen maruziyetlerde kullanıldığında çok yüksek oranda 8-oksoguanin oluşumunu tespit



edebilmektedir. Çünkü oksidatif hasar oluşturan kimyasal madde maruziyetinde DNA'da oluşan 8-oksoguanin miktarı oluşan Fapy-Gua, Fapy-Ade ve AP-bölgelere göre kıyaslanmayacak derecede yüksektir. Bu nedenle bizim projemizde Komet testinin fpg proteini ile kombine olarak kullanılması çok büyük oranda HBOT esnasında oluşmuş olan 8-oksoguanin varlığına (oksidatif DNA hasarına) işaret edecektir.

Fpg proteini komet testi ile kombine edilerek uygulandığında gözlenen DNA hasarı artmaktadır. Bölüm 1.2.3'de bahsedildiği gibi, fpg proteini oksidatif DNA baz hasarını, özellikle 8-oksoguanini tayin eden bir endonükleazdır (Albertini ve ark., 2000, Tice ve ark., 2000) ve komet testinin hassasiyetini ve spesifikliğini artırmak amacıyla bu protein kullanılır (Speit ve ark., 2004a). Fpg proteini aslında DNA'daki kesip-çıkarma onarımında rol alan bir enzimdir (Tchou ve Grollman, 1995, Croteau ve Bohr, 1997). Fakat komet testi *in-vitro* koşullarda yapılırken fpg proteini kullanımı ile 8-oksoguanin, zincir kırıklarına dönüştürülür. Böylece oluşan kırıklar komet testi ile gözlenebilir hale gelir.

Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de görüldüğü gibi, çeşitli hastalıklar sebebiyle HBO tedavisine giren 100 hastada gözlenen oksidatif DNA hasarları karşılaştırıldığında;

- “Komet testi” ve “komet testi + fpg protein” uygulamaları sonrasında gözlenen DNA hasarlarının, HBOT'den önce (TÖ) kan numunesi alınan hastalarda farklı olmadığı görülmektedir.
- Ancak “komet testi” ve “komet testi + fpg protein” uygulamaları sonrasında gözlenen DNA hasarlarının, tedavi sonrasındaki (TS) hastalarda farklı olduğu ve fpg proteini ilavesi ile yapılan komet

testindeki DNA hasarının anlamlı bir şekilde ( $p<0.05$ , One way ANOVA) daha yüksek olduğu görülmektedir.

Bu fark HBOT esnasında DNA da çift ve tek zincir kırılmaları ve alkali oynak bölgelerin oluşmasının yanında 8-oksoguanin (oksidatif DNA hasarı) oluşumunu da göstermektedir. Bu sonuçlar daha önce hücre kültüründe yapılmış olan çalışmalar ile uyumludur (Dennog ve ark., 1996, Speit ve ark., 1998).

### 3. *HBOT'ne giren hastalarda tedavi sonrasında oluşan DNA hasarının in-vitro onarımı*

HBOT sonrasında oluşan DNA hasarının onarılıp onarılmadığının veya onarılıyor ise ne kadar zamanda onarıldığının gösterilmesinde yine zamana karşı komet testi sonuçları kullanılmıştır. Bu amaçla tedavi sonrasında hastalardan alınan kan numunelerinden lenfositler izole edildikten sonra 37°C'de inkübasyona tabi tutulmuşlar ve 0., 15., 30., 60., ve 120. dakikalarda bu lenfositlerden örnekler alınarak komet testi uygulanmıştır.

Şekil 3.3'de gösterildiği gibi, tedavi sonrasında ilk çalışılan örnekte (0. dak.) DNA hasarı en yüksek seviyede iken, inkübasyon süresince DNA hasarı giderek azalmakta ve 120. dakikada pek çok hasta grubunda tekrar tedavi öncesi (TÖ) değere ulaşmaktadır.

Çalışmamıza katılan 100 hasta; cinsiyet, kahve içme alışkanlığı, sigara içme alışkanlığı, yaş durumları, bu tedaviye girmelerine neden olan hastalık durumları ve röntgen çektirme durumları göz önüne alınarak ayrı ayrı gruplandırılıp karşılaştırıldığında; HBOT esnasında

oluşan DNA hasarının *in-vitro* inkübasyonun 120. dakikasında tedavi öncesindeki seviyesine döndüğü gözlemlendi. Ancak hastalar cinsiyetlerine göre ayrıldığında erkeklerde tedavi sonrasında artan DNA hasarının 120 dakikalık *in-vitro* inkübasyon sonrasında istatistiksel olarak tedavi öncesindeki değere dönmediği görüldü. Ancak erkek hastalardan elde edilen tedavi sonrası ortalama DNA hasarının da 120 dakikalık *in-vitro* inkübasyon esnasında anlamlı ölçüde azaldığı ve tedavi öncesindeki değere çok yaklaşmış olduğu söylenebilir (Şekil 3.5). İstatistiksel karşılaştırmada da anlamlılığın tam sınır seviyede, yani anlamlı olma ile anlamlı olmama arasında sınır bir değerde olduğu görüldü.

Tüm hasta gruplarında elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, ilk uygulanan HBO seansı sonrasında artan DNA hasarının DNA onarımına bağlı olarak zamanla azaldığı, *in-vitro* koşullarda iki saat içinde tekrar başlangıç seviyesine döndüğü anlaşılmaktadır. Erkek hastalarda da tedavi sonrasında oluşan DNA hasarının rölatif olarak başlangıçtaki seviyesine döndüğünü söylemek mümkündür (Şekil 3.3 ve Şekil 3.5).

#### 4. On seanslık HBOT'ne giren 5 hastada, 1. ve 5. seanslarda gözlenen DNA hasarları

On seanslık HBOT'ne giren 5 hastada 1. ve 5. seanslardaki tedavi öncesinde ve tedavi sonrasında gözlenen DNA hasarları karşılaştırıldı. Ancak hastalardan ardı ardına alınan numuneleri kabul edilebilir bir süre zarfında laboratuara ulaştırabilme konusundaki zorluklar ve GATA Deniz ve Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı'nın hasta kabulü esnasında uyguladığı prosedür (aynı HBO seansında, tedavilerinin farklı seansında olan hastaların aynı anda bulunabilmesi) bu aşamada çok sayıda hasta

kullanabilmemizi engelleyen en önemli problemleri oluşturdu. Bu nedenle bu aşamada 5 hasta ile çalışılabildi.

Daha önce yapılmış olan hücre kültürü testleri ve gönüllü sağlıklı bireylerdeki sonuçlar oksidatif DNA hasarının ilk HBO maruziyeti sonrasında oluştuğu ancak sonrasındaki maruziyetlerde oksidatif DNA hasarının oluşmadığı bildirilmiştir. Bu sonuç ilk HBO maruziyeti sonrasında gelişen adaptif cevaba bağlanmıştır (Rothfuss ve ark., 1998, Speit ve ark., 2000, Rothfuss ve ark., 2001, Speit ve ark., 2004, Li ve ark., 2007).

Bu tezde, hastalıkları nedeni ile HBOT'ne giren gerçek hastalarda da deneysel olarak gözlenen adaptif cevabın oluşup oluşmadığı araştırılmıştır.

On seanslık HBOT'ne giren 5 hastada 1. ve 5. seanslarda HBO uygulamasından önce ve sonra tespit edilen oksidatif DNA hasarları (her hasta kendi içinde olmak üzere) karşılaştırılmıştır (Şekil 3.12). Her hasta tek tek incelendiğinde;

- Tüm hastalarda ilk HBO seansı sonrasında oksidatif DNA hasarının maksimum seviyeye ulaştığı,
- 5. seansta HBO uygulamadan önce (tedavi öncesinde), ilk seansta oluşmuş olan DNA hasarının tamamen onarılmış ve istatistiksel olarak ( $p > 0.05$ , one-way, ANOVA) tedavi öncesindeki seviyesine inmiş olduğu,
- Ancak 5. seansta HBO uygulamasından sonra (tedavi sonrasında) oksidatif DNA hasarında bir artış olmadığı ve tedaviye

başlamadan öncesindeki seviyeden istatistiksel olarak ( $p>0.05$ , one-way, ANOVA) farklı olmadığı görüldü.

