

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RADYASYONA DİRENÇLİ
DEINOCOCCUS RADIODURANS İLE *ESCHERICHIA COLI*'DE
RADYASYONUN ANTIOKSIDAN SİSTEM ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

ELİF ÖZBEY

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MALATYA
MAYIS 2009**

Onur Sözü

Yüksek Lisans olarak sunduğum "**Radyasyona Dirençli *Deinococcus radiodurans* Bakterisi ile *Escherichia coli*' de Radyasyonun Antioksidan Sistem Üzerine Etkisinin Araştırılması**" başlıklı bu çalışmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın tarafımdan yazıldığını ve yararlandığım bütün kaynakların, hem metin içinde hem de kaynakça yöntemine uygun biçimde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir, bunu onurumla doğrularım.

Elif ÖZBEY

Herşeyim aileme ve tüm sevgimle Umudum'a;

Tezin Başlığı: Radyasyona Dirençli *Deinococcus radiodurans* ile *Escherichia coli* 'de Radyasyonun Antioksidan Sistem Üzerine Etkisinin Araştırılması.

Tezi Hazırlayan: Elif ÖZBEY

Sınav Tarihi: 11.06.2009

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri:

Prof. Dr. Murat ÖZMEN

Prof. Dr. Özfer YEŐİLADA

Doç. Dr. Dilek ASMA

Prof. Dr. İsmail ÖZDEMİR

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

RADYASYONA DİRENÇLİ
DEINOCOCCUS RADIODURANS İLE *ESCHERİCHİA COLI* DE
RADYASYONUN ANTIOKSİDAN SİSTEM ÜZERİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Elif ÖZBEY

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

90 + xii sayfa

2009

Danışman: Doç. Dr. Dilek ASMA

Yeryüzündeki canlılığın nerde başlayıp nerde bittiğini kestirmek zordur. Çünkü canlıların yaşam sınırları oldukça çeşitlilik göstermektedir. Okyanusun dibinde, yerin altında, karanlıkta, basınçlı ortamda, yüksek veya düşük sıcaklıkta, yüksek iyonize radyasyonlu ortamlarda yaşayabilen canlılar vardır. Son 30-35 yıldır insanların ekstrem olarak adlandırdığı böyle ortamlarda yaşayan birçok mikroorganizma çeşidi keşfedilmiştir. Bu mikroorganizmalara ekstrem koşullarda yaşayabildiklerinden dolayı ekstremofiller adı verilmektedir. Keşfedilen bu mikroorganizmalardan özellikle biri olağanüstü yetenekleri ve görünen sonsuz potansiyeli ile büyük oranda dikkat çekmektedir. Bu mikroorganizma *Deinococcus radiodurans*'dır. *D. radiodurans*, genotoksik kimyasallara, oksidatif zararlara, yüksek seviyede iyonikleşmeye, ultraviyole radyasyona ve dehidrasyona karşı ekstrem dayanıklılık gösterir ve bu özelliklerinden dolayı da poliektremofil olarak adlandırılmıştır. Son yıllarda önem kazanan genetik mühendislikle ilgili çalışmaların yanı sıra, biyoremediasyonla ilgili

çalışmalar ve ciddi evre problemlerine neden olan ağır metallerin ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ile ilgili yoğun araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Ancak UV'nin indüklediği reaktif oksijen turleri, bunların etkileri ve bunlara karşı hucresel savunma mekanizmaları ve reaktif oksijen turlerinin temizlenmesinden sorumlu antioksidan sistemleri hakkında yeterince araştırma yapılmamıştır.

Bu amaçla; *Escherichia coli* ve radyasyona dirençli *Deinococcus radiodurans* bakterilerinde radyasyonun, antioksidan enzim ve GSH seviyeleri uzerine etkileri test edilip, karşılaştırılmıştır. Her iki bakteriye farklı dozda γ radyasyon uygulamaları yapıldıktan sonra enzim aktiviteleri ve GSH seviyeleri tayin edilmiştir. Çalışmamızın sonunda farklı dozda γ radyasyon uygulamalarına bağlı olarak *D. radiodurans*'ın uzellikle superoksit dismutaz ve katalaz enzimlerinde yuksek aktivite guzlenirken, *E. coli*'nin enzim ve GSH seviyelerinin radyasyondan oldukça etkilendiğini ve doz artışına bağlı olarak enzim ve GSH seviyelerinde azalmalar olduğu saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELELER: *Deinococcus radiodurans*, radyasyon, oksidatif stres katalaz, glutatyon reduktaz, superoksit dismutaz, glutatyon S- transferaz.

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION
OF THE EFFECT OF RADIATION ON ANTIOXIDANT
SYSTEM OF *ESCHERICHIA COLI* AND RADIATION RESISTANT
DEINOCOCCUS RADIODURANS

Elif ÖZBEY

Inönü University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

90 + xii pages

2009

Supervisor: Doç. Dr. Dilek ASMA

It is difficult to determine the limits of the vitality because the living creatures exhibit a great deal of variations. There are organisms living in the very depth of ocean, under the earth, in the dark, pressurized media, in high or low temperatures and in high radiation environment. In last 30-35 years, it has been discovered that many organisms can live in environments considered as extreme for mankind. Since these microorganisms can live in the extreme environments, they are named as extremophiles. One of the recently-discovered microorganisms, *Deinococcus radiodurans*, had drawn attention for its extraordinary capabilities and its potential of infinity. *D. radiodurans* is resistant that genotoxic chemicals, oxidative damage, high-level ionization, ultraviolet radiation and dehydration. Because of these features is also name as polyextremophile. In recent years, studies on bioremediation and related to heavy metal and detoxification of xenobiotics which cause serious environment problems, as well as genetic engineering, have been intense. However, the reactive oxygen species, induces of UV

and their effects, their cellular defense mechanisms against ROS and about antioxidative systems responsible for cleaning of reactive oxygen species enough research has not been made.

To this end; in *Escherichia coli* and radiation-resistant *D. radiodurans* bacteria were compared and tested effects on levels GSH and antioxidant system of radiation. In both bacteria, enzyme activity and GSH levels has been determined after the different doses of γ radiation applications. In the end of our study, high activities in enzyme especially superoxide dismutase and catalase of *D. radiodurans* were observed depending on the different doses γ radiation applications. Moreover, it was determined that enzyme and GSH levels were decreased in *E. coli* depending on the radiation levels.

KEYWORDS: *Deinococcus radiodurans*, radiation, oxidative stress, catalase, glutathione reductase, superoxide dismutase, glutathione S- transferase.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmamda benden her türlü yardım, öneri ve desteğini esirgemedi beni yönlendiren, çalışmamın her aşamasında pratik ve teorik bilgilerinden faydalandığım danışman hocam sayın Doç. Dr. Dilek ASMA'ya;

Tez çalışmamda her türlü imkanlarından faydalandığım Turgut Özal Tıp Merkezi Radyasyon Onkolojisi Servisi'ne, sayın Doç. Dr. Meltem SERİN'e ve Öğrt. Grv. Süreyya NUR'a;

Arş. Grv. Dr. Gülçin BEKER ve Arş. Grv. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ'ye;

Bu araştırmanın yürütülmesinde bütün bölüm imkânlarından faydalanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığı'na;

2008-02 no'lu proje ile bu araştırmayı destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne;

Ayrıca tüm hayatım boyunca olduğu gibi Yüksek Lisans çalışmalarım süresince de benden desteklerini esirgemeyen değerli aileme ve sevgili Umudum'a;

tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Çevre ve Çevre Kirliliği.....	1
1.2. Radyasyon ve Radyoaktif Atıklar.....	2
1.2.1. Radyasyon.....	2
1.2.1.1. Radyasyonun Sınıflandırılması.....	3
1.2.1.2. Radyasyon Birimleri.....	4
1.2.2. Radyoaktif Atıklar.....	5
1.3. Radyasyon ve Oksidatif Stres.....	6
1.4. Serbest Oksijen Radikalleri.....	8
1.4.1. Süperoksit Radikal (O_2^-).....	9
1.4.2. Hidroksil Radikali ($\bullet OH$).....	10
1.4.3. 1.1.1 Hidrojen peroksit (H_2O_2).....	11
1.4.4. Singlet Oksijen (1O_2).....	12
1.5. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı.....	13
1.5.1. Endojen Kaynaklar.....	13
1.5.2. Eksojen Kaynaklar.....	15
1.6. 1.2 Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri.....	16
1.6.1. 1.3 Serbest Radikallerin Lipitlere Etkileri.....	17
1.6.2. 1.4 Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri.....	19
1.6.3. 1.5 Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere Etkileri.....	19
1.6.4. 1.6 Serbest radikallerin Karbohidratlara Etkileri.....	20
1.7. Antioksidan Enzim Sistemi.....	20
1.7.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	22
1.7.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD, Superoxide Oxidoreductase : EC 1.15.1.1).....	22
1.7.1.2. 1.6.1 Katalaz (CAT, H_2O_2 Oxidoreductase : E.C.1.11.1.6).....	22
1.7.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px: Glutathione: H_2O_2 Oxidoreductase, EC 1.11.1.9).....	23
1.7.1.4. Glutasyon Redüktaz (GSH-R: EC 1.6.4.2).....	24

1.7.1.5.	Glutasyon-S-Transferaz (GST, EC 2.5.1.18).....	25
1.7.2.	Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	26
1.7.2.1.	Glutasyon (GSH γ -L-glutamyl-L-sisteini-glisin).....	26
1.8.	Ekstremofiller.....	27
1.8.1.	Ekstremofillerin Sınıflandırılması.....	28
1.8.2.	Poliekstremofil.....	29
1.8.2.1.	<i>Deinococcus radiodurans</i>	30
1.8.2.1.1.	Genel Karakteristikleri.....	30
1.8.2.1.2.	Filogenisi ve Habitat.....	32
1.8.2.1.3.	<i>Deinococcus radiodurans</i> 'ın Genetiği.....	33
1.8.2.1.4.	<i>D.radiodurans</i> 'ın DNA Zararına Ekstrem Direnci.....	35
1.8.2.1.5.	Radyasyona Direnç Fenotipinin Evrimi.....	35
2.	KAYNAK ÖZETLERİ.....	40
2.1	Çevre Biyoteknolojisi için Radyasyona Dirençli Bakterinin Mühendisliği.....	40
2.2.	<i>Deinococcus radiodurans</i> ve Antioksidan Enzim Sistemi Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	43
2.3.	<i>Deinococcus radiodurans</i> 'ın Direnç Mekanizması ile ilgili Çalışmalar.....	45
3.	MATERYAL VE YÖNTEM.....	47
3.1.	Araştırmada Kullanılan Mikroorganizmalar.....	47
3.2.	Araştırmada Kullanılan Besiyerleri.....	48
3.3	Araştırmada Kullanılan Kimyasallar.....	49
3.4.	Bakteri Stoklarının Hazırlanması.....	49
3.5.	Bakteri Üreme Eğrilerinin Çıkarılması.....	49
3.6.	Canlı Hücre Sayımının Yapılması.....	50
3.7.	Bakterilerin Radyasyona Maruz Bırakılması.....	50
3.8.	Bakterilerin Uygulama Sonrası Alınması, Homojenizasyonu, Sonifikasyonu ve Santrifügasyonu.....	53
3.9.	Örneklerin Elde Edilmesi ve Saklanması.....	55
3.10.	Enzim Aktivite Tayini.....	55
3.10.1.	Katalaz Aktivitesinin Ölçümü.....	56
3.10.2.	Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü.....	56
3.10.3.	Glutasyon -S- Transferaz Aktivitesinin Ölçümü.....	57
3.10.4.	3.2.1.1. Glutasyon Redüktaz Aktivitesinin Ölçümü.....	58
3.10.5.	3.2.1.2. Total Glutasyon (GSH) Miktar Tayini.....	59
3.11.	Total Protein Tayini.....	59
3.12.	İstatistik Analizler.....	60
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	61
4.1.	3.2.1.3. Bakterilerin Üreme Eğrilerinin Çıkarılması.....	61
4.2.	Radyasyona Maruz Bırakılan <i>Deinococcus radiodurans</i> ve <i>Escherichia coli</i> Bakterilerinde Antioksidan Enzimlerin Aktiviteleri ve Glutasyon Mikrandaki Değişimler.....	62
4.2.1	3.2.1.4. Katalaz Aktivitesi.....	62
4.2.2.	Süperoksit Dismutaz Aktivitesi.....	64
4.2.3.	Glutasyon Redüktaz Enzim Aktivitesi.....	66
4.2.4.	Glutasyon-S-Transferaz Aktivitesi.....	68
4.3.	Total Glutasyon (GSH).....	70
4.2.5.	Radyasyon Sonrası Bakterilerin Canlı Hücre Sayıları.....	72

5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	74
6.	KAYNAKLAR.....	80
7.	ÖZGEÇMİŞ.....	90

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Radyasyonun Sınıflandırılması.....	3
Şekil 1.2	Radyasyon Tipleri.....	4
Şekil 1.3.	Oksidatif Stres.....	6
Şekil 1.4.	DNA' da oksidatif hasar ve olası sonuçları	7
Şekil 1.5.	Serbest Oksijen Radikalleri.....	9
Şekil 1.6.	OH radikali oluşturan reaksiyonlar a) Fenton reaksiyonu b) Haber-Weiss reaksiyonu	11
Şekil 1.7.	Singlet oksijen tipleri.....	12
Şekil 1.8.	Mitokondride Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu	14
Şekil 1.9.	Solunumsal Patlama ile Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu.....	15
Şekil 1.10.	Eksojen Kaynaklı Serbest Oksijen Radikallerinin Oluşumu.....	16
Şekil 1.11.	Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri.....	16
Şekil 1.12.	Lipit Radikali.....	17
Şekil 1.13.	Lipit Peroksidasyonu.....	18
Şekil 1.14.	Malondialdehit.....	18
Şekil 1.15.	Glutasyon Redüktaz (GR).....	25
Şekil 1.16.	Glutasyonun Açık Formülü.....	27
Şekil 1.17.	<i>Deinococcus radiodurans</i>	31
Şekil 1.18.	<i>Deinococcus radiodurans</i> 'ın Hücre Duvar Yapısı.....	32
Şekil 1.19.	<i>Deinococcus</i> Cinsine Ait Diğer Türler ve <i>Thermus</i> ile İlişkisi.....	33
Şekil 1.20.	<i>Deinococcus radiodurans</i> 'ın 415 kb'lık Kromozom Haritası.....	34
Şekil 3.1.	a) <i>Escherichia coli</i> b) <i>Deinococcus radiodurans</i>	47
Şekil 3.2.	Radyasyon Uygulamasında Kullanılan Kobalt-60 Cihazı.....	51
Şekil 3.3.	Örneklerin Hazırlanması ve Radyasyon Uygulaması için Cihaza Uygun Kaba Yerleştirilmesi.....	52
Şekil 3.4.	Örneklerin Cihaza Yerleştirilmesi ve Co Kaynaklı γ Radyasyon Uygulanması.....	53
Şekil 3.5.	Örneklerin Radyasyon Uygulaması Sonrası Alınması, Homojenizasyonu, Sonifikasyonu ve Santrifügasyonu.....	53-55
Şekil 4.1.	<i>Deinococcus radiodurans</i> ile <i>Escherichia coli</i> Bakteri Kültürlerinin Zamana Bağlı Olarak Absorbans Değerlerinin Grafiği.....	61
Şekil 4.2.	<i>Deinococcus radiodurans</i> ile <i>Escherichia coli</i> bakterilerinin seri sulandırma sonucu canlı hücre sayıları.....	61
Şekil 4.3.	Radyasyon Uygulanan <i>Deinococcus raddiodurans</i> ve <i>Ecsheria coli</i> Bakterilerinde Radyasyon dozuna bağlı olarak Katalaz Enzim Aktivitesi.....	63
Şekil 4.4.	Radyasyon Uygulanan <i>Deinococcus radiodurans</i> ve <i>Ecsheria coli</i> bakterilerinde Radyasyon Dozuna Bağlı Olarak Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi.....	65
Şekil 4.5.	Radyasyon Uygulanan <i>Deinococcus radiodurans</i> ve <i>Ecsheria coli</i> Bakterilerinde Radyasyon Dozuna bağlı Olarak Glutasyon Redüktaz Enzim Aktivitesi.....	67
Şekil 4.6.	Radyasyon Uygulanan <i>Deinococcus radiodurans</i> ve <i>Ecsheria coli</i> Bakterilerinde Radyasyon Dozuna bağlı Olarak Glutasyon-S-Transferaz Enzim Aktivitesi.....	69
Şekil 4.7.	Radyasyon Uygulanan <i>Deinococcus radiodurans</i> ve <i>Ecsheria coli</i> Bakterilerinde Radyasyon Dozuna Bağlı Olarak Total Glutasyon (GSH)	