Tespit etmiş olduğumuz bu sonuçlar deneysel koşullarda gösterilmiş olan adaptif cevabın HBOT'ne giren gerçek hastalarda da oluştuğunu göstermektedir. HBOT'ne giren hastaların ilk seansı atlattıktan sonra girdikleri diğer seanslarda oluşan "adaptif cevap" nedeni ile oksidatif DNA hasarı oluşmamaktadır.

5. On seanslık HBOT'ne giren 5 hastada, 1. ve 5. seanslarda gözlenen DNA hasarlarının  $H_2O_2$  ile indüklenebilirliği

On seanslık HBOT'ne giren 5 hastada, 5. seans sonrasında HBO uygulamasına karşı gelişen adaptif cevabın, *in-vitro* koşullarda  $H_2O_2$  maruziyetine karşı da koruyucu olup olamayacağı araştırılmıştır.

Şekil 3.13'de görüldüğü gibi 1. ve 5. seanslarda tedavi öncesi ve sonrasında alınan örnekler *in-vitro* koşullarda  $50 \mu M H_2O_2$ 'e maruz bırakılmışlardır. Elde etmiş olduğumuz sonuçlara göre;

- 1. seansta tedavi öncesi ve sonrasında alınan numunelere uygulanmış olan  $50 \mu M H_2O_2$ , oksidatif DNA hasarını hem tedavi öncesinde hem sonrasında istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ , one-way, ANOVA) bir şekilde arttırmıştır.
- 5. seansta tedavi öncesi ve sonrasında alınan numunelere uygulanmış olan  $50 \mu M H_2O_2$ , oksidatif DNA hasarını hem tedavi öncesinde hem de sonrasında istatistiksel olarak anlamlı ( $p>0.05$ , one-way, ANOVA) bir şekilde arttırmadığı görülmüştür. Diğer bir deyişle istatistiksel olarak 5. seans öncesi ve sonrasında oluşan

oksidatif DNA hasarı, bu numunelerin *in-vitro* koşullarda 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 'e maruz bırakılmalarından sonra oluşan DNA hasarından farklı değildir.

Bu sonuçlar oluşan adaptif cevabın ekzojen maddelere karşı da koruyucu olabildiğini göstermektedir. Ayrıca bu koruyuculuğun *in-vitro* koşullarda da gözleniyor olması oluşan adaptif cevabın sistemik değil hücresel düzeyde oluştuğunu göstermektedir. Elde etmiş olduğumuz bu sonuçlar daha önce yapılan deneysel çalışma sonuçları ile uyum göstermektedir (Rothfuss ve ark., 1998, Speit ve ark., 2000, Chen ve ark., 2005, Li ve ark., 2007, Gröger ve ark., 2009).

#### 6. HBO maruziyetinin klastojenik etkilerinin olup olmadığının araştırılması

HBO maruziyetinin klastojenik bir etkisinin olup olmadığı "sitokinezi bloke edilmiş mikroçekirdek testi (CBMN)" ile tespit edildi. CBMN testi, kan numunelerinin GATA Deniz ve Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı'ndan laboratuvarımıza belli bir süre ve koşullarda getirilebilmesi konusunda yaşanan zorluklar nedeni ile 90 hastada gerçekleştirilebildi.

Çalışmamızda CBMN testi, HBOT'ne giren hastalardan 1. seans öncesi ve sonrasında alınan kan numunelerine uygulandı. Elde etmiş olduğumuz sonuçlara göre çiftçekirdekli hücrelerdeki mikroçekirdek (binucleated micronucleus, BNMN) sayısı HBO'e maruz kalan hastalarda, kalmayanlara göre yüksek bulunmuş ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür (Şekil 3.15).

HBOT'ne giren hastalarda BNMN seviyesinin girmeyenlere göre artmış olması, HBO maruziyetinin klastojenik etkisi olabileceğini göstermektedir.

Altı ana başlık altında özetlenmiş olan projemizden elde edilen sonuçlar ve bu konuda Dünya'da yapılmış diğer çalışmalar göz önüne alındığında aşağıda sıralamış olduğumuz sonuç değerlendirmeleri yapılabilir;

*a.* Tezimizde uygulamış olduğumuz “komet testi + fpg protein” kombinasyonu, HBOT uygulanan hastalarda 8-oksoguanin (oksidatif DNA hasarının) miktarının arttığını göstermektedir. Bu güne kadarki temel bilgilere göre 8-oksoguanin in promotajen olduğu ve GCA transversiyon mutasyonuna sebep olduğu bilinmektedir (Rothfuss ve ark., 2000). Ancak son yıllardaki çalışmalar 8-oksoguaninin promotajen olduğu ve nokta mutasyonuna neden olduğu ciddi şekilde sorgulanmaktadır. Pek çok kanser türünde GCA mutasyonunun özellikle *p53* ve *ras* genlerinde tespit edildiği gerçeğine karşılık son yıllardaki çalışmalar GC→TA nokta mutasyonunun sadece oksidatif stres sonucunda oluşan reaktif oksijen ürünlerinden oluşmadığını düşündürmektedir. Bu tip imza niteliğindeki nokta mutasyonları aynı zamanda başka kimyasal madde maruziyetleri veya replikasyon hatalarından da kaynaklanabilmektedir (Rothfuss ve ark., 2000). Yapılan çalışmalar reaktif oksijen ürünlerinin sebep olduğu 8-oksoguaninin (oksidatif DNA hasarı) nokta mutasyonuna sebep olmadan hızlı bir şekilde onarılabildiğini göstermektedir. Bizim yapmış olduğumuz çalışma da oluşan oksidatif hasarın hızla onarıldığını desteklemektedir.

*b.* HBO maruziyeti sonucunda oluşan 8-oksoguanin in hızla onarıldığı komet testi ile gösterilmiş olsa da komet testi hasarın doğru bir şekilde

onarıldığını gösteremez. Bu nedenle son yapılan çalışmalarda oluşan 8-oksoguaninin mutasyona sebep olup olmadığı *hpert* ve *fare lenfoma* testleri ile test edilmiştir. Son çalışmalarda HBO maruziyetine bağlı olarak V79 hücrelerinde yapılmış olan *hpert* testinde mutasyon tespit edilmemiştir. Dolayısıyla bu sonuç 8-oksoguaninin bir promutajen olmadığı ve nokta mutasyonuna sebep olmadığı görüşünü desteklemektedir. HBO maruziyeti sonrasında olası mutajenik etkiler *fare lenfoma* testi vasıtası ile de incelenmiştir. *Fare lenfoma* testindeki mutajenik etki küçük koloni mutantlarının artması şeklindedir ve bu sonuç makro seviyede genomik değişikliklerin olduğu, diğer bir deyişle mutajenik etkinin klastojenik mekanizmaya dayandığını göstermektedir (Rothfuss ve ark., 2000). Bu sonuç HBO maruziyetinin klastojenik etkili olduğunu desteklemektedir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da HBO'ye maruz kalmış hastalardaki BNMN sayısının HBO'ye maruz kalmayan hastalardan daha yüksek olduğu görülmektedir. Dolayısıyla bizim çalışmamızın sonuçları da fare lenfoma testi sonuçlarını desteklemektedir.