Şekil 4.8.	Enzim Aktivitesi.....	71
	Radyasyon Uygulanan <i>Deinococcus radiodurans</i> ve <i>Ecsheria coli</i>	
	Bakterilerinde Radyasyon Sonrası Canlı Kalma %'leri.....	73

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	<i>E.coli</i> ve <i>D. radiodurans</i> 'da oluşan Çift Zincir Kırıkları.....	8
Çizelge 1.2.	Reaktif Oksijen Türlerinin Endojen Kaynaklı Oluşum Mekanizmaları.....	13
Çizelge 1.3.	Ekstrem Çevrelerin Sınıflandırılması.....	28
Çizelge 1.4.	Ekstremofillerin Sınıflandırılması.....	29
Çizelge 1.5.	<i>Deinococcus radiodurans</i> 'ın Genom Boyutunun ve % G+C Oranının Diğer Türlerle İlişkisi.....	34
Çizelge 1.6.	<i>D. radiodurans</i> 'ın DNA Tamirinde Rol Oynayan Proteinler.....	37
Çizelge 3.1.	Lauria-Broth (LB) Besiyerinin İçeriği (g L ⁻¹).....	48
Çizelge 3.2.	TGY Broth Besiyerinin İçeriği (g L ⁻¹).....	48
Çizelge 3.3.	Bakterilere Uygulanan Doz Miktarları ve Uygulama Süreleri.....	52
Çizelge 4.1.	Farklı Konsantrasyonlarda Radyasyon Uygulanan <i>Deinococcus radiodurans</i> ve <i>Escherichia coli</i> 'de Katalaz (CAT) Aktivitesinin Doza Bağlı Olarak İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	63
Çizelge 4.2.	Farklı Konsantrasyonlarda Radyasyon Uygulanan <i>Deinococcus radiodurans</i> ve <i>Escherichia coli</i> 'de Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Doza Bağlı Olarak İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	65
Çizelge 4.3.	Farklı Konsantrasyonlarda Radyasyon Uygulanan <i>Deinococcus radiodurans</i> ve <i>Escherichia coli</i> 'de Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesinin Doza Bağlı Olarak İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	67
Çizelge 4.4.	Farklı Konsantrasyonlarda Radyasyon Uygulanan <i>Deinococcus radiodurans</i> ve <i>Escherichia coli</i> 'de Glutasyon-S-Transferaz Aktivitesinin Doza Bağlı Olarak İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	69
Çizelge 4.5.	Farklı Konsantrasyonlarda Radyasyon Uygulanan <i>Deinococcus radiodurans</i> ve <i>Escherichia coli</i> 'de Total Glutasyon (GSH) Aktivitesinin Doza Bağlı Olarak İstatistiksel Değerlendirilmesi.....	71
Çizelge 4.6.	<i>Deinococcus radiodurans</i> ve <i>Escherichia coli</i> Bakterilerinde Radyasyon Uygulaması Sonrasında Canlı Kalan Hücre Yüzdeleri.....	72

SİMGELER VE KISALTMALAR

Konsantrasyon Birimleri:

Molar(Mol/litre)	M
Milimolar	mM
Mikromolar	μ M

Sıcaklık Birimleri:

Celcius derece	$^{\circ}$ C
----------------	--------------

Kütle Birimleri:

Gram	g
Mikrogram	μ g
Dalton	Da

Hacim Birimleri:

Litre	L
Mililitre	ml
Mikrolitre	μ l

Radyasyon Birimleri:

Gray(Joule/kg)	Gy
Kilo Gray	kGy
Rad	Rad
A (Işınlanan Işın Alanı)	cm^2
SSD (Source-Skin-Distance)	cm
d = Derinlik	cm

Fiziksel ve Kimyasal Miktarlar:

Optik Dansite	OD
---------------	----

Çeşitli Birimler

Hidrojen İyon Konsantrasyonunun eksi logaritması	pH
--	----

Diğer Standart Kısaltmalar ve Semboller:

Glutatyon	GSH
Glutatyon redüktaz	GSH-R
GlutatyonS-transferaz	GST

Reaktif Oksijen Türleri	ROT
Süperoksit dismutaz	SOD
Katalaz	CAT
Glutasyon peroksidaz	GSH-Px
Lipid hidroperoksitler	ROOH
Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂
Süperoksit radikali	O ₂ ⁻
Hidroksil radikali	•OH
Reaktif oksijen türleri	ROT
Okside Glutasyon	GSSG
1-choloro,2-4 dinitro benzen	CDNB
5-5'-ditiyobis (2- nitrobenzoik asit)	DTNB
Etilendiamin tetra asetik asit	EDTA

1.GİRİŞ

1.1 Çevre ve Çevre Kirliliği

Doğa, kendi içinde kontroller ve dengelerle dolu olan, aynı zamanda tüm parçaları karmaşık detayları içerisinde barındıran bir ekosistemdir. İnsan yaşamı çeşitli dengeler üzerine kurulmuştur. Bu denge insanlığın tarihi boyunca çeşitli etkileşimlerin sonucunda oluşmuştur [1].

İnsan, var olduğu günden beri doğada üstünlük kurmaya yönelik arayışlar içine girmiş, bilim ve teknik imkanların yaygın bir şekilde kullanımı ile birlikte doğa sınırsızca kullanılmıştır. Bunun sonucu olarak içinde yaşadığı çevre ile arasında var olması gereken uyumu bozmuştur. Uzun yıllar doğa üzerinde yapmış olduğu tahribi umursamayan insanoğlu, XIX. yüzyılda çevre ile olan ilişkilerinde birçok sorunla karşı karşıya kaldıktan sonra geleceğini güvence altına alabilmek için doğa ile uyum içinde yaşamaya mecbur olduğunu anlamıştır. Çevrenin canlı yaşamını etkileyecek şekilde bozulması bir anda ortaya çıkmamış, zaman içinde birikerek ortaya çıkmıştır. Çünkü doğanın kendini yenileme yeteneği uzun bir süre olumsuz şartları düzeltmiş, ancak kirlilik düzeyinin yenilenme yeteneğinin üzerine çıkması ile çevre bozulmaya başlamıştır. Hava, su ve toprağın kirlenmesi ile birlikte kirlilik unsurları besin zinciri ile çeşitli düzeylerde bitki ve hayvan topluluklarına taşınmış ve onların yaşamlarını tehdit eder bir hal almıştır. Hızlı nüfus artışı, kırsal alandan kentlere göçün artışı ve sanayileşme, kirlenmenin yaygınlaşması ve artmasına neden olmuştur. Diğer taraftan doğal kaynakların sınırlı oluşu ve bunların bir kısmının kirlilik ile önemli ölçüde bozulmuş olması beraberinde artan nüfusun sağlıklı ve yeterli beslenememesi sorununu gündeme getirmiştir [1]. İnsanın çevresiyle oluşturduğu doğal dengeyi meydana getiren zincirin halkalarında meydana gelen bu kopmalar, zincirin tümünü etkileyip, bu dengenin bozulmasına sebep olmakta ve çevre sorunlarını oluşturmaktadır [2].

Çevreye atılan ve geri kazanılmayan her madde kirletici bir unsur olarak tanımlanmakla birlikte insan aktivitesinin de bu kirlilik üzerinde oldukça etkili olduğu bilinen bir gerçektir. Antropojenik kaynakların sayısında meydana gelen artışa paralel olarak kirleticilerin de ekosistem üzerindeki zararlı etkileri giderek artmaktadır [3].

Çeşitli karbon türevleri, kükürt dioksit, asit yağmurlarından kaynaklanan atmosfer kirliliği, kanalizasyon suları ve endüstriyel atık sular gibi arıtılmamış

sulardan, radyoaktif atıklara kadar geniş bir dağılım gösteren atık ürünler, genellikle insan yaşamı üzerinde ciddi problemlere neden olmaktadır. Bu atıkların elden çıkarılması, uzak alanlara bir kuyu kazılarak atık materyalin bu kuyunun içine boşaltılması ve sonra üstünün kapatılması şeklinde yapılmaktadır. Son zamanlarda bu yöntemin uygulandığı alanların insanların yaşamlarını devam ettirdiği alanlara yakın olması sebebiyle toksik materyallerin su kaynaklarına sızmaya başladığı belirlenmiş ve bu da birçok problemi beraberinde getirmiştir [4].

1.2. Radyasyon ve Radyoaktif Atıklar

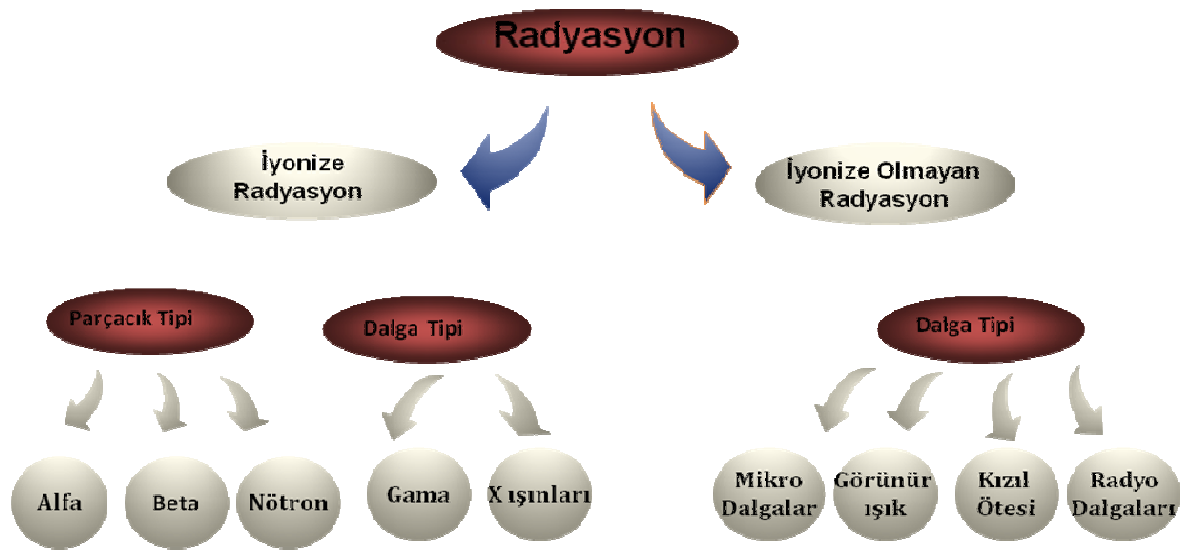
1.2.1. Radyasyon

Radyasyon, dünyamızın gelecekteki olası enerji açığını kapatacak, yiyecek üretimimize, bulunması zor değerli minerallerin yeniden işlenip kullanılabilir hale getirilmesine, hastalıkların teşhis ve tedavisine, endüstriyel birçok alandaki faaliyetlere ve yaşam standartlarımızın iyileştirilmesine katkıda bulunan ve daha da büyük ölçülerde bulunacak olan büyük bir enerji kaynağı olmakla birlikte, yaşadığımız çevreyi kirleten, insanların kanser olup ölmesine veya mutasyona uğramış çocuk doğumlarına neden olabilen zararlı bir güçtür. Aslında radyasyon; günlük hayatımızın hemen her alanında gerek doğal yollardan gerekse teknolojik gelişmelerin getirdiği kolaylıkların bir bedeli olarak farkında olmadan birlikte yaşadığımız bir olgudur. 19. yüzyılın sonlarına doğru X ışınları ve radyoaktivitenin keşfiyle birlikte tıbbi ve endüstriyel alanlardaki kullanımının günümüze kadar giderek artan bir hızla yaygınlaşması radyasyonu yaşantımızın ayrılmaz bir parçası haline getirmiştir [5]

Radyasyon bir geçiş enerjisidir. Hem parçacık (örneğin proton, nötron, elektron, alfa parçacıkları) hem de elektronik dalga (örneğin gama ışınları, X ışınları, ultraviyole radyasyon, görünür ışık, kızıl ötesi, mikrodalgalar) şeklinde olabilmektedir. Yer yüzünde çok nadir alanlarda görülebilen radyasyonun olağan üstü seviyeleri ekstremofil statüsünde değerlendirilmektedir. Fakat UV ve iyonize radyasyonun bu yoğun seviyeleri tıp alanında ve enerji üretiminde, savaş ve uzay yolculuklarındaki önemlerinden dolayı oldukça iyi çalışılmıştır [6].

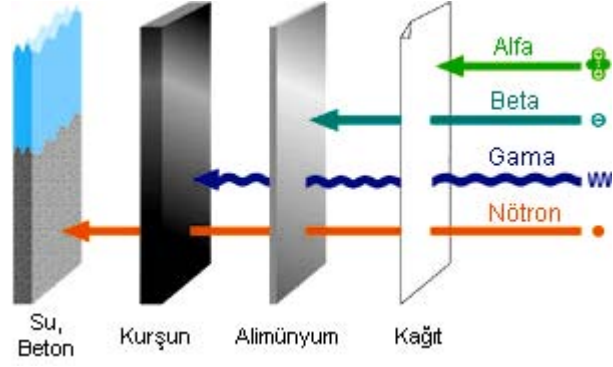
1.2.1.1. Radyasyonun Sınıflandırılması

Radyasyon, iyonize ve iyonize olmayan radyasyon olmak üzere esas olarak iki kısımda incelenmektedir. İyonize radyasyon, parçacık olarak adlandırılan belli bir kütle ve enerjiye sahip çok hızlı hareket eden parçacıklarla (alfa, beta ve nötron), belli bir enerjiye sahip ancak kütsüz olan dalga tipi radyasyondan (gama ve X ışınları) oluşmaktadır. İyonize olmayan radyasyonun ise sadece dalga tipi bulunmaktadır (mikro dalgalar, görünür ışık, kızıl ötesi, radyo dalgaları) [7] (Şekil 1.2.1.1.1).



Şekil 1.2.1.1.1. Radyasyonun Sınıflandırılması [8].

Alfa radyasyon, (+) yüklü parçacıklardan oluşur ve bir kağıt parçası tarafından kolayca durdurulabilmektedir. Beta radyasyon, elektronlardan oluşur ve ince bir alüminyum levha bu elektronları durdurmak için yeterli olmaktadır. Gama radyasyon ise ışık hızında hareket eden enerji dalgalarından oluşmaktadır (Şekil 1.2.1.1.2).



Şekil 1.2.1.1.2. Radyasyon Tipleri [8].

Özellikle iyonize radyasyon yüksek reaktiviteye sahip serbest radikallerin oluşmasına neden olmaktadır. Bu serbest radikaller ortaklanmamış elektronlara sahip olmalarından dolayı radyasyona bağlı hücre ölümlerinde en önemli hedef olan DNA ve hücredeki diğer biyomoleküllerle reaksiyona girmektedir.

1.2.1.2. Radyasyon Birimleri

Radyasyon dozunu, içine girdiği maddenin birim kütlesi başına transfer ettiği enerji miktarı belirlemektedir. Standart radyasyon dozu “Gray” (Gy)’ dir. Bir Gray maddenin 1kg ‘ına 1 joule ‘lük enerji transferini ifade etmektedir ve 100 cGy veya eski birimde 100 Rad’a eşittir [7].

$$1 \text{ Rad} = 0.01 \text{ Gy}$$

$$1 \text{ Gy} = 100 \text{ Rad}$$

$$1 \text{ Gy} = 100 \text{ cGy}$$

1.2.2. Radyoaktif Atıklar

Radyoaktif atıklar tıp, endüstri, araştırma gibi farklı uygulama alanlarında değişik aktivite, fiziksel ve kimyasal süreçler sonucu ortaya çıkmaktadır. Radyoaktif atıklar değişik ölçütler çerçevesinde sınıflandırılmaktadır. Nükleer materyallerin araştırma, geliştirme ve üretimi nükleer atıkları da beraberinde getirmiştir. Son 50 yıldır nükleer enerjiyi kullanan Amerika başta olmak üzere bir çok ülke, uygulanacak atık yönetiminin gerektirdiği özelliklere bağlı olarak değişik atık sınıflandırma sistemi geliştirmiştir. Atıklar sınıflarının gerektirdiği şekilde işlenmekte ve bertaraf edilmektedir [9].

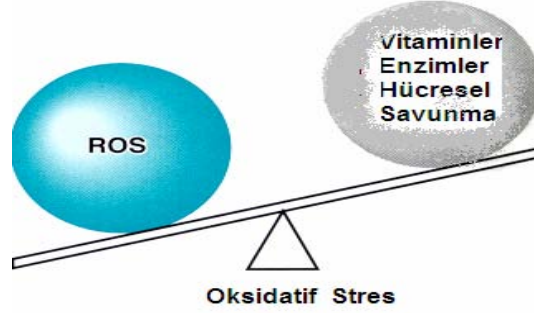
Radyoaktif atıkların çevre ve insan sağlığını etkilememesi, insanların ve çevrenin en etkin şekilde korunması amacı ile bütün dünyada çalışmalar sürdürülmektedir. Bu amaçla, radyoaktif atıklar ve atık nihai bertaraf tesislerinin envanterleri, gelecek nesillerin de açık şekilde bilgilendirilmesi ve atık kayıtlarına kolaylıkla ulaşmalarını sağlayacak koşullarda düzenlenmekte ve saklanmaktadır.

Atık alanlardaki en önemli kontaminantlar toprak da ve yer altı sularında; ²³⁵Uranyum (γ, α), ²³⁸Plutonyum(α), ⁹⁹Teknetiyum (β), ⁹⁰Strontiyum(β) ve ¹³⁷Sezyum (γ, β) gibi radyoaktif çekirdekler, krom, kurşun civa gibi metaller ile toluen ve trikloroetilen gibi organik bileşiklerden oluşmaktadır [10].

Radyoaktif atıkların uzun süreli depolanması amacıyla yapılan tesislerdeki yaklaşım, radyoaktif atıkların konsantre edilmesi ve matris olarak tanımlanan beton, asfalt ve cam gibi kapalı ortamlarda saklanarak kara parçalarında yüzeysel olarak veya deniz diplerine gömülmesi şeklinde olmaktadır. Radyoaktif atıklar içerisindeki radyonüklitlerin yarı ömrüne ve diğer özelliklerine bağlı olarak değişik sürelerde depolanmaktadır. Bu tür atıkların aktiviteleri azalınca kadar depolama işlemi sürdürülmektedir. Böyle alanlardaki yüksek radyasyon seviyeleri uzun vadede canlı organizmalar üzerinde oldukça zarar vericidir ve sıklıkla hücre ölümleriyle sonuçlanmaktadır. Bu atık alanların temizlenmesi için kullanılan yöntemler oldukça maliyetlidir. Bundan dolayı bu alanlar metalik ve organik kirleticileri uzaklaştırabilen özel mikroorganizmaları kullanan biyoremediasyon teknolojisi için potansiyel birer hedef olmaktadır [11]. Günümüzde radyoaktif atık yiyen bakteri olarak bilinen *Deionococcus radiodurans* 'ın keşfi aynı zamanda bu radyoaktif atıkların temizlenmesinde normal depolama işlemlerine alternatif olarak düşünülmektedir.

1.3. Radyasyon ve Oksidatif Stres

Hücrede oluşan reaktif oksijen türleri (ROT), "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinen mekanizmalarla ortadan kaldırılmaktadır. Hücresel antioksidan düzeyinin, reaktif oksijen düzeylerine karşı yetersiz kalması sonucu toksik bir etkinin başlaması olayına oksidatif stres denilmektedir [12] (Şekil 1.3.1). Bu durum ya antioksidan savunmaların yetersizliği, ya reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi, ya da her ikisinden dolayı olmaktadır. ROT'in üretimindeki artış veya antioksidan savunmanın azalmasından dolayı her iki sistemin dengesizliği oksidatif strese yol açmaktadır [13].



Şekil 1.3.1. Oksidatif Stres [12]

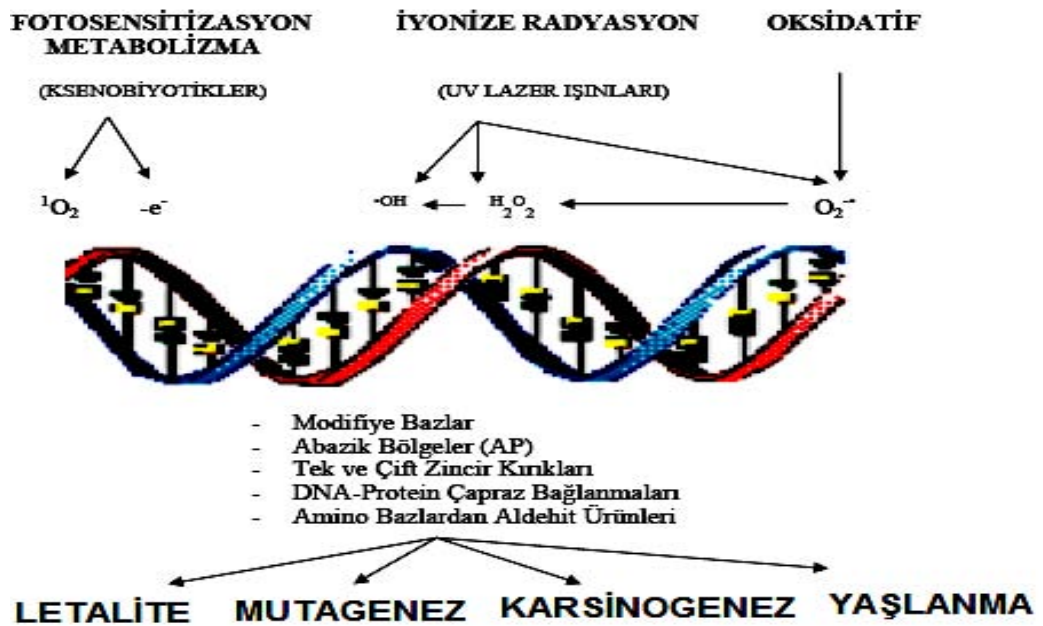
Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak reaktif oksijen türleri (ROT) meydana gelmektedir. Başta mitokondriyal elektron transportu olmak üzere, ksenobiyotik metabolizması, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonları, iyonize radyasyon, UV ışığı gibi birçok yolla ROT oluşmakta ve oksidan/antioksidan dengenin oksidanlar lehine kayması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile biyomoleküllere hasar vermektedir [14].

Hücre içinde DNA da lipidler, karbohidratlar ve proteinler gibi spontan oksidatif hasara uğrayabilmektedir. İnsan vücudunun her hücresinde DNA'nın günde 103 kez oksidatif hasara maruz kaldığı öne sürülmektedir. DNA hasarı ve onarımı arasındaki denge nedeniyle, çok düşük düzeylerde hasar, sağlıklı bireylerde de saptanmaktadır. Yeni doğan sıçanlarda dahi oksidatif baz modifikasyonunun (8OHdG) olduğu gösterilmiştir. ROT oluşumundaki artma, antioksidan enzim düzeylerindeki

azalma ve/veya DNA onarım mekanizmalarındaki bozukluklar oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır [15].

DNA, radyasyona bağlı hücre ölümlerinde en önemli hedefdir. Radyasyon hücre içine girdiğinde bu ortamda en sık karşılaştığı molekül olan sudan elektron alarak yüksek reaktivitedeki serbest radikallerin oluşmasına neden olmaktadır. Ömürleri mikro saniyelerle sınırlı olan serbest radikaller çiftlenmemiş elektronları yüzünden en yakınlarında bulunan diğer radikal veya moleküllerle birleşip hidrojen peroksit gibi toksik moleküller oluşturmaktadırlar [16].

İyonize ve UV radyasyonun neden olduğu oksidatif hasara bağlı olarak DNA'da, tek ve çift zincir kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir veya DNA ile protein arasında çapraz bağlanma olmaktadır (Şekil 1.3.2, Çizelge 1.3). Bu lezyonlardan bazıları fizyolojik koşullarda da oluşabilmektedir. Oksidatif modifikasyon sonucunda DNA antijenik karakter kazanmakta ve anti DNA antikorları oluşmaktadır [17]. İyonize radyasyonun etkilerinin çoğu, hidrojen peroksit ve reaktif oksijen türlerini artırdığı için radyasyonun toksisitesinde önemli rol oynamaktadır. Bazı indirgeyici moleküller, normal hücresel solunum ile süperoksit radikallerini, hidrojen peroksiti ve hidroksil radikalini üretebildikleri gibi iyonize radyasyon ile de bu radikallerin oluşumu sağlanmaktadır [18].



Şekil 1.3.2. DNA' da oksidatif hasar ve olası sonuçları.

Çizelge 1.3. *E.coli* ve *D. radiodurans*'da oluşan çift zincir kırıkları.

Türler	Her Hücredeki Genom Sayısı	D ₃₇ 'de Gelen Çift Zincir Kırıkları	Meydana Çıktı	Lezyonlar Arasındaki Ortalama Mesafe
<i>Escherichia coli</i> K12	4-5	8-9		530.000 bp
<i>Deinococcus radiodurans</i>	8-10	275		10.000 bp

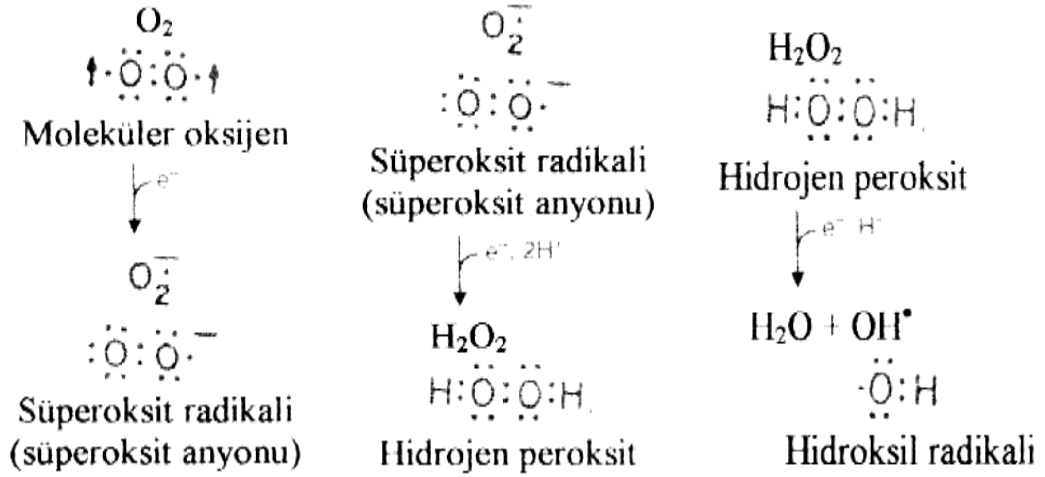
1.4. Serbest Oksijen Radikalleri

Yeryüzü üzerinde moleküler oksijen (O₂) yaklaşık iki milyar yıl önce fotosentetik mikroorganizmaların suyu parçalama kabiliyetleri sonucu ortaya çıkmıştır. Oksijen şimdiki biyosferimizin en bol bulunan elementidir [13].

Hemen hemen bütün canlıların ortak özelliklerinden biri onların oksijen (O₂) kullanmalarıdır. Oldukça küçük bir anaerobik bakteri grubu hariç organizmaların çoğu için oksijen hayati bir önem taşımaktadır. Birinci olarak, organizmaların enerjilerinin (ATP) büyük kısmını sağladıkları oksidatif fosforilasyon olayının gerçekleşmesi için oksijene ihtiyaçları vardır. Oksijenin ikinci bir önemli kullanım alanı onun aynı zamanda birçok enzim tarafından substrat olarak kullanılmasıdır. Aromatik halkalı zararlı bileşiklerin yıkılmasından, reaktif oksijen türlerine ve hücredeki birçok diğer doğal metabolik reaksiyonlara kadar birçok enzim oksijeni kullanarak bu bileşiklerin metabolizmasını gerçekleştirmektedir [19].

Moleküler oksijen, aerobik yaşam için hem gereklidir hem de reaktif oksijen türlerinin oluşumundan dolayı bütün canlılar için yüksek oranda tehlikeli olmaktadır. Moleküler oksijenin canlılardaki toksik etkisinin gerçek nedeni oksijenin aktif türleri olan serbest oksijen radikalleridir. Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşlenmemiş elektrona sahip olan çok reaktif atom veya moleküllerdir. Ancak Fe³⁺, Cu²⁺, Mn²⁺ ve Mo⁵⁺ gibi geçiş metalleri de ortaklanmamış elektronlara sahip oldukları halde serbest radikal olarak kabul edilmezler, fakat serbest radikal oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar. Serbest radikaller pozitif yüklü (kasyon), negatif yüklü (anyon) veya elektriksel olarak nötral olabilirler [20].