c. HBOT için başvuran hastalarda ilk HBO maruziyetinden sonra "adaptif cevap" geliştiği ve bu cevabın ikinci ve sonraki HBO maruziyetlerinde koruyucu olduğu ve buna bağlı olarak DNA hasarının gözlenmediği çalışmamızda tespit edilmiştir. Ayrıca oluşan bu adaptif cevabın *in-vitro* koşullarda uygulanan  $H_2O_2$  maruziyetine karşı da olduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar HBO maruziyeti sonrasında, kanda oksidatif stresin kontrolünde rol oynayan enzimler olan SOD, GPx ve CAT gibi enzimlerin ekspresyon seviyesinde artış olmadığı gösterilmiştir. Aynı şekilde HBO maruziyetine bağlı olarak apürinik endonükleaz (APE) ve Pol- $\beta$  gibi DNA onan enzimlerinin protein seviyelerinde artış olmadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Speit ve ark., 2000). Bütün bu bilgiler HBO maruziyeti sonrasında oluşan adaptif cevabın yukarıda sayılan mekanizmalardan



kaynaklanamayabileceğini göstermektedir. Son çalışmalar HBO maruziyetine bağlı olarak HO-1 proteininin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Speit ve ark., 2000, Rothfuss ve Speit, 2002, Li ve ark., 2007). HO-1, Hem'in biliverdine oksidatif degradasyonunda hız kısıtlayıcı basamağı katalizleyen bir proteindir. Bu esnada serbest demir ve CO açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan serbest demir ferritin şeklinde depolanır. Ferritin seviyesinin artmasına bağlı olarak fenton reaksiyonlarında yer alabilecek redoks-aktif demir sınırlanmış ve hidroksil radikalının oluşumu önlenmiş olur. Serbest demir miktarındaki artışın kısıtlanması, lenfositlerin oksidatif DNA hasarına karşı oluşturduğu adaptif cevabı kısmen açıklayabilir (Rothfuss ve Speit, 2002, Li ve ark., 2007). CO'nun biyolojik rolü tam olarak açıklanmış olmasa da, hiperoksik akciğer hasarında CO'in koruyucu etkileri olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Otterbein ve ark., 1999, Otterbein ve ark., 2000). Ayrıca oluşan biliverdin, biliverdin redüktaz ile bilirubine dönüşmektedir. Bilirubin in oldukça güçlü bir antioksidan olduğu bilinmektedir. Tüm bu bulgulara ilave olarak HO-1 bulunmayan farelerde yapılan çalışmalarda HBO maruziyetinin adaptif cevaba neden olmadığı gösterilmiştir (Poss ve ark., 1997). Yine son yapılan bir çalışmada lenfositler spesifik bir HO-1 inhibitörü olan kalay-mesoporfirin'e (SnMP) maruz bırakıldıktan sonra HBO'e maruz bırakılmışlardır. Ancak bu koşullarda yine adaptif cevabın oluşmadığı görülmüştür (Rothfuss ve ark., 2001). Son çalışmalardan elde edilmiş olan bu bilgiler HBO maruziyetine bağlı olarak oluşan "adaptif cevap"ın HO-1 ekspresyonunun artmasından kaynaklandığını göstermektedir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamızın sonuçları toplu halde incelendiğinde;

GATA Deniz ve Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı'nda HBO tedavisi gören hastalardan aldığımız kan lenfositlerinde yaptığımız komet testi sonuçlarına göre; tedaviye başlamadan önceki sonuçlarla kıyaslandığında, ilk tedavi seansı sonrasında DNA hasarının arttığı bulunmuştur. Fakat bu hasarın yaklaşık 2 saat içerisinde onarıldığı gösterilmiştir. Bu amaçla ilk tedavi seansı sonrası alınan örneklerimiz 2 saat boyunca inkübe edildikten sonra komet testi ile bakıldığında, DNA onarımına bağlı olarak DNA hasarının zamanla azaldığı, 2. saat sonunda tedavi öncesi kontrol değerine ulaştığı bulunmuştur.

Daha önce yapılan çalışmaların ışığında ilk tedavi seansından sonra oluşan bu hasarın tekrarlanan diğer seanslarda gözlenmediği, adaptif cevap oluşumuna bağlı olarak hücrede HBO'nun etkilerine karşı bir koruma oluştuğu düşünülmektedir. Bu amaçla, tezimizde HBO'nin 5. tedavi seansına giren hastalardan da kan örnekleri alarak lenfositlerdeki hasar incelendiğinde; 5. tedavi öncesi ve 5. tedavi sonrası değerlerin, HBO tedavisine başlamadan önceki kontrol değerlerle istatistiksel olarak bir farkı bulunmadığı gözlenmiştir.

Ayrıca oksidatif DNA hasarına neden olduğu bilinen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ilk tedavi seansı ve 5. tedavi seansı numunelerine *in-vitro* olarak uygulandı. İlk tedavi seansı önce ve sonrası numunelerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile DNA hasarı anlamlı derecede artarken, 5. tedavi öncesi ve 5. tedavi sonrası numunelerde bu artış düşmektedir. Hatta 2 saatlik bir

inkübasyonla DNA onarımına bakıldığında, bu değerler ilk tedavi öncesindeki değerlere ulaşmaktadır. Bu bakımdan HBO tedavisinin adaptif cevap gelişimine bağlı olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin genotoksik etkilerine karşı koruyucu olduğu söylenebilir.

Alkali komet testinde ufak değişiklikler yaparak fpg proteini ile birlikte uyguladığımızda, ilk tedavi seansı sonrasında oluşan DNA hasarının anlamlı derecede arttığını gözledik. Bu da HBO'nin neden olduğu oksidatif hasarın belirlenmesini sağlamaktadır. Dolayısıyla, hiperbarik oksijenin oksidatif DNA hasarına neden olduğu, özellikle HBOT esnasında oluşmuş olan 8-oksoguanin varlığına işaret ettiği sonucu çıkarılabilir.

GATA Deniz ve Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı'nda HBO tedavisi gören hastalardan aldığımız kan lenfositlerinde yaptığımız CBMN testi sonuçları da komet testi sonuçlarını desteklemektedir; ilk tedavi seansı sonrasındaki lenfositlerdeki BNMN sayıları tedaviye başlamadan önceki lenfositlerdeki BNMN sayılarından istatistiksel olarak yüksektir.

Sonuç olarak yapmış olduğumuz çalışmanın sonucunda;

HBOT'e giren hastalarda ilk seans sonrasında oksidatif DNA hasarının arttığı ancak sonraki seanslarda oksidatif DNA hasarının "adaptif cevap" nedeni ile oluşmadığı gözlenmiştir. HBO maruziyetine bağlı olarak ilk seans sonrasında oluşan DNA hasarının yaklaşık (*in-vitro* koşullarda) 2 saat içinde onarıldığı gözlenmiştir. Ancak deneysel çalışmalarda HBO maruziyetinin fare lenfoma testi sonuçlarına göre klastojenik olabileceği gösterilmiştir. Bizim çalışma sonuçlarımıza göre de HBO'e maruz kalan hastalarda BNMN sayıları HBO'e maruz kalmayan hastalara göre daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlara

göre uzun süreli HBOT'ne giren hastalar için fayda – zarar dengesinin göz ardı edilmeden tedaviye devam edilmesi yerinde olacaktır. Diğer taraftan HBO maruziyetine bağlı olarak meydana gelen DNA hasarı (kısa sürede onarılıyor olsa bile) HBOT'nin istenmeyen bir yan etkisi olarak düşünülmelidir. Bu nedenle DNA hasarının oluşumunun mümkün olduğunca engellenebilmesi bu tedavinin daha güvenilir olmasını sağlayacaktır. Bu konuda bundan sonra yapılacak çalışmaların bu yönde olmasının son derece faydalı olacağı açıktır.