Bu radikallerin başlıcaları: süperoksit radikali (O₂⁻), hidroksil radikali (•OH), singlet (tekil) oksijen (¹O₂), hidrojen peroksit (H₂O₂), hidroperoksit (HO₂) ve peroksit (O₂²⁻) radikalleridir [17] (Şekil 1.4).

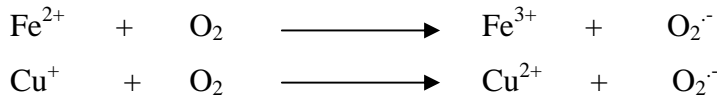


Şekil 1.4. Serbest Oksijen Radikalleri [12].

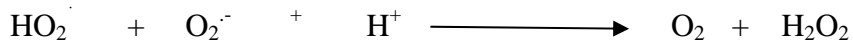
1.4.1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot -}$)

Canlılarda olduğu ilk gösterilen radikal olan süperoksit radikalinin, kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olmasından kaynaklanmaktadır.

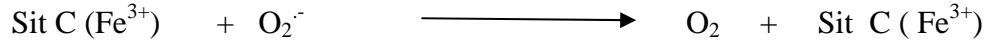
Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$) hemen hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşmaktadır. İndirgenmiş geçiş metallerinin ootoksidasyonu da süperoksit radikalini meydana getirmektedir..



Süperoksit radikali ile perhidroksi radikali reaksiyona girince biri okside olup diğeri ise indirgenmektedir. Bu dismutasyon reaksiyonunda moleküler oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelmektedir.



Süperoksit radikali hem oksitleyici hem indirgeyici özelliğe sahiptir. Örneğin ferrisitokrom c ya da nitro blue tetrazolium ile reaksiyonunda indirgeyici olarak davranarak bir elektron kaybeder ve moleküler oksijene okside olur.

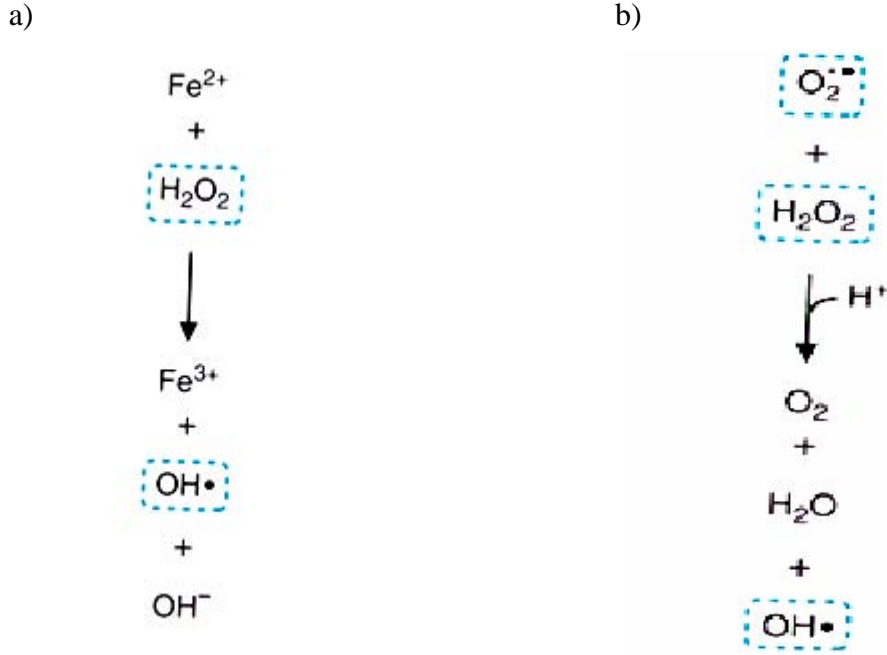


Süperoksit radikali epinefrinin oksidasyonunda oksidan olarak davranarak bir elektron alır ve hidrojen perokside (H_2O_2) indirgenmektedir. Süperoksit radikalının fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO^\bullet) ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türü olan peroksinitrit (ONOO^-) meydana gelmektedir. Peroksinitrit, nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) oluşturmak üzere metabolize edilmektedir. Peroksinitrit, azot dioksit (NO_2^\bullet), hidroksil radikali ($^\bullet\text{OH}$), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşebilmektedir. Bu nedenle de nitrik oksitin (NO^\bullet) zararlı etkileri peroksinitritten kaynaklanmaktadır [17].

1.4.2. Hidroksil Radikali ($^\bullet\text{OH}$)

Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikali olup, yarılanma ömrü oldukça kısadır. Hidroksil radikali reaktif oksijen türlerinin (ROT) en zararlısıdır. Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyol radikalleri (RS^\bullet), karbon merkezli organik radikaller (R^\bullet), organik peroksitler (RCOO^\bullet) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta da büyük hasara neden olmaktadır.

Hidroksil radikali ($^\bullet\text{OH}$), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır (Şekil 1.4.2). Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da meydana gelmektedir.

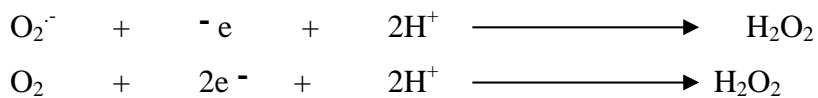


Şekil 1.4.2. $\cdot\text{OH}$ radikali oluşturan reaksiyonlar a) Fenton reaksiyonu b) Haber-Weiss Reaksiyonu [12].

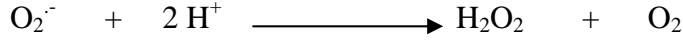
Fenton reaksiyonlarını katalizleyen en önemli aktif metal iyonları demir ve bakırdır. Özellikle $\cdot\text{OH}$ yapımını katalizlemelerindeki etkileri nedeniyle, canlılarda metal iyonları radikal hasarlarından birinci derecede sorumludurlar ve bu nedenle de bu etkiye sahip olmadıkları formda (proteinlere bağlı) tutulmalıdırlar [20].

1.4.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit radikalinin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu meydana gelmektedir.



Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin asıl üretimi, süperoksit radikalinin (O_2^-) dismutasyonu ile olmaktadır. İki süperoksit molekülünün, dismutasyonu reaksiyonuyla iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluşturmaktadır [12].

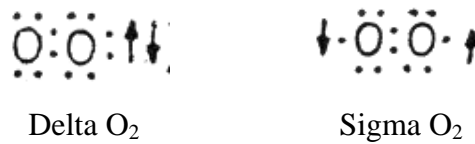


Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana getirdiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinmektedir, ya spontan gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenmektedir. Spontan dismutasyon pH 4,8'de en hızlıdır, enzimatik dismutasyon ise spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'larda daha belirgindir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri (ROT) kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynamaktadır. Çünkü H_2O_2 ve Fe^{2+} varlığında Fenton reaksiyonu, süperoksit radikali (O_2^-) varlığında da Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidrosil radikalini (OH^\bullet) oluşturmaktadır [20].

Süperoksit radikalının yağda çözünürlüğü sınırlı olduğu halde hidrojen peroksit yağda çözünebilmektedir. Bu nedenle hidrojen peroksit kendisinin olduğu yerden uzakta olan ve Fe^{2+} içeren membranlarda hasar oluşturmaktadır.

1.4.4. Singlet (Tekil) Oksijen (1O_2)

Singlet (tekil) oksijen, ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif bir oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olmaktadır. Enerji absorpsiyonu ile oksijenin paylaşılmamış dış elektronları spinlerini değiştirebilmektedir. Oksijenin bu şekilde uyarılmış durumda iki dış elektronu ayrı ayrı veya aynı orbitali işgal edebilirler. Oksijenin uyarılmış bu iki formuna singlet oksijen (1O_2) denir ve delta ve sigma olmak üzere iki şekli bulunmaktadır (Şekil 1.4.4).



Şekil 1.4.4. Singlet oksijen tipleri [12].

Singlet (tekil) oksijen vücutta, pigmentlerin (örneğin flavin içeren nükleotidler, retinal, bilirubin) oksijenli ortamda ışığı absorplamasıyla, hidroperoksitlerin metal varlığındaki yıkım tepkimeleriyle oluşmakta ve diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enerjiyi transfer etmekte, ya da kovalent tepkimelere girmektedir. Özellikle karbon-karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır [17].

1.5. Reaktif Oksijen Türlerinin Kaynağı

Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak reaktif oksijen türleri (ROT) meydana gelmektedir. ROT, hem çevresel etkenler ve hem de organizmadaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle oluştuğundan bunlar organizmada eksojen ve endojen kaynaklı olarak oluşabilmektedir [13].

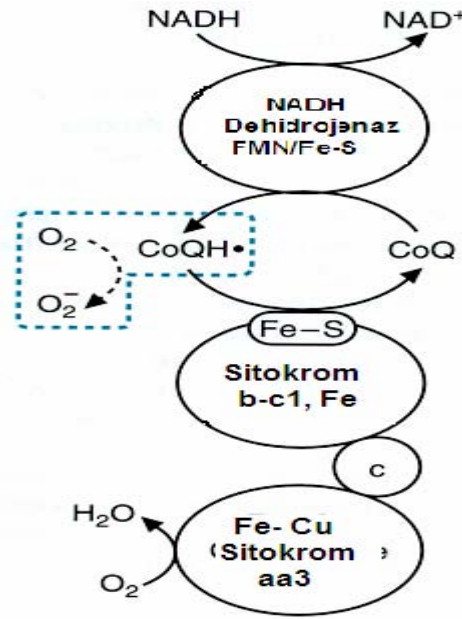
1.5.1. Endojen Kaynaklar

Reaktif oksijen türleri, başta mitokondriyal elektron transportu olmak üzere ksenobiyotik metabolizması, fagositik aktivasyon, çeşitli sentez ve degradasyon reaksiyonları gibi birçok yolla endojen kaynaklı olarak meydana gelmektedir (Çizelge 1.5.1).

Çizelge 1.5.1. Reaktif oksijen türlerinin endojen kaynaklı oluşum mekanizmaları [20].

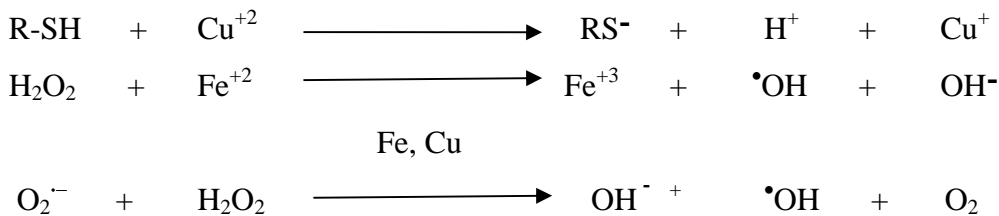
Kaynak	Lokalizasyon
Elektron taşıma sistemi	Mitokondri
NADPH oksidaz Siklo-oksijenaz	Plasma membranı
Ksantin oksidaz Geçiş metalleri	Sitosol
Oksidazlar	Peroksizom
Sitokrom P450 enzim sistemi	Endoplazmik retikulum

Aerobik koşullarda yaşayan organizmalar için oksidatif fosforilasyonun ATP'nin büyük bir kısmını sağlaması gibi sayısız faydalarının yanında çok önemli tehlikeleri de bulunmaktadır. Oksidatif fosforilasyonda moleküler oksijenin 4 elektronluk indirgenmesi ile H₂O'ya dönüşmesi esastır. Ancak oksijenin suya indirgenmesi ile sonuçlanan mitokondriyel elektron akışının % 1-5 kadarı elektron kaçakları ile sonuçlanmakta ve bu da oksijenin kısmi indirgenmesine neden olmaktadır. Oksijenin dört elektronla suya indirgenmesinin yerine 3, 2 ve 1 elektronla indirgenmesi reaktif oksijen türlerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır [12] (Şekil 1.5.1.1).

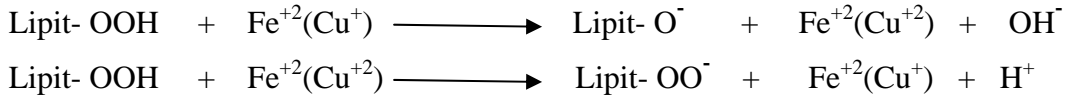


Şekil 1.5.1.1. Mitokondride Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu [12].

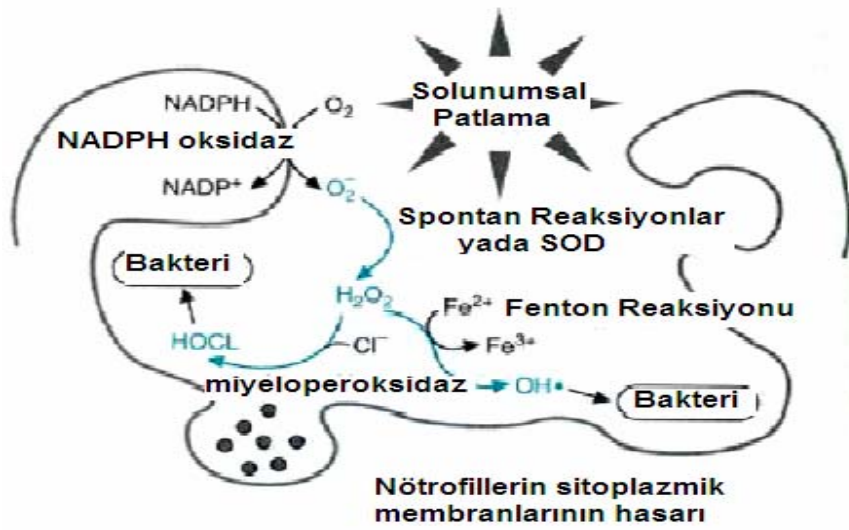
Demir ve bakır, tiyollerden tiyil sentezini, H₂O₂ ve O₂⁻ 'den •OH sentezini katalizleyerek reaktif oksijen türleri oluşabilmektedir.



Geçiş metalleri, lipid hidroperoksitlerinin (LOOH) parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalizleyerek radikal oluşturmaktadır.



Aktive olmuş makrofajlar, nötrofiller ve eozinofillerde fagositik solunumsal patlama yolu ile de radikaller meydana gelmektedir (Şekil 1.5.1.2).

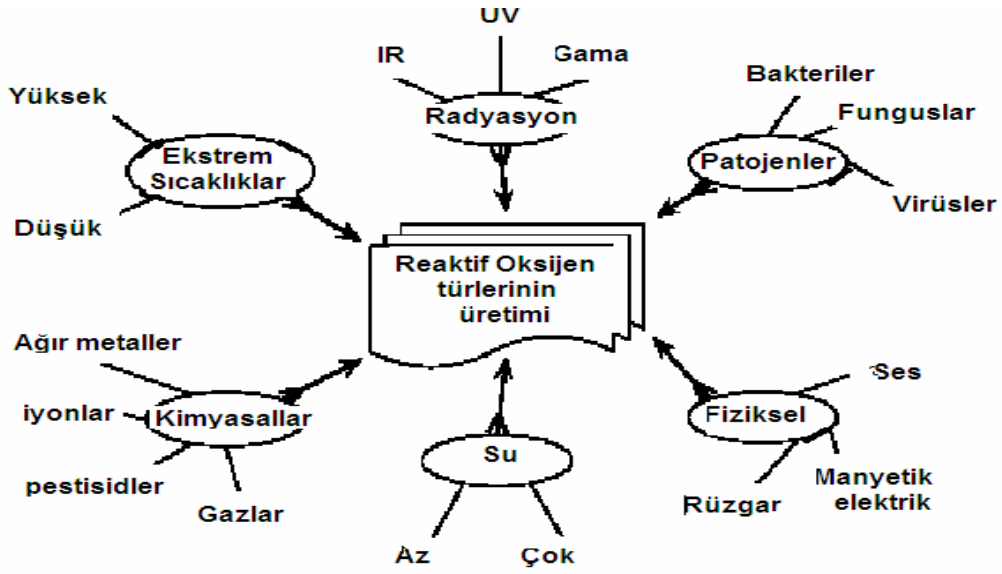


Şekil 1.5.1.2. Solunumsal patlama ile reaktif oksijen türlerinin oluşumu [12].

1.5.2. Eksojen Kaynaklar

Hücrelerde doğal metabolik yollarla serbest radikal oluşabileceği gibi iyonize radyasyon, ağır metaller, organik çözücüler, pestisitler, boyar maddeler ve diğer kimyasal maddeler gibi eksojen kaynakların etkisiyle de serbest radikaller oluşmaktadır.

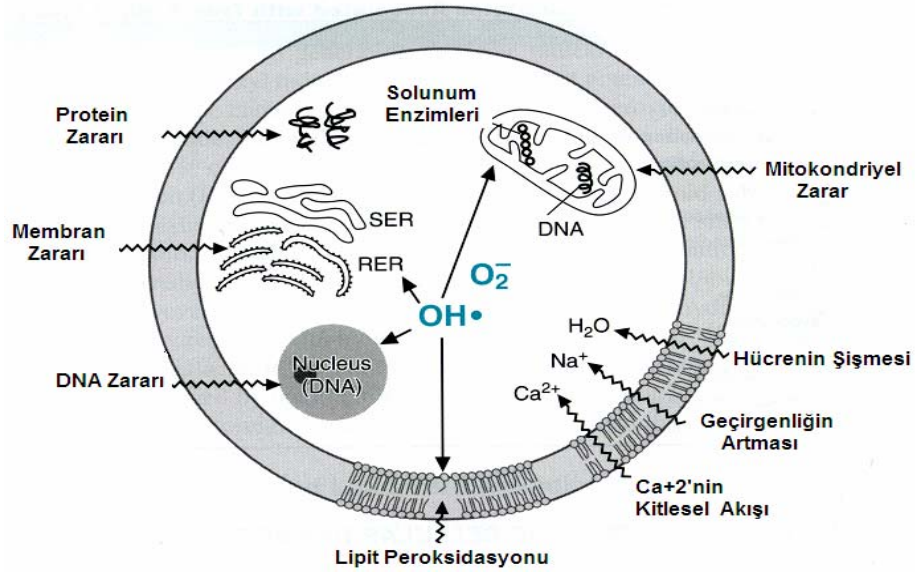
Serbest radikal oluşumuna neden eksojen kaynaklar oldukça çeşitli olmakla birlikte aşağıdaki Şekil 1.5.1.2’de olduğu gibi özetleyebiliriz [21]:



Şekil 1.5.2. Eksojen kaynaklı serbest oksijen radikallerinin oluşumu [20].

1.6. Serbest Oksijen Radikallerinin Etkileri

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbohidrat ve enzim gibi birçok önemli biyomoleküllerini etkilemektedir [22] (Şekil 1.6). Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı olmaktadır. Hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROT) ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir.



Şekil 1.6. Serbest oksijen radikallerinin etkileri [12].

Serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarının birçok kronik hastalığın komplikasyonlarına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Aterogenez, amfizem/bronşit, Parkinson hastalığı, Duchenne tipi musküler distrofi, gebelik preeklampsisi, serviks kanseri, alkolik karaciğer hastalığı, hemodiyaliz hastaları, diabetes mellitus, akut renal yetmezlik, Down sendromu, yaşlanma, retrolental fibroplazi, serebrovasküler bozukluklar, iskemi/reperfüzyon gibi durumlarda serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarı söz konusudur [12].

1.6.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri

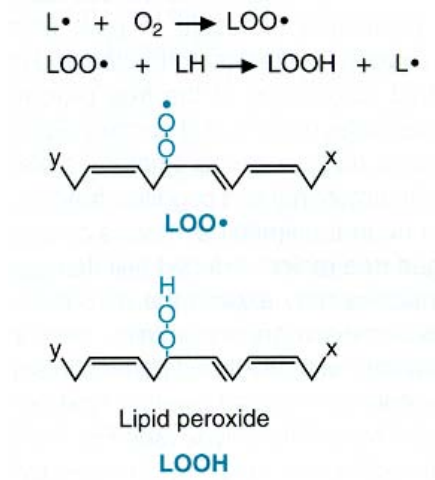
Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluşturmaktadırlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinmektedir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri (L^\bullet) ve lipid peroksit radikallerinin (LOO^\bullet) oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROT) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilmektedir (Şekil 1.6.1.1). Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna "enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu" denir (Şekil 1.6.1.2). Hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri çoklu doymamış yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlamaktadır.



Şekil 1.6.1.1. Lipit radikali [12]

Lipid radikali (L^\bullet) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrayarak moleküler oksijenle (O_2) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri (LOO^\bullet) oluşturmaktadır. Lipid peroksit radikalleri (LOO^\bullet), membran yapısındaki diğer çoklu

doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlerine (LOOH) dönüşmekte ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam etmektedir [17].



Şekil 1.6.1.2. Lipit Peroksidasyonu [12].

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksitlerinin (LOOH) yıkımı geçiş metalleri iyon katalizini gerektirmektedir. Plazma ve organel membranları, serbest radikallerin meydana getirdiği lipid peroksidasyonu sonucu uyarılmakta ve geçiş metallerinin varlığında bu olay daha da artmaktadır. Lokal olarak hidrojen peroksitten (H_2O_2) Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali ($\cdot OH$) oluşması zincir reaksiyonunu başlatmakta ve lipid peroksitleri (LOOH) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehytlere dönüşmektedir. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yaymaktadırlar. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelmektedir [20] (Şekil 1.6.1.3).



Şekil 1.6.1.3. Malondialdehit (MDA) [12].

Kanda ve idrarda ortaya çıkan Malondialdehit (MDA), yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi bir korelasyon göstermektedir. Bu nedenle biyolojik materyalde malondialdehit (MDA) ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılmaktadır. Enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına ve ürettiği reaktif aldehyitlerle indirekt olarak diğer hücre bileşenlerine zarar vererek membran bütünlüğünü bozup, doku hasarına ve birçok hastalığa neden olmaktadır.

1.6.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Proteinler serbest radikallere karşı çoklu doymamış yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Serbest radikallerin proteinlerle etkileşimi sonucu pek çok protein modifikasyonları meydana gelerek peroksit ve karboniller gibi bileşikler oluşmaktadır. Karboniller protein hasarının ölçümünde kullanılmaktadır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenmektedir.

Serbest radikallerin etkileri sonunda, yapılarında fazla sayıda disülfid bağı bulunan immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozularak normal fonksiyonlarını yerine getirememektedirler. Prolin ve lizin gibi amino asitler, reaktif oksijen türleri (ROT) üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında enzimatik olmayan hidroksilasyona uğrayabilirler. Hemoglobin gibi hem proteinleri de, serbest radikallerden önemli oranda zarar görmektedir. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) veya hidrojen peroksitle (H_2O_2) reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olmaktadır.

1.6.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere Etkileri

DNA, serbest radikallerden kolayca zarar görebilen önemli bir hedeftir. DNA üzerindeki oksidatif etki idrarda okside olmuş nükleobazların saptanması ile tespit edilmektedir. İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açmaktadır. Hidroksil radikali ($\cdot OH$) deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girerek değişikliklere yol açmaktadır. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit (H_2O_2) membranlardan kolayca geçerek ve

hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre fonksiyonlarının bozulmasına ve hatta hücre ölümüne yol açabilmektedir. Cu^{+2} iyonları en çok G-C'ce zengin bölgelerde bulunduğundan, en fazla oksidatif hasara maruz kalan baz guanindir [23]

1.6.4. Serbest Radikallerin Karbohidratlara Etkileri

Serbest radikallerin karbohidratlar üzerinde önemli etkileri vardır ve bu etkilerin sonucunda çeşitli ürünler meydana gelmektedir. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu H_2O_2 , peroksitler ve okzaloaldehytler meydana gelmektedir. Bu ürünler de çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadır. Okzaloaldehytler; DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve çapraz bağlar oluşturabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki göstermekte ve bu nedenle de kanser ve yaşlanma olaylarında önemli rol oynadıkları düşünülmektedir [17,20].

1.7. Antioksidan Enzim Sistemi

Antioksidanlar, fizyolojik veya çevresel olarak meydana gelen serbest oksijen radikallerinin lipid, karbohidrat, proteinler ve nükleik asitler gibi biyolojik moleküllerle reaksiyona girmelerini engelleyen doğal maddelerdir. Serbest oksijen radikallerinin meydana getirdiği bu etkilerin giderilmesi için organizmalar tarafından geliştirilen bu savunma mekanizmasına antioksidan savunma sistemi adı verilmektedir. Antioksidanlar, ksenobiyotiklerin, ilaçların, kanserojenlerin, toksik maddelerin ve radikallerin olumsuz etkilerine karşı doğrudan ya da dolaylı olarak hücreyi korumaktadır.

Antioksidanlar etkilerini iki şekilde gösterirler:

1. Serbest radikal oluşumunun önlenmesi;
 - ❖ Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırıcı etki
 - ❖ Oksijeni uzaklaştırıcı veya konsantrasyonu azaltıcı etki
 - ❖ Katolitik metal iyonları uzaklaştırıcı etki

2. Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi;

- ❖ Toplayıcı (scavenging) etki: Reaktif oksijen türlerini (ROT) etkileyerek onları tutma veya çok daha az reaktif başka bir moleküle dönüştürülmesi (örneğin: Enzimler),
- ❖ Bastırıcı (quencher) etki: Reaktif oksijen türleri (ROT) ile etkileşip onlara bir proton ekleyerek aktivite göstermesi (örneğin: Vitaminler)
- ❖ Onarıcı (repair) etki: Hedef moleküllerin hasar sonrası tamir edilmesi (örneğin: Glutasyon),
- ❖ Zincir kırıcı (chain breaking) etki: Reaktif oksijen türlerini ve zincirleme reaksiyonları başlatacak diğer maddeleri kendilerine bağlayıp zincirlerini kırarak fonksiyonlarını önleyici etki (örneğin: Fe şelatörleri).

Antioksidan savunma sistemi, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşmaktadır. Enzimatik antioksidanlar:

- ❖ Süperoksit dismutaz (SOD)
- ❖ Katalaz(CAT)
- ❖ Glutasyon peroksidaz(GSH-Px)
- ❖ Glutasyon-S-Transferazlar(GST)
- ❖ Glutasyon Redüktaz (GR)

Enzimatik olmayan antioksidanlar ise,

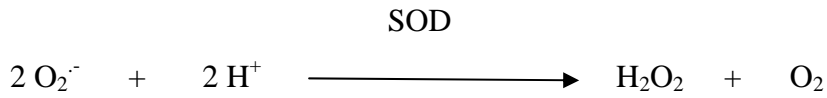
- ❖ Glutasyon (GSH)
- ❖ Vitaminler (A, C, E)
- ❖ Melatonin

gibi bazı eser elementleri kapsayan antioksidanlardan oluşmaktadır [24].

1.7.1. Enzimatik Antioksidanlar

1.7.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD, Superoxide Oxidoreductase : EC 1.15.1.1)

İlk olarak 1968 yılında Mc Cord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır [25]. Süperoksit dismutaz, oksijene geçici ya da uzun süreli periyotlarda maruz kalan organizmalarda bulunan bir metalloenzimdir [26]. Süperoksit radikalinin ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir [20,27].



Bir radikal üzerine direkt olarak etki eden tek enzimdir. Kesin özgülüğe sahip olan bu enzim kofaktör olarak Cu, Zn, Mn ve Fe'i kullanmaktadır. İntraselüler olarak; prokaryotlarda matrikste Mn-SOD olarak, periplazmik boşlukta Fe-SOD olarak, ökaryotlarda ise Cu-Zn SOD olarak sitozol ve nukleus da yer almaktadır. Ökaryotların mitokondriyel matriksinde ve nukleusta da Mn-SOD olarak yer almaktadır. *E. coli*'de hem Mn-SOD, hem de Fe-SOD saptanmıştır [28].

SOD aktivitesindeki her hangi bir artış, SOD ürünü olan H_2O_2 'nin üretimini de arttırdığı için beraberinde katalaz ve GSH-Px aktivitesinde de artışlara yol açabilmektedir. Eğer SOD aktivitesi H_2O_2 süpürücülerinin aktivitesini aşarsa H_2O_2 birikiminden dolayı, radikal toksisitesinde artışlara yol açmaktadır [13].

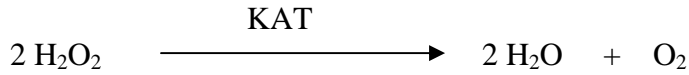
1.7.1.2. Katalaz (CAT, H_2O_2 Oxidoreductase : E.C.1.11.1.6)

Katalaz, yapısında dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Bu enzim, esas olarak peroksizomlarda daha az olarak da sitozolde ve mikrozomal fraksiyonlarda bulunmaktadır. H_2O_2 'i suya ve oksijene parçalayarak lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu rol oynamaktadır. Katalaz, hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında bir takım küçük substrat moleküllerine karşı peroksidatik aktivite göstermektedir [29].

Enzim iki tip tepkime kullanarak etkisini gösterir:

1- H_2O_2 'nin dismutasyonu (katalitik tepkime)

2-Alifatik alkollerin peroksidasyonu (peroksidatik tepkime) [30]



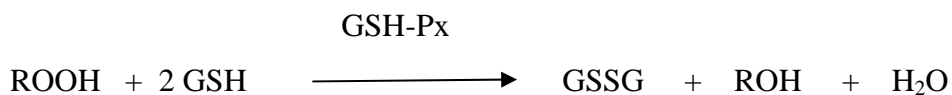
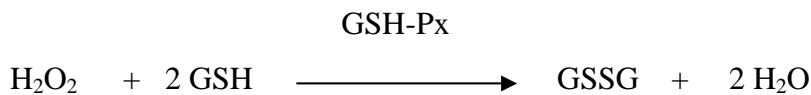
Ezimin indirgen özelliği ve peroksidatik aktivitesi hidrojen peroksit ve metil, etil hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere özgüdür. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine etki etmemektedir.