Yapılan çalışmalarda bu amaçla hastalara antioksidan vitamin verilmesi bu hasarın giderilmesine yönelik ilk uygulamadır. Ancak bu uygulama tedavi esnasında yapılmakta ve istenilen sonucu vermemektedir. HBO uygulamasına başlamadan önce vitamin verilmesi uygulamaları daha çok hayvan deneylerinden oluşmaktadır. Bu nedenle ileriki çalışmalarda, HBO tedavisine başlamadan 1 hafta öncesinden hastaların vitamin kullandırmaları sağlanarak, ilk seansta meydana gelen DNA hasarından korunması sağlanabilir.

Bunun yanında, uygulanmakta olan HBO tedavisinin ilk seansının süresi normalden daha kısa tutularak (20-30 dakika) DNA hasarının azalıp azalmadığı tespit edilebilir. Böyle bir çalışma ile DNA hasarının ilk seansta azaldığı gözlenirse, HBO tedavisinin rutin protokolünde değişiklikler yapılabilir.

Bütün bunlara ilave olarak, HBO tedavisine giren hastalarda GPX ve MnSOD gibi antioksidan enzimleri kodlayan genlerdeki polimorfizmler araştırılabilir. Böylece bu enzimlerle ilgili olarak insanların farklı genetik yapıya sahip olmasının, HBO'nin oluşturduğu DNA hasarı üzerinde etkisinin olup olmadığı anlaşılabilir.

## ÖZET

### Hiperbarik Oksijen Tedavisinin (HBOT) Sebep Olduğu Genotoksik Etkilerin İncelenmesi

HBOT günümüzde pek çok farklı alanda uygulama alanı bulabilen modern bir tedavi yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Son yıllarda bu tedavi yöntemi ile ilgili olarak yapılan çalışmalar da artmaya başlamıştır. En çok üzerinde durulan konulardan biri de HBOT'nin sebep olduğu genotoksik etkilerdir. Tezimizin amacı HBOT uygulandıktan sonra oluşabilecek genotoksik hasarın genotoksisite testleri kullanılarak değerlendirilmesidir.

Tez çalışmamızda HBOT'ne giren hastalardan ilk seans öncesinde ve seans bitiminden hemen sonra alınan kan örneklerinde komet testi ve sitokinezi bloke edilmiş mikroçekirdek (CBMN) testi uygulanarak DNA hasarına bakılmıştır. Komet testi ve CBMN testi sonuçlarına göre, çalıştığımız bütün hastalarda HBOT'un ilk seansının DNA hasarını anlamlı derecede arttırdığı bulunmuştur.

Ayrıca tedavi sonrası numuneleri *in-vitro* inkübasyona bırakılarak DNA onarımına komet testi ile bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ilk tedavi seansı sonrasında gözlenen DNA hasarı, zamanla onarılmakta, 2 saat sonrasında başlangıçtaki değerlere ulaşmaktadır.

Fpg proteini ile birlikte komet testi uygulanarak HBO'nin neden olduğu oksidatif DNA hasarına bakılmış, elde edilen sonuçlara göre HBO'nin özellikle 8-oksoguanin seviyelerinde artışa neden olduğu bulunmuştur.

HBOT'nin ilerleyen seanslarındaki DNA hasarının durumunu değerlendirmek amacıyla HBOT'ne giren hastalardan tedaviye başlamadan ve tedaviden hemen sonra alınan örnekler dışında, bir grup hastada, 5. seans öncesi ve sonrasında da kan örneği alınmıştır. Bu örnekler H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile maruz bırakılıp, HBO'nin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> toksisitesine karşı koruyucu bir rolü olup olmadığı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ilk seans sonrasında artan DNA hasarı, 5. seans öncesi ve sonrasında gözlenmemiştir. Bu durumda, HBOT'nin tekrarlanan seanslarında adaptif cevap gelişimine bağlı olarak DNA hasarı oluşmadığı, ayrıca bu tedavinin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin genotoksik etkilerine karşı koruyucu bir etkisi olduğu söylenebilir.

**Anahtar Sözcükler:** DNA hasarı, genotoksisite, hiperbarik oksijen tedavisi, komet testi, sitokinezi bloke edilmiş mikroçekirdek testi.

## SUMMARY

### **Investigation of the Genotoxic Effect of Hyperbaric Oxygen Therapy (HBOT)**

Hyperbaric oxygen therapy (HBOT) is applied as a therapy for a wide variety of diseases. However; in recent studies, it has been shown to induce genotoxic effects. The aim of this study is to evaluate the possible genotoxic effects of HBOT with genotoxicity tests.

In this study, comet assay and CBMN assay were performed in lymphocytes prior to the first session of HBOT and immediately after the first session of HBOT. According to the results of the assays; increased DNA damage after the first session of HBOT was observed.

The combination of comet assay and fpg protein was also performed in this study. According to the results; 8-oxoguanine levels were induced by HBO treatment in lymphocytes.

To investigate the DNA damage, we performed the comet assay to a group of the patients prior to the 5<sup>th</sup> session of HBOT and immediately after the 5<sup>th</sup> session of HBOT. Furthermore, these samples exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in-vitro*. The results showed that; DNA damage was not detected neither before nor after the 5<sup>th</sup> session of HBOT. So, it can be concluded that; HBO treatment of human subjects leads to the induction of an adaptive response which protects blood cells against the induction of DNA damage by repetitive HBO or *in-vitro* treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Key Words:** DNA damage, genotoxicity, hyperbaric oxygen therapy, comet assay, cytokinesis-blocked micronucleus test.

## KAYNAKLAR

- AKTAŞ, Ş. (2000). Birinci basamak hekim gözüyle olası bir deprem felaketinde hiperbarik oksijen tedavisinin yeri. *İstanbul Tabip Odası Yayınları*, 111-136.
- ALBERTINI, R., ANDERSON, D., DOUGLAS, G.R., HAGMAR, L., HEMMINKI, K., MERLO, F., NATARAJAN, A.T., NORPPA, H., SCHUKER, E., TICE, R., WATERS, M.D., AITIO, A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat. Res.* **463**: 111-172.
- AY, H., SIMSEK, K. (2008). Hiperbarik oksijen tedavisi. *Türkiye Klinikleri J. Cardiovasc. Surg-Special Topics*.**1(3)**: 87-90.
- BARRETT, J. (1995). Role of mutagenesis and mitogenesis in carcinogenesis. In: Environmental Mutagenesis, Ed: D.H. Phillips, S. Venitt, BIOS Scientific Publishers, Oxford, p.: 21-32.
- BOADI, W.Y., THAIRE, L., KEREM, D., YANNAI, S. (1991). Effects of dietary factors on antioxidant enzymes in rats exposed to hyperbaric oxygen. *Vet. Hum. Toxicol.* **33(2)**: 105-109.
- BONASSI, S., FENECH, M., LANDO, C., LIN, Y.P., CEPPI, M., CHANG, W.P., HOLLAND, N., VOLDERS, M.K., ZEIGER, E., BAN, S., BARALE, R., BIGATTI, M.P., BOLOGNESI, C., CAO, J., GIORGIO, M.D., FERGUSON, L.R., FUCIC, A., LIMA, O.G., HRELIA, P., KRISHNAJA, A.P., LEE, T.K., MIGLIORE, L., MIKHALEVICH, L., MIRKOVA, E., MOESSO, P., MULLER, W.U., ODAGIRI, Y., SCARFI, M.R., SZABOVA, E., VOROBTSOVA, I., VRAL, A., ZIJNO, A. (2001). Human micronucleus project: International database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ. Mol. Mut.* **37**: 31-45.
- BOUACHOUR, G., CRONIER, P., GOUELLO, J.P., TOULEMONDLE, J.L., TALHA, A., ALQUIER, P. (1996). Hyperbaric oxygen therapy in the management of crush injuries: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *J. Trauma.* **41**: 333-339.
- CHEN, Z.H., YOSHIDA, Y., SAITO, Y., NIKI, E. (2005). Adaptation to hydrogen peroxide enhances PC12 cell tolerance against oxidative damage. *Neurosci. Lett.* **383**: 256-259.

- CHURCHILL, D.I., SANGER, C., THOMLINSON, R.H. (1955). High-pressure oxygen and radiotherapy. *Lancet*. **268**: 1091-1095.
- CLARK, J.F., SHARP, F.R. (2006). Bilirubin oxidation products (BOXes) and their role in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **26**: 1223-1233.
- COLLINS, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. *Mol. Biotechnol.* **26**: 249-261.
- COLLINS, A.R., DOBSON, V.L., DUSINSKA, M., KENNEDY, G., STETINA, R. (1997). The comet assay: what can really tell us?. *Mutat. Res.* **375**: 183-193.
- CORNING, J.L. (1891). The use of compressed air in conjunction with medicinal solutions in the treatment of nervous and mental affections, beings a new system of cerebrospinal therapeutics. *Med. Record.* **40**: 225.
- CROTEAU, D.L., BOHR, V.A. (1997). Repair of oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNA in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **272(41)**: 25409-25412.
- CUNNINGHAM, O.J. (1927). Oxygen theraph by means of compressed. *Air Anesth. Analg.* **6**: 64.
- DENNERY, P.A., SRIDHAR, K.J., LEE, C.S., WONG, H.E., SHOKOOHI, V., RODGERS, P.A., SPITZ, D.R. (1997). Heme oxygenase-mediated resistance to oxygen toxicity in hamster fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **272**: 14937-14442.
- DENNOG, C., GEDIK, C., WOOD, S., SPEIT, G. (1999). Analysis of oxidative DNA damage and HPRT mutations in humans after hyperbaric oxygen treatment. *Mutat. Res.* **431**: 351-359.
- DENNOG, C., HARTMANN, A., FREY, G., SPEIT, G. (1996). Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy. *Mutagenesis.* **11(6)**: 605-609.
- DENNOG, C., RADERMACHER, P., BARNETT, Y.A., SPEIT, G. (1999). Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen. *Mutat. Res.* **428**: 83-89.
- DOOLEY, J.W., MEHM, W.J. (1990). Noninvasive assessment of the vasoconstrictive effects of hyperoxygenation. *J. Hyperb. Med.* **4**: 177-187.



- DUTHIE, S.J., MA, A., ROSS, M.A., COLLINS, A.R. (1996). Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res.* **56**: 1291-1295.
- DUYDU, Y., USTUNDAG, A., AYDIN, A., EKEN, A., DUNDAR, K., UZUN, G. (2006). Increased sensitivity to mitomycin C-induced sister chromatid exchange in lymphocytes in vitro. *Environ. Mol. Mutagen.* **47(3)**: 185-191.
- EKEN, A., AYDIN, A., SAYAL, A., USTUNDAG, A., DU YDU, Y., DUNDAR, K. (2005). The effects of hyperbaric oxygen treatment on oxidative stress and SCE frequencies in humans. *Clin. Biochem.* **38(12)**: 1133-1137.
- FELDMEIER, J.J., HEIMBACH, R.D., DAVOLT, D.A., BRAKORA, M.J., SHEFFIELD, P.J., PORTER, A.T. (1994). Does hyperbaric oxygen have a cancer-causing or -promoting effect? A review of the pertinent literature. *Undersea Hyperb Med.* **21(4)**: 467-75.
- FENECH, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mut. Res.* **285**: 35-44.
- FENECH, M., CHANG, W.P, VOLDERS, M.K., HOLLAND, N., BONASSI, S., ZEIGER, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Genetic Toxicol. Environ. Mut.* **534**: 65-75.
- FENECH, M., HOLLAND, N., CHANG, W.P., ZEIGER, E., BONASSI, S. (1999). The Human MicroNucleus Project- An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mut. Res.* **428(1-2)**: 271-283.
- FENECH, M., MORLEY, A.A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mut. Res.* **147**: 29-36.
- FRIEDBERG, E.C. (2003). DNA Damage and Repair. *Nature.* **421**: 436-439.
- FONTAINE, J.A. (1879). Emploi chirurgical de l'air comprimé. *Union Med.* **28**: 445.
- GERMONPRE, P., REPER, P., VANDERKELEN, A. (1996). Hyperbaric oxygen therapy and piracetam decrease the early extension of deep partial-thickness burns. *Burns.* **22**: 468-473.
- GILL, A.L., BELL, C.N.A. (2004). Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *Q. J. Med.* **97**: 385-395.

- GILLE, J.J., JOENJE, H. (1992). Cell culture models for oxidative stress: superoxide and hydrogen peroxide versus normobaric hyperoxia. *Mutat. Res.* **275**: 405-414.
- GÖKBEN, M. (2001). Hiperbarik oksijen ve tedavideki yeri. *Anestezi Dergisi*, **9 (4)**: 237-251.
- GRÖGER, M, ÖTER, S., SIMKOVA, V., BOLTEN, M., KOCH, A., WARNINGHOFF, V., GEORGIEFF, M., MUTH, C.M., SPEIT, G., RADERMACHER, P. (2009). DNA damage after long-term repetitive hyperbaric oxygen exposure. *J. Appl. Physiol.* **106**: 311-315.
- GUSKOV, E.P., SHKURAT, T.P., SHIMNSKAJA, E.I., GUSKOVA, S.I. (1990). Genetic effects of hyperbaric oxygen therapy. *Mut. Res.* **241**: 341-347.
- HAGMAR, L., STROMBERG, U., TINNERBERG, H., MIKOCZY, Z. (2001). The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* **204**: 43-47.
- HALLIWELL, B., ARUOMA, O. (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* **281**: 9-19.
- HAMMARLUND, C., SUNDBERG, T. (1994). Hyperbaric oxygen reduced size of chronic leg ulcers: a randomized double-blind study. *Plast. Reconstr. Surg.* **93**: 829-833.
- HARABIN, A.L., BRISTED, J.C., FLYNN, E.T. (1990). Response of antioxidant enzymes to intermittent and continuous hyperbaric oxygen. *J. Appl. Physiol.* **69**: 328-335.
- HARTMANN, A., AGURELL, E., BEEVERS, C., BRENDLER-SCHWAAB, S., BURLINSON, B., CLAY, P., COLLINS, A., SMITH, A., SPEIT, G., THYBAUD, V., TICE, R.R. (2003). Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis.* **18(1)**: 45-51.
- HOLLAND, N.T., LEVINE, A.J., SMITH, M.T., QUINTANA, P.J.E., BOENIGER, M., HAYES, R., SURUDA, A., SCHULTE, P. (1996). Quantification of epithelial cell micronuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH) in mortuary science students exposed to formaldehyde. *Mut. Res.* **371**: 237-248.
- HOLLAND, N.T., MOORE, L.E., SMITH, M.T. (1994). Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mut. Res.* **312**: 39-50.