Katalaz, bütün memeli hücrelerinde, bitkilerde ve aerobik mikroorganizmalarda bulunmaktadır. Anaerobik hücrelerde katalaz bulunmamaktadır. Bu yüzden oksijenli ortamlarda üreyemezler. *Escherichia coli*'de katalazın iki izoenzimi saptanmıştır [33]. Aerotolerant diğer birçok bakteride pseudokatalaz denilen katalaz sentezlenmektedir. Pseudokatalaz ilk kez *Leuconostoc sp.* ve *streptococcus fecalis*'den saflaştırılmıştır. Granulomatöz hücrelerde katalaz, hücreyi kendi solunumsal patlamasına karşı koruma işlevini de görmektedir. Hücrede oluşan hidrojen peroksidi (H_2O_2), hidroksil radikali ($\bullet\text{OH}$) oluşumunu önlemek için ortadan kaldırmaktadır.

Katalaz, SOD ve peroksidaz gibi enzimlerle birlikte aerobik hücrelerde süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksitine karşı savunmadan sorumludur [34]. Bu yüzden de katalaz hücrelerin savunmasında SOD enzimi ile birlikte çok önemli bir görev yüklenmiştir [35].

1.7.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px: Glutathione: H_2O_2 Oxidoreductase, EC 1.11.1.9)

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), hidrojen peroksit ve büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesinden sorumlu olan ve sitozolde yerleşmiş, 4 selenyum atomu içeren tetramerik yapıda bir enzimdir. GSH-Px enziminin selenyuma bağımlı ve bağımsız olmak üzere iki izomeri bulunmaktadır. Se-bağımlı GSH-Px, H_2O_2 'in ve lipid hidroperoksitlerinin, Se-bağımsız GSH-Px ise sadece lipid hidroperoksitlerinin temizlenmesinden sorumludur. GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizleyerek, hidrojen peroksitin ve organik hidroperositlerin (ROOH) indirgenmesini sağlamaktadır [20]:

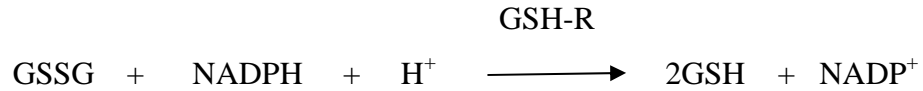


GSH-Px'in iki substratı vardır. Substratlardan biri olan peroksitler alkole indirgenirken, diğer substrat olan glutatyon (GSH) yükseltgenmekte ve oluşan yükseltgenmiş glutatyon (GSSG), glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği başka bir reaksiyon ile tekrar indirgenmiş glutatyonla dönüştürülmektedir [33]. Enzimin aktivitesi, hidrojen kaynağı olan redükte glutatyonun (GSH) varlığına ve enzimin 4 alt ünitesinde bulunan selenyuma bağlı olarak değişmektedir. Se eksikliği GSH-Px aktivitesinde azalmaya ve lipid peroksidasyonunda artışlara yol açmaktadır [13].

Yapısı ve fonksiyonları yakın zamanda aydınlatılmış olan bir diğer GSH-Px' de, fosfolipit-hidroperoksit glutatyon peroksidaz enzimidir. Bu enzim de Se içerir, monomerik bir yapıdadır ve sitozolde bulunmaktadır. Membran yapısındaki fosfolipitleri hidroperoksitlere karşı korumak amacıyla, hidroperoksit radikallerini alkole indirgeyerek özellikle E vitamininin yetersiz olduğu durumlarda peroksidasyona karşı koruma sağlamaktadır.

1.7.1.4. Glutatyon Redüktaz (GSH-R: EC 1.6.4.2)

Dimer yapılı bir enzim olan glutatyon redüktaz (GSH-R), hücrede okside glutatyonu (GSSG) redükte glutatyonla (GSH), NADPH'a bağımlı olarak katalizleyen bir flavoproteindir [36].

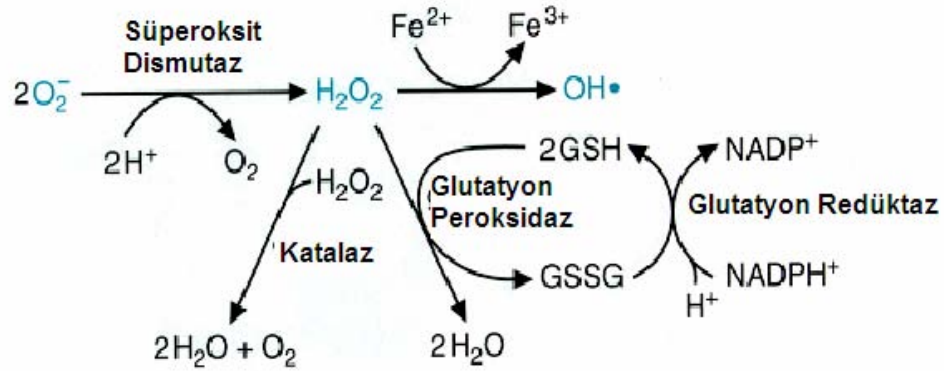


GSH, çevredeki oksidan moleküllerin etkisini kendi üzerine çekerek hücrenin fonksiyonel proteinlerinin oksidasyonunu engellemektedir. Aynı zamanda oksijen radikallerinin biyolojik moleküllere saldırması sonucunda meydana gelen peroksitleri ortadan kaldırmak için bazı peroksidaz enzimler tarafından da kofaktör olarak kullanılmaktadır. Bunun sonucunda kendisi oksitlenerek okside glutatyonla dönüşmekte ve oluşan bu okside glutatyonun da redükte glutatyon haline dönüşümü GR enzimi tarafından katalizlenmektedir.

GSH-R, oksidasyon/ redüksiyon tepkimelerinde önemli bir redüktant role sahip olan GSH'nin hücre içi düzeyi azalınca aktive olmakta ve organizmadaki sınırlı olan GSH deposunu tamamlanmaktadır [31,32].

GSH-R, pek çok mikroorganizmada saptanmıştır. Bakterilerde, NADPH'a özgül ve NADPH'a özgül olmayan enzim olmak üzere iki farklı glutatyon redüktaz izole

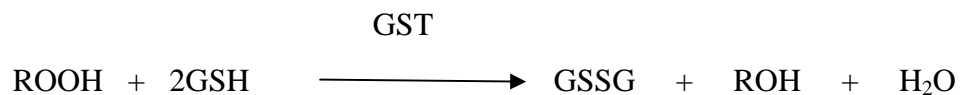
edilmiştir [37]. GSH-R, hücre içi NADPH ve GSSG konsantrasyonu ile kontrol edilmektedir. NADPH'ın düşük hücre içi seviyeleri GSSG olmadığı durumda glutatyon reüktazı inaktive etmektedir. Bu yüzden fizyolojik GSH/GSSG oranı önemlidir. GSSG'nin hücre içi seviyesi artınca GSH-R tekrar aktive olmaktadır [38] (Şekil 1.7.1.4).



Şekil 1.7.1.4. Glutasyon Redüktaz(GSH-R) [12].

1.7.1.5. Glutasyon S-Transferaz (GST, EC 2.5.1.18)

GST, tripeptid glutatyonun tiyol grubu ile reaktif bir elektrofilik merkeze sahip organik moleküllerin konjugasyonunu katalizleyen bir enzim grubudur [39]. GST'ler genel olarak üç sitozolik ve bir de mikrozomal olmak üzere dört ana gruba ayrılmaktadır. Böceklerde, bakterilerde ve birçok bitkide tanımlanmışlardır. GST'ler alfa, pi, mu, sigma ve teta olmak üzere beş sınıf altında incelenen dimerik enzimlerdir. Organizmaya giren ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda önemli rol oynamaktadırlar [40]. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlere (ROOH) karşı GST'ler Se-bağımsız glutatyon peroksidaz aktivitesi göstermektedirler.



Hayvan ve bitkilerin çeşitli dokularında GST'nin bol miktardaki varlığı ve her alana yayılması onların önemini vurgulamaktadır. Bitkilerde GST genleri birçok

büyüme regülatörü, ağır metaller, klorokarbonlar, oksidatif stres gibi faktörlerce indüklenmektedir. Bitkilerdeki GST'nin doğal fonksiyonları arasında lipid hidroperoksitlerin ve fungal toksinlerin detoksifikasyonu, kuraklık toleransının artması, patojenlere karşı antioksidatif savunma ile ilgili bazı mekanizmalar bulunmaktadır [25].

1.7.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

1.7.2.1. Glutatyon (GSH, γ -L-glutamil-L-sistein-glisin)

Glutatyon, glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden meydana gelmiş bir tripeptittir (Şekil 1.7.2.1). GSH'a antioksidan özelliğini sisteinin tiyol grubu kazandırmaktadır. GSH'ın benzersiz yapısı, bu moleküle kararlılık, yüksek su çözünürlüğü ve antioksidan savunmada önemli bir üstünlük sağlamaktadır. Glutatyon, redükte glutatyon (GSH) ve okside glutatyon (GSSG veya glutatyon disülfid) olmak üzere iki formda bulunmaktadır.

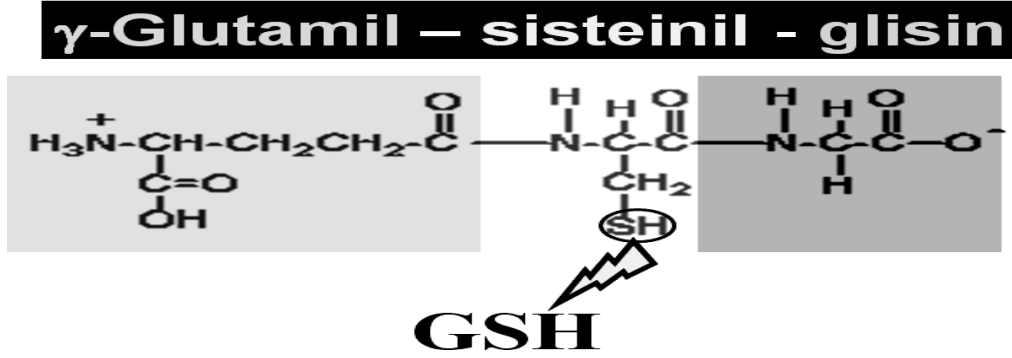
Glutatyon (GSH), reaktif oksijen türlerine (ROT), ksenobiyotik zarara karşı, hücresel savunmada ve ilaçların detoksifikasyonunda önemli bir rol oynayan intrasellüler antioksidandır ve ekstrasellüler mesafede çok düşük konsantrasyonlarda bulunmaktadır [41]. GSH, mitokondri, nukleus ve sitoplazmada bol bulunan ve hücre kompartmanlarında çözünebilir önemli bir antioksidandır.

Sahip olduğu sülfidril (-SH) grubundan dolayı kolay elektron verme kapasitesine sahip olan glutatyon, H_2O_2 'nin ve lipid peroksitlerinin temizlenmesinde görev yapan GSH-Px ve GST enzimlerine elektron sağlayan bir kofaktör olarak görev yapmaktadır. Böylece reaktif oksijen türlerin detoksifikasyonuna alternatif bir yol olmuştur [42].

Glutatyon (GSH), hücre içinde çevredeki oksidan maddelerin etkisini kendi üzerine çekerek hücrenin fonksiyonel proteinlerinin oksidasyonunu engellemektedir [31]. Hidroksil radikali ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türlerini temizleyen ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı koruyan GSH, aynı zamanda amino asitlerin transportunda da görev almaktadır. GSH, E ve C vitamini gibi antioksidanlar ve diğer serbest radikal süpürücülerinin çalışmasını da önemli oranda desteklemektedir [43].

GSH' in intraselüler içeriği, mikroorganizmalarda meydana gelişleri ve dağılımları değişiklik göstermektedir. *S. cerevisiae* ve *E.coli*' de GSH içeriği oldukça yüksektir ve kuru ağırlığın % 1'den fazla olduğu açıklanmıştır [44].

Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayan antioksidanlar ise hücre dışında daha fazla etkilidir. Glutasyon (GSH) bir istisnadır. Çünkü hücre içinde de etkili olan güçlü bir antioksidandır



Şekil 1.7.2.1. Glutasyonun açık formülü [45].

1.8. Ekstremofiller

Prokaryotik yaşam, 3,5 milyar yıl geriye uzanan bir başarı öyküsüdür. Prokaryotlar ilk canlılar olarak dünyada 1.5 milyar yıl yalnız başlarına yaşayıp evrimleşmişlerdir. Evrimleşen dünyaya uyum sağlayıp gelişmişler ve buna karşılık da dünyanın değişimine katkıda bulunmuşlardır [46].

Prokaryotlara yaşam olan her yerde rastlamak mümkündür. Prokaryotlar gibi yaygın, çok sayıda ve çeşitlilik gösteren bir organizma topluluğunun, dünyaya ve üzerinde yaşayanlara büyük etkisi bulunmaktadır. Ayrıca her hangi bir ökaryot için fazla soğuk, fazla sıcak, çok tuzlu, çok asidik yada çok bazik olan ekstrem çevrelerde gelişebilmektedirler [46].

Canlıların bazı ortamlarda barınması zor, bazılarında ise olanaksızdır. Dünyada olağanüstü zor koşullarda yaşayan organizmalar bulunmaktadır. Ekstremofil olarak adlandırdığımız bu canlılar normal bir canlının yaşayamayacağı ortam koşullarına adapte olmuşlardır. Ekstremofiller karasal mezofilik organizmaların büyümeleri ve üremeleri için gerekli optimal koşullardan çok farklı olan ekstrem çevrelerde gelişebilmektedirler. Çoğu ekstremofiller mikroorganizmalardır. Archaea domaini

ekstremofillerin geniş dağılımlı olduğu bir domain olarak bilinmesine karşın, ekstremofiller hem öbakterilerin hem de archaeaların içinde sayısız ve farklı genetik hatlarda yer almaktadır. Archaea ve ekstremofil terimleri ara sıra kendi içerisinde yer değiştirmesine karşın, pek çok mezofilik archaeaların ve pek çok ekstremofilik öbakterilerin olduğu bilinmektedir.

1.8.1. Ekstremofillerin Sınıflandırılması

Ekstremofiller biyolojinin kural kırıcılarıdır. Bu canlıların yaşadığı ekstrem çevreler fiziksel ekstremler, jeokimyasal ekstremler ve biyolojik ekstremler olarak sınıflandırılmaktadır. [47]. Fiziksel, jeokimyasal ve biyolojik ekstremleri oluşturan parametreler aşağıdaki Çizelge 1.8.1.1’de verilmiştir.

Çizelge 1.8.1.1. Ekstrem Çevrelerin Sınıflandırılması.