- JACOBSON, J.H. 2nd, MORSCH, J.H., RENDELL, B.L. (1965). Clinical experience and implications of hyperbaric oxygenation. The historical perspective of hyperbaric therapy. *Ann. NY Acad. Sci.* **117**: 651-670.
- JAIN, K.K. (1996). Physical, physiological and biochemical aspects of hyperbaric oxygenation. In: Textbook of Hyperbaric medicine, Ed: K.K. Jain, R. Neubauer, J.G. Correa, E.M. Camporesi, 2<sup>nd</sup> ed., Seattle-Toronto-Bern-Göttingen, Hogrefe: Huber publishers, p.: 11-26.
- JOENJE, H. (1989). Genetic toxicology of oxygen. *Mut. Res.* **219**: 193-208.
- KARAMAN, N., ÖZASLAN, C., HÜSEYİNOVA, S., ALTINOK, M. (2005). Mastektomi sonrası göğüs duvarını tutan gazlı gangren olgu sunumu. *Meme Sağlığı Dergisi.*, **1(1)**: 28-30.
- KIHARA, M., MCMANIS, P.G., SCHMELZER, J.D., KIHARA, Y., LOW, P.A. (1995). Experimental ischemic neuropathy: salvage with hyperbaric oxygenation. *Ann. Neurol.* **37**: 89-94.
- LI, Q., LI, J., ZHANG, L., WANG, B., XIONG, L. (2007). Preconditioning with hyperbaric oxygen induces tolerance against oxidative injury via increased expression of heme oxygenase-1 in primary cultured spinal cord neurons. *Life Sci.* **80**: 1087-1093.
- MADHUSUDAN, S., MIDDLETON, M.R. (2005). The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. *Cancer Treat. Rev.* **31**: 603-617.
- MCART, D.G., MCKERR, G., HOWARD, C.V., SAETZLER, K., WASSON, G.R. (2009). Modelling the comet assay. *Biochem. Soc. Trans.* **37**: 914-917.
- MOLDEUS P. (1994). N-acetylcysteine. *Methods Enzymol.* **234**: 482-492.
- MOLLER, P. (2005). Genotoxicity of environmental agents by the alkaline comet assay. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **1**: 1-42.
- O'REILLY, M.A. (2001). DNA damage and cell cycle checkpoints in hyperoxic lung injury: breaking to facilitate repair. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **281**: 291-305.
- OKUR, I., SERDAROGLU, A., OKUR, A., BUYAN, N., DÜNDAR, K., ARGAN, M., OZDEMIR, B., GUCUYENER, K. (2005). Karbonmonoksit zehirlenmesinde hiperbarik oksijen tedavisi: İki olgu sunumu. *Türkiye Klinikleri J. Pediatr* **14**: 220-222.

- OSTLING, O., JOHANSON, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biophys. Res. Commun.* **123**: 291-298.
- OTTERBEIN, L., BACH, F., ALAM, J., SOARES, M., LU, H., WYSK, M., DAVIS, R., FLAVELL, R., CHOI, A.M. (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat. Med.* **6**: 422-428.
- OTTERBEIN, L., MANTELL, L., CHOI, A.M. (1999). Carbon monoxide provides protection against hyperbaric lung injury. *Am. J. Physiol.* **276**: 688-694.
- ÖZTUNA, V., GÜLDEN, E., COŞKUN, B., KAYA, A., ÇOLAK, M., KUYURTAR, F. (2002). Farelerde oluşturulan osteomyelit modellerinde yabancı cisim uygulamasının lokal ve sistemik infeksiyon bulguları üzerine etkileri. *Artroplastik Artroskopik Cerrahi Dergisi*, **13(2)**: 94-98.
- PASTOR, S., CREUS, A., PARRON, T., CEBULSKA-WASILEWSKA, A., SIFFEL, C., PIPERAKIS, S., MARCOS, R. (2003). Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides: use of micronuclei as biomarkers. *Mutagenesis*. **18(3)**: 249-258.
- POSS, K.D., TONEGAWA, S. (1997). Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**: 10925-10930.
- QUINLAN, T., SPIVACK, S., MOSSMAN, B.T. (1994). Regulation of antioxidant enzymes in lung after oxidant injury. *Environ. Health Perspect.* **102(2)**: 79-87.
- REALI, D., MARINO, F.D., BAHRAMANDPOUR, S., CARDUCCI, A., BARALE, R., LOPRIENO, N. (1987). Micronuclei in exfoliated urothelial cells and urine mutagenicity in smokers. *Mut. Res.* **192**: 143-149.
- ROTHFUSS, A., DENNOG, C., SPEIT, G. (1998). Adaptive protection against the induction of oxidative DNA damage after hyperbaric oxygen treatment. *Carcinogenesis*. **19(11)**: 1913-1917.
- ROTHFUSS, A., MERK, O., RADERMACHER, P., SPEIT, G. (2000). Evaluation of hyperbaric oxygen (HBO) in vitro II. Induction of oxidative DNA damage and mutations in the Mouse lymphoma assay. *Mut. Res.* **471**: 87-94.

- ROTHFUSS, A., RADERMACHER, P., SPEIT, G. (2001). Involvement of heme oxygenase-1 (HO-1) in the adaptive protection of human lymphocytes after hyperbaric oxygen (HBO) treatment. *Carcinogenesis*. **22(12)**: 1979-1985.
- ROTHFUSS, A., SPEIT, G. (2002a). Investigations on the mechanism of hyperbaric oxygen (HBO)-induced adaptive protection against oxidative stress. *Mut. Res.* **508**: 157-165.
- ROTHFUSS, A., SPEIT, G. (2002b). Overexpression of heme oxygenase-1 (HO-1) in V79 cells results in increased resistance to hyperbaric oxygen (HBO)-induced DNA damage. *Environ. Mol. Mutagen.* **40(4)**: 258-265.
- ROTHFUSS, A., STAHL, W., RADERMACHER, P., SPEIT, G. (1999). Evaluation of mutagenic effects of hyperbaric oxygen (HBO) in vitro. *Environ. Mol. Mutagen.* **34**: 291-296.
- RYDBERG, B., JOHANSON, J.J. (1978). Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: DNA repair mechanisms, Ed: P.C. Hanawalt, E.C. Friedberg, C.F. Fox, Academic Press, New York, p.: 465-468.
- SARTO, F., TOMANIN, R., GIACOMELLI, L., CANOVA, A., RAIMONDI, F., GHIOTTO, C., FIORENTINO, M.V. (1990). Evaluation of chromosomal aberrations in lymphocytes and micronuclei in lymphocytes, oral mucosa and hair root cells of patients under antineoplastic therapy. *Mut. Res.* **228**: 157-169.
- SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R., SCHNEIDER, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* **175**: 184-191.
- SPEIT, G., BONZHEIM, I. (2003). Genotoxic and protective effects of hyperbaric oxygen in A549 lung cells. *Mutagenesis*. **18(6)**: 545-548.
- SPEIT, G., DENNOG, C., EICHHORN, U., ROTHFUSS, A., KAINA, B. (2000). Induction of heme oxygenase-1 and adaptive protection against the induction of DNA damage after hyperbaric oxygen treatment. *Carcinogenesis*. **21(10)**: 1795-1799.
- SPEIT, G., DENNOG, C., LAMPL, L. (1998). Biological significance of DNA damage induced by hyperbaric oxygen. *Mutagenesis*. **13(1)**: 85-87.

- SPEIT, G., DENNOG, C., RADERMACHER, P., ROTHFUSS, A. (2002). Genotoxicity of hyperbaric oxygen. *Mut. Res.* **512**: 111-119.
- SPEIT, G., HARTMANN, A. (1999). The comet assay (single-cell gel test). In: *Methods in molecular biology, DNA repair protocols*, Ed: D.S. Henderson, Humana Press, Totawa, 113, p.: 203-212.
- SPEIT, G., SCHUTZ, P., BONZHEIM, I., TRENZ, K., HOFFMANN, H. (2004a). Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol. Lett.* **146**: 151-158.
- SPEIT, G., SCHUTZ, P., HOFFMANN, H. (2004b). Enhancement of genotoxic effects in the comet assay with human blood samples by aphidicolin. *Toxicol. Lett.* **153(3)**: 303-310.
- TCHOU, J., BODEPUDI, V., SHIBUTANI, S., ANTOSCHECHKIN, I., MILLER, J., GROLLMAN, A.P., JOHNSON, F. (1994). Substrate specificity of fpg protein. *J. Biol. Chem.* **269(21)**: 15318-15324.
- TCHOU, J., GROLLMAN, A.P. (1995). The catalytic mechanism of fpg protein. *J.Biol.Chem.* **270(19)**: 11671-11677.
- TIBBLES, P.M., PERROTTA, P.L. (1994). Treatment of carbon monoxide poisoning: A critical review of human outcome studies comparing normobaric oxygen with hyperbaric oxygen. *Ann. Emerg. Med.* **24**: 269-276.
- TICE, R.R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J.C., SASAKI, Y.F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* **35**: 206-221.
- TOLBERT, P.E., SHY, C.M., ALLEN, J.W. (1992). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mut. Res.* **271**: 69-77.
- TOMPACH, P.C., LEW, D., STOLL, J.L. (1997). Cell response to hyperbaric oxygen treatment. *Int. J. Oral Maxillofac Surg.* **26**: 82-86.
- TOPAL, T., KORKMAZ, A. (2008). Hiperbarik oksijen tedavisi. *Türkiye Klinikleri J. Med. Sci.* **28**: 206-216.
- TUCKER, J.D., PRESTON, R.J. (1996). Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mut. Res.* **365**: 147-159.

- VOLDERS, M.K. (1997). Towards a validation of the micronucleus test. *Mut. Res.* **392**: 1-4.
- VOLDERS, M.K., SOFUNI, T., AARDEMA, M., ALBERTINI, S., EASTMOND, D., FENECH, M., ISHIDATE, M., KIRCHNER, S., LORGE, E., MORITA, T., NORPPA, H., SURRALLES, J., VANHAUWAERT, A., WAKATA, A. (2003). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mut. Res.* **540(2)**:153-63.
- WAISMAN, D., SHUPAK, A., WEISZ, G., MELAMED, Y. (1998). Hyperbaric oxygen therapy in the pediatric patient: The experience of the Israel Naval Medical Institute. *Pediatrics.* **102**: 53.
- WEAVER, L.K., HOPKINS, R.O., CHAN, K.J., CHURCHILL, S., ELLIOT, C.G., CLEMMER, T.P., ORME, J.F., THOMAS, F.O., MORRIS, A.H. (2002). Hyperbaric oxygen for acute carbon monoxide poisoning. *N. Engl. J. Med.* **347**: 1057-1067.
- WISEMAN, H., HALLIWELL, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J.* **313**: 17-29.
- YAMADA, T., TAGUCHI, T., HIRATA, Y., SUITA, S., YAGI, H. (1995). The protective effect of hyperbaric oxygenation on the small intestine in ischemia-reperfusion injury. *J. Pediatr. Surg.* **30**: 786-790.
- ZAMBONI, W.A., BROWN, R.E., ROTH, A.C., MARTHUR, A., STEPHENSON, L.L. (1995). Functional evaluation of peripheral-nerve repair and the effect of hyperbaric oxygen. *J. Reconstr. Microsurg.* **11**: 27-29.
- ZAMBONI, W.A., WONG, H.P., STEPHENSON, L.L., PFEIFER, M.A. (1997). Evaluation of hyperbaric oxygen for diabetic wounds: a prospective study. *Undersea Hyperb. Med.* **24**: 175-179.

## **ÖZGEÇMİŞ**

### **I- Bireysel Bilgiler**

Adı-Soyadı: Aylin Üstündağ  
Doğum yeri ve tarihi: Giresun - 1977  
Uyruğu: T.C  
Medeni durumu: Evli

### **II- Eğitimi**

Giresun Hamdi Bozbağ Anadolu Lisesi, 1996  
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 2000  
Yabancı Dili: İngilizce, Almanca

### **III- Ünvanları**

Uzman Eczacı- Araştırma Görevlisi

### **IV- Bilimsel İlgi Alanları**

*Kongreler:*

- 1.** Dur A., Duydu Y., Süzen H.S. Increased percentage of high frequency cells (HFC's) in lead exposed storage battery manufacturing workers, 7<sup>th</sup> International Symposium On Pharmaceutical Sciences (ISOPS-7), 24-27, Haziran, 2003, Ankara.
- 2.** Dur A.,Duydu Y., Süzen H.S. The percentage of high frequency cells (HFC's) in sister chromatid exchange (SCE) / cell distribution; A study on HFC's in lead exposed workers, 5<sup>th</sup> International Congress of Turkish Society of Toxicology, 30.10-02-11, 2003, Antalya.
- 3.** Ustundag A., Duydu Y. "The Influence Of Delta-Aminolevulinic Acid On Lead Genotoxicity And The Effects Of Antioxidants Such As Melatonin And N-Acetylcysteine" Ustundag A., Duydu Y. 11th Meeting on RDPA, 25-30 Eylül, 2005, Rimini, İtalya.
- 4.** Eken A., Aydın A., Sayal A., Ustundağ A., Duydu Y., Dündar K. Effects of Hyperbaric Oxygen Treatment on Oxidative Stres and Genotoxicity in Humans. Is It a Risk Factor for Genotoxicity?, 42<sup>nd</sup> Congress of Toxicology, EUROTOX 2005, 11-14 Eylül, 2005, Cracow, Polonya.



- 5.** Duydu Y., Ustundağ A., Eken A., Aydın A., Sayal A., Dündar K. DNA Damage In Patients Undergoing Hyperbaric Oxygen Therapy 8<sup>th</sup> International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 13-16 Haziran, 2006, Ankara.
- 6.** Ustundag A., Duydu Y. Evaluation of Excision Repairable DNA Lesions Induced by Lead and/or ALA in Human Lymphocytes by Using ARA-C/CBMN Assay 8<sup>th</sup> International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 13-16 Haziran, 2006, Ankara .
- 7.** Duydu Y., Ustundağ A., Eken A., Aydın A., Sayal A., Dündar K. SCE Frequencies In Patients Undergoing Hyperbaric Oxygen Theraphy, 6<sup>th</sup> International Congress of Turkish Society of Toxicology, 2-5 Kasım, 2006, Antalya.
- 8.** Ustundag A., Duydu Y. Lead and ALA Induced Excision Repairable DNA Lesions in Human Lymphocytes *in-vitro*, 6<sup>th</sup> International Congress of Turkish Society of Toxicology, 2-5 Kasım, 2006, Antalya.
- 9.** Duydu Y., Ustundağ A., Aydın A., Eken A., Dündar K., Uzun G. Mitomycin C Induced Sister Chromatid Exchange Frequencies In Hyperbaric Oxygen Exposed Patients, EUROTOX 2006/6 CTDC Congress, 20-24 Eylül, 2006, Cavtat, Hırvatistan.
- 10.** Ustundag A., Duydu Y. Induction of Excision Repairable DNA Lesions by Lead and/or ALA? A Study By Using ARA-C/CBMN Test Method, EUROTOX 2006/6 CTDC Congress, 20-24 Eylül, 2006, Cavtat, Hırvatistan.
- 11.** Ustundag A., Duydu Y. The Protective Effects Of Antioxiğants In  $\delta$ -Ala And Lead Induced Genotoxicity”, The 5th International Congress on Environmental Mutagens In Human Populations, 20-24 Mayıs, 2007, Antalya.
- 12.** Korkmaz M., Uçkun Z., Dur A., Çebi A., Duydu Y., Bor Maruziyetinin İnsanlar Üzerindeki Genotoksik Etkilerinin Araştırılması, X. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 6-9 Eylül, 2007, Antalya.
- 13.** Duydu Y., Dur A., Süzen H.S. Lymphocytes With Unusually High Sister Chromatid Exchange Counts As A Cytogenetic Biomarker For Lead Exposure, 37. Annual Meeting EEMS, 9-13 Eylül, 2007, Basel, İsviçre.

**14.** Ustundağ A., Duydu Y., Eken A., Aydın A., Sayal A., Dündar K. Evaluation of the potential genotoxic effects of hyperbaric oxygen therapy, 45<sup>th</sup> Congress of The European Societies of Toxicology, 5-8 Ekim, 2008, Rhodes, Yunanistan.