Fiziksel Ekstremler	Jeokimyasal Ekstremler	Biyolojik Ekstremler
Sıcaklık	p H	Besin
Basınç	Tuzluluk	Populasyon Yoğunluğu
Radyasyon	Kuraklık	Parazitler
Patojenler		
Toksik Bileşenler		

Ekstremofil canlılar, yeryüzünde yaşanması zor çevrelere adapte olmuş canlılardır. Bu canlılar, yaşabildiği çevresel parametreye bağlı olarak farklı şekilde sınıflandırılmaktadırlar. Ekstremofillerin yaşadığı çevresel parametreler ve buna bağlı olarak sınıflandırılması ve yaşadığı habitatlar Çizelge 1.8.1.2.’ de verilmiştir.

Çizelge 1.8.1.2. Ekstremofillerin Sınıflandırılması.

Çevresel Faktör	Kategori	Tanım	Önemli Habitatlar
SICAKLIK	Psikrofil	< 15°C	Buzullar, okyanus dipleri,
	Termofil	50-80°C	artrik
	Hipertermofil	>80°C	Kaplıcalar, termal kaynaklar
TUZLULUK	Halofil	Tuz seven (2-5 M NaCl)	Denizler, Tuz gölleri, solar tuz fabrikaları
BASINÇ	Barofil	Basınç severler (>1000 atm)	Deniz dipleri(Mariana)
pH	Asidofil	pH< 6	Asidik sıcak sular, sülfid
	Alkalifil	pH> 10	madenleri Soda gölleri/çöller
RADYASYON	Radyasyon direnci		Toprak, kontamine alanlar
TOKSİK AĞIR METALLER	Metallofiller	Ağır metalleri tolere eder	Kontamine alanlar
BESİN KİTLİĞİ	Oligotrof		Göller

1.8.2. Poliektremofil

Extremofil organizmaların dışında birden fazla ekstrem koşula dayanıklılık gösteren canlılar da bulunmaktadır. Bu canlılar Poliektremofil olarak adlandırılmaktadır. Bu organizmalara örnek olarak su ayıcıklarını, hamam böceklerini ve *Deinococcus radiodurans*' ı verebiliriz. *D. radiodurans*, genotoksik kimyasallara, oksidatif zararlara, yüksek seviyede iyonikleşmeye, ultraviyole radyasyona ve dehidrasyona karşı ekstrem dayanıklılık göstermekte ve bu özelliklerinden dolayı da poliektremofil olarak adlandırılmaktadır [48,49].

1.8.2.1. *Deinococcus radiodurans*

Deinococcus radiodurans'ı diğer organizmalardan ayıran en önemli özelliği radyasyona dayanıklı olmasıdır. Dünya üzerinde radyasyona en dayanıklı organizma olarak Guinness rekorlar kitabına girmiş sıra dışı bir bakteridir. Bir insanın ölmesi için 10 Gy'lik radyasyon düzeyi yeterli olmaktadır. *E. coli* kültüründeki hücreler 60 Gy'lik dozda tüm canlılık faaliyetlerini kaybetmektedirler. Oysa *Deinococcus radiodurans* 5000 Gy'lik dozda hiç canlılık kaybı olmadan 15000 Gy'lik dozda ise kültürün % 37 si canlı kalacak şekilde dayanıklılık göstermektedir [50] (Şekil 1.8.2.1.1.1).

Gezegen üzerinde bakterinin dayanabildiği kadar çok radyoaktif atık olmadığı için böyle bir bakterinin radyoaktif alanlardaki bu başarısı onu daha da önemli hale getirmiştir. Diğer taraftan yeryüzünde yaşam 4.5 milyar yıl önce bu radyoaktif durumlar içinde var olmuştur. En son çalışmalar, tüm yaşamın kalın hücre duvarlı bir bakteri olan ortak bir atadan geldiğini desteklemektedir. Bu bakteri, ilk yeryüzünün yüksek sıcaklıklarına ve acımasız atmosferine dayanabilecek güçteydi ve bunun için de orijinal atadan çok uzak olmaması gerekirdi [51]. Böylece onun bu ekstrem iklim koşullarında milyarlarca yıl önce gelişmesi ve günümüze kadar var olması mümkün hale gelmiştir. 1956'da *D. radiodurans*'ın R1 soyu (ATCC BAA-816), Oregon Corvallis'de A.W. Anderson ve arkadaşları tarafından yüksek gama radyasyon uygulanmış bozulmuş konserve etler üzerinde yaptıkları incelemeler sonucunda izole edilmiştir [52]. Bu kalın hücre duvarlı bakteri kümesine *Micrococcus radiodurans* adı verilmiş, bu isim daha sonra *Deinococcus radiodurans* olarak değiştirilmiştir. Aynı zamanda bu organizmaya "Konan Bakteri" takma adı da verilmiştir.

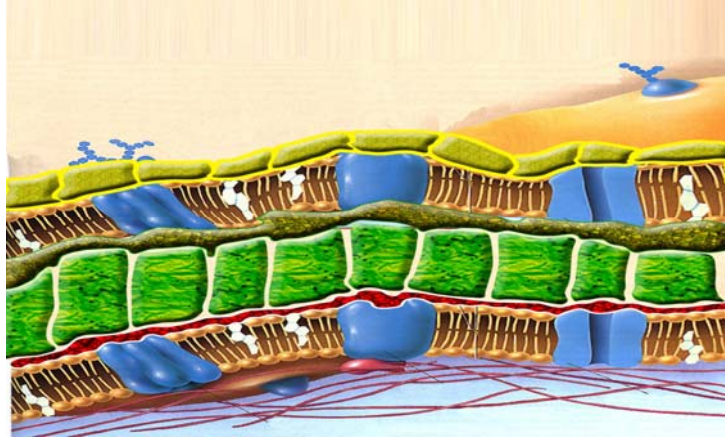
1.8.2.1.1. Genel Karakteristikleri

Deinococcaceae familyasına ait olan bakteri, radyasyona en dirençli organizmalardan biridir. *Deinococcus* patojen değildir, Gram pozitif, spor oluşturmaz, hareketsiz, küre şeklinde ve zorunlu aerob bir bakteridir. 1-2 µm boyutunda, kırmızı pigmentli olan bakteri tipik olarak zengin besi ortamında dördü hücre kümesi şeklinde (tetrakok) gelişmektedir. *Deinococcus radiodurans*, kuraklık, UV ışığı, hidrojen peroksit ve çeşitli kimyasal ajanlar gibi DNA da zarar yaratan durumlara da direnç göstermektedir [53,54].



Şekil 1.8.2.1.1.1. *Deinococcus radiodurans*.

Deinococcus radiodurans, 50-60nm kalınlığında çok tabakalı ve ayırıcı bir hücre duvar yapısına sahiptir (Şekil 1.8.2.1.1.2). Gram pozitif olmasına karşın hücre duvar yapısı bakımından Gram negatiflere benzetilmektedir. Bu kalın hücre duvar yapısının, bakterinin radyasyona karşı gösterdiği direnç de önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Hücre duvarının altında tüm hücrelerde olduğu gibi plazma membranı bulunmaktadır. Plazma membranının lipitleri diğer organizmalardaki fosfolipidlerin tersine genellikle Gram negatif bakterilerde görülen yağ asidi kalıplarını içeren ve yüksek konsantrasyonda lipit-karbohidrat bulunduran bir lipit kompozisyonuna sahiptir. *D. radiodurans*, Gram pozitif bakterilerdeki gibi dallanmış yağ asidi zincirlerini içermez, fakat yüksek oranda doymuş ve doymamış yağ asitlerine sahiptir. Bu lipitler alkilaminlerden oluşmaktadır. Bakteriye turuncu rengini veren karetenoidler, diğer pigmentli Gram pozitif bakterilerde sitoplazmik membranda yerleşik iken *D. radiodurans*'da hücre duvarında bulunmaktadır ve bakterinin radyasyona olan direncinde rolü olduğu düşünülmektedir. [55]. Plazma membranının üzerindeki tabaka tipik peptidoglikan tabakasıdır, deliklerle doludur ve bu yüzden holey (delikli) tabaka olarak isimlendirilmektedir. Bu deliklerin tanımlamada önemi yoktur. Yapısında ornitin aminoasitini içermekte ve bu amino asitin de radyasyona olan dayanıklılığında önemli rolü olduğu düşünülmektedir. Daha sonra içi matriksle dolu tek tabakalı ve küçük bölmeleri olan bir tabaka bulunmaktadır. Bu bölmeli tabakanın üzerinde içteki plazma membranına benzer alışılmadık bir kompozisyonla diğer plazma membranı yer almaktadır. 2. membranın üzerinde, S- tabakası olarak bilinen ve sıkıca paketlenmiş hegzogonal proteinlerden oluşan bir başka tabaka daha vardır. Bu tabakanın üzerinde, *D. radiodurans*'ın bazı soylarında yoğun bir şekilde paketlenmiş karbohidratdan oluşan ekstra bir tabaka bulunmaktadır [56].



Şekil 1.8.2.1.1.2. *Deinococcus radiodurans*' in hücre duvar yapısı.

1.8.2.1.2. Filogenisi ve Habitatı

D. radiodurans, Eubacteria alemi içerisinde sınıflandırılmaktadır. Deinococcaceae familyasının üyeleri *Micrococcus* genusu içinde sınıflandırılmaktadır [57]. Fakat daha ileri taksonomik çalışmalar bu sınıflandırmanın yanlış olduğunu göstermiş ve 16S r RNA gen dizileri kullanılarak yapılan analizlerde filogenetik ağacın yapısı *Thermus* sp. ile yakından ilişkili üyeleri olan “*Deinococcus*” adında ayrı bir genusun varlığını desteklemiştir [58]. Deinococcal familyanın doğal habitatları; toprak, hayvan dışkıları, ışınlanmış et, sıcak su kaynakları, hava ve kumaşlar gibi çok çeşitli çevrelerden izole edildikleri için tam olarak bilinmemektedir [59-62]. Bu çevrelerin ortak özelliği suyun az olmasıdır. *Deinococcus*'un ve diğer deinococcal türlerin bu yeteneği uzun kuraklık periyotlarında canlı kalmalarını sağlamış ve yeni bir hipotezin oluşmasına sebep olmuştur: *D. radiodurans*'ın ekstrem dirençli fenotipi, kuraklık ve rehidrasyon döngüsü ile bakterinin DNA zararına karşı canlı kalmak için oluşturduğu sekonder karakteristiklerdir.

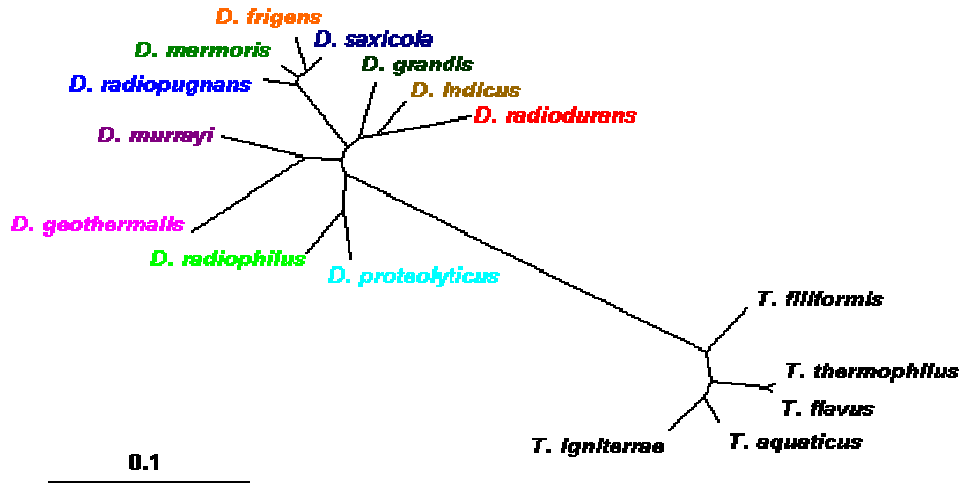
Alem: Eubacteria

Şube: Deinococcus- Thermus

Takım: Deinococcales

Cins: Deinococcus

Tür: *Deinococcus radiodurans*



Şekil 1.8.2.1.2. *Deinococcus* cinsine ait diğer türler ve *Thermus* ile ilişkisi

İyonize radyasyon gibi kurak şartlar da, DNA’da çift zincir kırıklarına (DSBs), tek zincir kırıklarına (SSBs) ve nükleotit baz zararlarına neden olmaktadır [63].

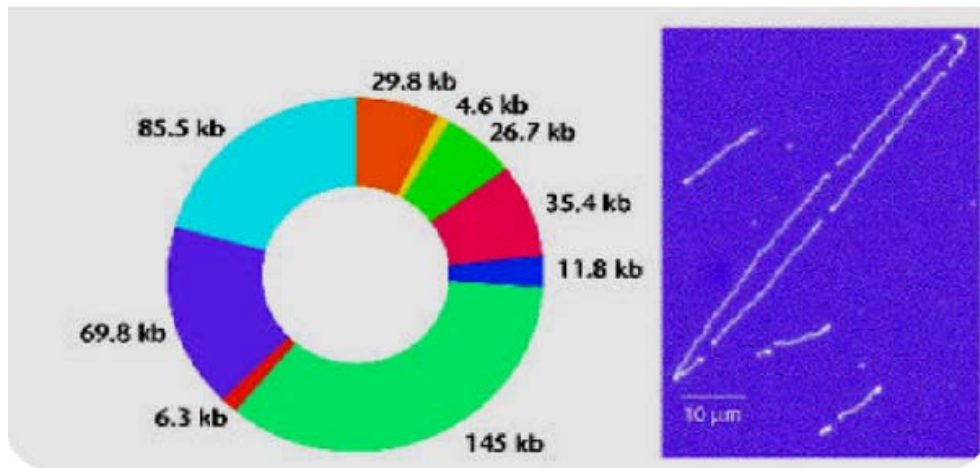
1.8.2.1.3. *Deinococcus radiodurans*’ın Genetiği

D. radiodurans R1 (ATCC BAA-816) soyunun tahmini olarak 3,195 geni kodlayan G-C’ce zengin genomu (%66,6), 2 kromozomdan ibarettir (Çizelge 1.8.2.1.3). DR asıl [2,65mbp] ve DR412 [412 kbp] kromozomlarına ilaveten 46kbp ‘lık bir plazmit ve bir de 177kbp’lik, DR177 adı verilen megaplazmitden oluşmaktadır [66] (Şekil 1.8.2.1.3). Durağan fazdaki *D. radiodurans* kültüründeki her bir hücre, genomunun 4 haploid kopyasını içermektedir. Bu durum, homolog rekombinasyona bağlı prosesler için oldukça fazla substrat sağlamaktadır [67]. Ekspansiyonel büyüme fazındaki hücrelerin herbirinin 8-10 haploid genomik kopya içermesi, radyasyonun DNA üzerinde meydana getirdiği hasarın tamirinde önemli bir avantaj sağlamaktadır [68]. Kapsamlı genomik analizler, deinococcal genomun hem fonksiyonu tanımlanamayan yaklaşık 1000 kadar gene sahip olduğunu, hem de DNA tamiri ve replikasyonu kodlayan genleri içeren çok tipik bakteriyel genlerin varlığını saptamıştır [69]. *D. radiodurans*’da kodlanan bilinen DNA tamir genlerinin sayısı diğer

Escherichia coli ve *Bacillus subtilis* gibi nispeten radyasyona duyarlı prokaryotlarınkinden daha azdır. *D. radiodurans*'da bulunan çeşitli genler, ökaryotlar ve arkeik bakterilerde de belirlenmiştir [69]. Bu ortak genlerin horizontal gen transferiyle gerçekleştiği düşünülmektedir. Horizontal gen transferinin, bakteriler ve arkeaların evriminde çok önemli bir role sahip olduğuna inanılmaktadır [70]. *D. radiodurans* ekzojen kaynaklı DNA ile yüksek oranda transforme olabilme özelliğine sahiptir. DNA'nın bu eğilimi, onun evriminde de oldukça önemli olduğunu düşündürmektedir.