**15.** Ustundağ A., Duydu Y., Aydın A., Eken A., Dündar K., Uzun G. Hiperbarik oksijen tedavisi gören hastalarda mitomisin-C ile indüklenmiş kardeş kromatid değişimi sıklığındaki artışın araştırılması, 7. Uluslararası Katılımlı Türk Toksikoloji Derneği Kongresi, 30 Mayıs-1 Haziran, 2009, Ankara.

**16.** Ustundağ A., Duydu Y., Investigation of lead and/or ALA induced excision repairable DNA lesions *in-vitro*, 9th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, 23-26 Haziran, 2009, Ankara.

**17.** Duydu Y., Uçkun Z., Üstündag A., Ündeğer Ü., Aydın S., Korkmaz M., Başaran N. Assessment Of Genotoxicity In Environmentally Boron Exposure By Using Alkaline Comet And CBMN Assay, 10. International Conference On Environmental Mutagens, 39. Annual Meeting Of The EEMS, 18. Annual Meeting Of The Italian Environmental Mutagen Society, 20-25 Ağustos, 2009, Floransa, İtalya.

**18.** Duydu Y., Aydın S., Üstündag A., Ündeğer Ü., Düker Y., Başaran N. Evaluation Of FISH, LH, Total Testosterone And PSA Levels In Highly Boron Exposed Workers In Turkey, 46. Congress Of The European Societies Of Toxicology, 13-16 Eylül, 2009, Dresden, Almanya.

#### *Yayınlar:*

**1.** Duydu Y, Dur A, Suzen HS. Evaluation of increased proportion of cells with unusually high sister chromatid exchange counts as a cytogenetic biomarker for lead exposure. Biol Trace Elem Res. 2005 May;104(2):121-9.

**2.** Eken A, Aydın A, Sayal A, Ustundag A, Duydu Y, Dunder K. "The effects of hyperbaric oxygen treatment on oxidative stress and SCE frequencies in humans." Clin Biochem. 2005 Dec;38(12):1133-7.

**3.** Duydu Y, Ustundag A, Aydın A, Eken A, Dunder K, Uzun G."Increased sensitivity to mitomycin C-induced sister chromatid exchange in lymphocytes from patients undergoing hyperbaric oxygen therapy" Environ Mol Mutagen. 2006 Apr;47(3):185-91.

4. Ustundag A., Duydu Y, “The Influence of Melatonin and N-Acetylcysteine In  $\delta$ -Aminolevulinic Acid and Lead Induced Genotoxicity In Lymphocytes *in-vitro*”, Biol. Trace Elem. Res, 2007, 117 (1-3): 53-64.
5. Ulker OC, Ustundag A, Duydu Y, Yucesoy B, Karakaya A. Cytogenetic monitoring of coal workers and patients with coal workers' pneumoconiosis in Turkey. Environ Mol Mutagen. 2008 Apr;49(3):232-7.
6. Ustundag A, Duydu Y. Induction of Excision Repairable DNA Lesions in Lymphocytes Exposed to Lead and ALA In Vitro. Biol Trace Elem Res. 2009 April; 128(1): 31-37.

#### **V- Bilimsel Etkinlikleri**

##### *Kurslar:*

1. “Oksidatif Stres, DNA Hasarı ve Onarımı” konulu Prof. Dr. Miral Dizdaroğlu tarafından verilen kurs, 14 – 17 Mayıs 2007, İzmir.
2. Türk Toksikoloji Derneğinin Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde düzenlediği “COMET tekniği kursu”nda kurs eğitmeni, 4-5 Mayıs 2010, Ankara.

##### *Tez ve seminerler:*


1. “Kurşun Genotoksisitesinde Delta-Aminolevülinik Asitin Etkisi” konulu yüksek lisans tezi, Temmuz, 2004.
2. “Hiperbarik Oksijen Tedavisi Esnasında Gözlenen Oksidatif DNA Hasarının Önemi” konulu doktora 1. Semineri, 2006.
3. “İnorganik Kurşun Maruziyetinin Kanserojenik Potansiyelinin Değerlendirilmesi” konulu doktora 2. Semineri, 2006.

**T.C.**  
**GENELKURMAY BAŞKANLIĞI**  
**GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ KOMUTANLIĞI**  
**ETİK KURUL TOPLANTI RAPORU**

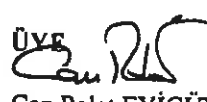
OTURUM NO : 83  
OTURUM TARİHİ : 26 Aralık 2006  
OTURUM BAŞKANI : Prof. Tbp. Kd. Alb. M. Erdal GÜZELDEMİR  
OTURUM SEKRETERİ : Doç. Dr. Ecz. Kd. Alb. Adnan ATAÇ

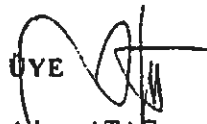
GATA Etik Kurulu'nun 26 Aralık 2006 günü yapılan 83. oturumunda, GATA Farmasötik Toksikoloji AD'dan Doç. Dr. Ecz. Alb. Ahmet Aydın'ın sorumlu araştırmacılığını yaptığı "Oksidatif DNA Hasarının Oluşumunda ve Onarımında GPX, MnSOD ve OGG1 Polimorfizminin Rolü ve Önemi" başlıklı, çok merkezli, genetik polimorfizm ve oksidatif DNA hasarı ile ilgili çalışma olan araştırma dosyası değerlendirildi.


Araştırma dosyasının amaç, yöntem ve yaklaşım bakımından etik ilkelere UYGUN olduğuna karar verildi.


BAŐKAN   
M. Erdal GÜZELDEMİR  
Prof.Tbp.Kd.Alb.


ÜYE   
İsmail ARSLAN  
Prof.Tbp.Kd.Alb.


ÜYE   
Can Polat EYİGÜN  
Prof.Hv.Tbp.Kd.Alb.


ÜYE   
Adnan ATAÇ  
Doç.Dr.Ecz.Kd.Alb.

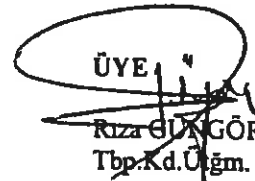
ÜYE   
Ömer AZAL  
Doç.Hv.Tbp.Kd.Alb.

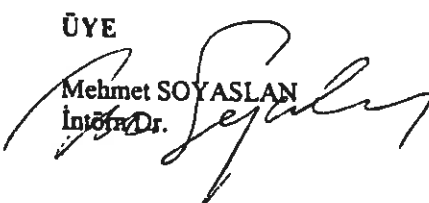
ÜYE   
Şeref KÖMÜRCÜ  
Doç.Tbp.Kd.Alb.

ÜYE   
Mükerrrem SAFALI  
Doç.Tbp.Kd.Alb.

ÜYE   
Muharrem UÇAR  
Yrd.Doç.J.Tbp.Yb.

ÜYE   
Huriye VURAL  
Dr.Sağ.Yb.

ÜYE   
Rıza GÜNGÖR  
Tbp.Kd.Üğm.

ÜYE   
Mehmet SOYASLAN  
İntörn/Dr.

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÖNETİM KURULU KARARI

Toplantı Sayısı : 15	Karar Sayısı : 538	Toplantı Tarihi : 03.05.2007
----------------------	--------------------	------------------------------

Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 09.02.2007 tarih ve 782 sayılı yazısı görüşüldü.

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı doktora programı öğrencisi Aylin ÜSTÜNDAĞ'ın tez projesinin, "Hiperbarik Oksijen Tedavisinin (HBOT) Sebep Olduğu Genotoksik Etkilerin İncelenmesi" olarak kabulüne oybirliği ile karar verildi.

ASLI GİBİDİR  
Erdoğan ALBAYRAK  
Enstitü Sekreteri

Enstitü Müdürü  
Prof.Dr. Sulhiye YILDIZ  
İmza

Üye  
Prof.Dr. Müjgan İZGÜR  
İmza

Üye  
Prof.Dr. Gülriz ERSÖZ  
İmza