Çizelge 1.8.2.1.3 *Deinococcus radiodurans*'ın genom boyutunun ve % G+C oranının diğer türlerle ilişkisi.

	Genom Boyutu(Mb)	% G+ C
<i>D.radiodurans</i>	3.25	66,6
<i>E.coli</i>	4.64	50,8
<i>B.subtilis</i>	4.21	43,5
<i>Synechocystis</i>	3.57	47,7
<i>M. tuberculosis</i>	4.41	65,6



Şekil 1.8.2.1.3. *Deinococcus radiodurans*'ın 415 kb'lık kromozom haritası.

1.8.2.1.4. *D.radiodurans*'ın DNA Zararına Ekstrem Direnci

Çift zincir kırıklarının (DSBs)'nin, DNA'nın lineer bütünlüğünü yıktığı için (kırık bölgelerdeki genetik bilgi kayıplarından dolayı) DNA da zarar meydana getiren en ölümcül olay olduğu düşünülmektedir [71,72]. *E. coli* her kromozomdaki DSBs'lerin az sayıda olanlarını tamir edebilme yeteneğine sahiptir. Halbuki *D. radiodurans* birkaç saat içinde her kromozomdaki > 100 DSB'i tamir edebilmektedir [73].

Ekspansiyel faz boyunca *E. coli* DSB tamirinde gerekli olduğu gösterilen genomunun 4-5 kopyasını muhafaza etmektedir. Fakat *D. radiodurans*'daki çoklu genom kopyaları bu olağanüstü direnci açıklamada yeterli olmamaktadır. Örneğin; *Azotobacter vinelandii*, *Micrococcus luteus* ve *Micrococcus sodonensis* bakterileri de, çoklu genom kopyalarının tümünü içermesine rağmen nispeten radyasyona duyarlıdırlar [74]. *D. radiodurans*'ın direnç mekanizmasının anlaşılmasında son on yıldan fazladır çalışılmasına rağmen genetik tamir sistemleri hala tam olarak tanımlanamamıştır. Rec A bağımlı rekombinasyon mekanizmaları deinococcal geri dönüşümünde çok önemlidir [75], fakat bunun diğer bakterilerin Rec A ile benzer olması çoğu sorunun çözümlenemedi kalmasına sebep olmuştur. *D. radiodurans*'daki DNA tamir sistemini tanımlamadaki eksiklik onun canlı kalma yeteneğinden sorumlu 3 farklı görüşün ortaya çıkmasına sebep olmuştur [76].

- ❖ Genomik ifade ile tahmin edilen genler arasında yeni tamir fonksiyonlarını kodlanmaktadır [77].
- ❖ *D. radiodurans* geleneksel tamir yollarını diğer bakterilerden daha etkili bir şekilde kullanmaktadır [78].
- ❖ *D. radiodurans*'daki DNA tamiri halkasal kromozom yapısı sayesinde daha kolay olmaktadır [79].

1.8.2.1.5. Radyasyona Direnç Fenotipinin Evrimi

Deinococcaceae familyasını oluşturan 7 türden en çok karakterize edilen *D. radiodurans*'dır. Bu mikroorganizmanın dikkate değer direnç mekanizmasını açıklayan ortak görüş, onun alışılmadık etkili bir DNA tamir yolunu kullanmasıdır [80]. Yeryüzünün yıllık doğal radyasyon kaynaklarına (kozmetik ve yeryüzü kaynaklı) maruz kalma oranının 0,0005-0,0024 Gy/yıl olduğu tahmin edilmektedir. (Birleşmiş Milletler

Atomik Radyasyonun Etkisi Bilimsel Komitesi 1982, 2000) Bu radyasyon seviyeleri, *Deinococcus*'un gelişebildiği doz aralığı ile (60 Gy/ saat) karşılaştırıldığında oldukça düşüktür [81]. *D. radiodurans* gibi organizmaların evrimini açıklamak için iyonize radyasyonun etkili seviyelerini üreten doğal çevreler bilinmemektedir [82,83].

D. radiodurans, DNA'da meydana gelen zincir kırıklarını temelde enzimatik olarak tamir etmektedir. 1996 'da Daly ve Minton DNA tamirinde genel olarak 12- 24 saat içinde tamamlanan 2 basamaklı bir tamir mekanizması tespit etmişlerdir:

- 1- Tek iplik bağlanması olarak adlandırılan prosesle kırılan kromozom parçalarının yeniden bağlanması (Ekzisyonel tamir),
- 2- Modifiye olmuş Rec A proteininin çift iplik kırıklarını yamadığı Homolog rekombinasyon proses.

Kurumanın zararlı etkisine karşı koruma mekanizması, filogenetik olarak yüksek bir oranda kurumaya dirençli olan *Enterococcus sp.*, *Lactobacillus sp.*, ve *Arthrobacter sp* [85] gibi mikroorganizmalarda da ortaya çıkarılmıştır [84]. Bu organizmaların aynı zamanda iyonize radyasyona da dirençli olduğu bilinmektedir. Fakat onların dönüşüm yetenekleri *D. radiodurans* ile kıyaslandığında sistematik olarak yetersiz kalmaktadır. Bakterinin radyasyona ve kuraklığa olan cevabında mikroarray yöntemi kullanılarak yapılan çalışmalarda yeni tamir genleri araştırılmış ve çift zincir kırıklarının RecA- bağımlı ve RecA- bağımsız yollarla tamirinde radyasyon sonrası 72 genin indüklendiği tespit edilmiştir. Bu genlerin 33'ü radyasyonu takiben indüklenmiş, bilinmeyen fonksiyonları olan proteinleri kodlayan 5 gen ise, her iki stres durumuna cevapta indüklenmiştir. (ddrA, ddrB, ddrC, ddrD ve pprA) [86].

D. radiodurans'ın DNA tamirinde rol oynayan proteinler aşağıdaki Çizelge 1.8.2.1.5' de verilmiştir:

Çizelge 1.8.2.1.5. *D.radiodurans*'ın DNA tamirinde rol oynayan proteinler [86].

Protein	İomolog Bölgesi	Tanımlanma %'si	Benzerlik %'si
Ligaz	11-660/671 <i>E.coli</i> ,29-681/708 <i>D.radiodurans</i>	42	57
Pol A	5-024/928 <i>E.coli</i> , 43-952/965 <i>D.radiodurans</i>	35	40
Pri A	202-729/731 <i>E.coli</i> , 404-922/924 <i>D.radiodurans</i>	26	42
RecA	4-324/353 <i>E.coli</i> , 16-336/362 <i>D.radiodurans</i>	57	72
Rec D	30-598/609 <i>E.coli</i> , 218-705/716 <i>D.radiodurans</i>	27	40
Rec F	3-330/358 <i>E.coli</i> 6-326/360 <i>D.radiodurans</i>	28	43
Rec G	6-693/694 <i>E.coli</i> , 107-777/785 <i>D.radiodurans</i>	39	53
Rec J	68-570/579 <i>E.coli</i> , 3-461/685 <i>D.radiodurans</i>	34	51
Rec N	2-553/553 <i>E.coli</i> , 34-564/564 <i>D.radiodurans</i>	31	49
Rec O	7-157/242 <i>E.coli</i> , 10-159/224 <i>D.radiodurans</i>	18	34
Rec Q	9-600/609 <i>E.coli</i> , 8-605/824 <i>D.radiodurans</i> :557- 605/608 <i>E.coli</i> , 680-728/824 <i>D.radiodurans</i> :549-606/608 <i>E.coli</i> , 768-825/824 <i>D.radiodurans</i>	46, 36, 33	63, 64, 59
Rec R	1-199/202 <i>E.coli</i> , 1-196/220 <i>D.radiodurans</i>	42	55
Ruv A	1-199/203 <i>E.coli</i> , 1-197/201 <i>D.radiodurans</i>	33	49
Ruv B	13-332/337 <i>E.coli</i> , 2-321/333 <i>D.radiodurans</i>	56	75
Ruv C	4-168/174 <i>E.coli</i>	33	51
Sbc C	27-1032/1049 <i>E.coli</i> , 22-896/909	21	35
Sbc D	1-203/400 <i>E.coli</i> 24-319/417 <i>D.radiodurans</i>	28	46

D. radiodurans üzerinde yapılan ilk çalışmalar radyasyona duyarlı mutantların aynı zamanda kuraklığa da duyarlı olduğunu göstermiş ve bu durum, iki fenotip arasında güçlü korelasyon olduğunu desteklemiştir [83].

Bakteriyi radyasyona böylesine dayanıklı kılan bir başka özellik de hücre içersindeki Mn / Fe oranıdır. Yapılan araştırmalarda Mn/ Fe oranının 1 den büyük olduğu durumlarda radyasyonun neden olduğu çift zincir kırıklarının onarımının UV endonükleaz-Mn bağımlı proteinler ile daha etkili bir şekilde gerçekleştiği bulunmuştur [90]. Ayrıca *D. radiodurans*'ın hücrelerinde yüksek oranda Mn(II) biriktirdikleri tespit edilmiştir. Hücrelerdeki bu yüksek Mn(II) oranının da radyasyonun meydana getirdiği reaktif oksijen türlerine karşı bakteriyi koruyucu bir rol üstlendiği düşünülmektedir [86].

D. radiodurans'ın yüksek dozda iyonize radyasyonda canlı kalma yeteneği ve onun radyoaktif atıkların biyoremediasyonu için potansiyel olarak kullanımı bu organizmanın bütün genom dizisi için zor bir olaydır [64-65]. *Deinococcus radiodurans*'ın iyonize radyasyona maruz kaldıktan sonra yüzlerce DNA çift zincir kırıklarını oluşturabilen genetik hasara karşı geliştirdiği direncinin biyokimyasal temeli hakkında çok az şey bilinmektedir. Ancak son çalışmalar bakterinin, DNA zincir kırılmalarının potansiyel hasarından korunmak için geliştirdiği adaptasyonlar sırasında aşırı DNA zararının bedelini de ödediğini göstermiştir. *D. radiodurans*, genetik bütünlüğünü korumak amacıyla radyasyona maruz kaldığı müddetçe oluşan DNA fragmentlerinin difüzyonunu ve degradasyonunu kısıtlayan mekanizmalar kullanmaktadır. Bu mekanizmalar aynı zamanda DNA tamir proteinlerinin etkisini artırmaktadır [86].

Deinococcus radiodurans'ın direnç fenotipinde, bakterinin etkili bir antioksidan enzim sistemine sahip olması da önemli rol oynamaktadır [87]. Radyasyonun hücrede meydana getirdiği reaktif oksijen türleri sonucu oluşan oksidatif stres bakteride çok etkin bir şekilde çalışan bu antioksidan enzimlerle ortadan kaldırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda *Deinococcus radiodurans*'ın özellikle süperoksit dismutaz ve katalaz enzimlerinin logaritmik üreme fazında oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir [88,89]. Katalaz ve SOD gibi enzimler aerobik hücrelerde süperoksit radikallerine ve hidrojen peroksite karşı savunmadan sorumludur [34]. Katalaz, hücreleri radikallere karşı korumada SOD enzimi ile birlikte çok önemli bir görev yüklenmiştir. *D. radiodurans* genomu; 2 tip CAT ve 2 tip SOD kodlayan genlere sahiptir (CAT X, CAT E, SOD A, SOD C).

Genotoksik kimyasallara, UV radyasyona ve dehidrasyona karşı ekstrem dayanıklılığının olması gibi çok sayıda dikkate değer özelliklerinden dolayı dünyanın en dayanıklı bakterisi olarak tanımlanan *D. radiodurans* bakterisiyle yapılan çalışmalar daha çok onun genetiği ve biyoremediasyon çalışmalarındaki kullanımı ile sınırlıdır. İyonize radyasyonun bakteride meydana getirdiği oksidatif stres ve bu oksidatif strese bağlı olarak meydana gelen reaktif oksijen türleri ve bu reaktif oksijen türlerini ortamdaki temizleyen antioksidan savunma sistemleri hakkındaki çalışmalar oldukça az sayıdadır. Bu yüzden bizim bu çalışmadaki amacımız, *D. radiodurans* bakterisinin iyonize radyasyona bağlı olarak oluşan reaktif oksijen türlerini ortadan kaldıran antioksidan enzim aktivitelerini ve GSH miktarlarını saptamak, bunların bakterinin dayanıklılığındaki etkisini araştırmak ve bu sonuçları, radyasyona daha dayanıksız bir bakteri olan *Escherichia coli* ile karşılaştırarak bu konudaki az sayıda olan çalışmalara bir yenisini daha eklemektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Deinococcus radiodurans, yüksek yapılı organizmaların tolare edebildiğinden daha fazla ekstrem çevresel duruma direnç göstererek, böyle formların yaşamının temeli olan DNA 'nın korunabilmesinde önemli rol oynamaktadır. Bakteri ilkel dünya koşullarındaki yeryüzünün ve buralardaki yaşamın evrimine ışık tutmaktadır [90].

2.1. Çevre Biyoteknolojisi için Radyasyona Dirençli Bakterinin Mühendisliği İle İlgili Çalışmalar

Yeryüzünde kirlilik oluşturan unsurlardan biri de radyoaktif atıklardır. Nükleer reaktörlerin çok olduğu ülkelerde, özellikle Amerika Birleşik Devletleri'nde çok miktarda radyoaktif atık su altında geçici olarak depolanmakta ve sonsuza kadar saklanacağı yere götürülmeyi beklemektedir. Uygun depolama yerleri jeolojik bakımdan binlerce, onbinlerce yıl kararlı olmalıdır. Bu tür yerlerin seçimi günümüzde büyük tartışmalara neden olmaktadır [91].

1992'de Birleşmiş Milletler Enerji Departmanı Amerika' da 3000 kontamine olmuş alandan 91 'ini çalışmış, bu atık alanlardaki en önemli kontaminantlar toprak da ve yeraltı sularında tespit edilmiştir. ²³⁵Uranyum(γ, α), ²³⁸Plutonym(α), ⁹⁹Teknetiyum (β), ⁹⁰ Strontiyum(β) ve ¹³⁷Sezyum(γ, β) gibi radyoaktif çekirdekler, krom, kurşun civa gibi metaller ile toluen ve trikloroetilen gibi organik bileşikler bu alanlarda yüksek oranlarda bulunduğu saptanmıştır. Böyle alanlardaki yüksek radyasyon seviyeleri uzun vadede canlı organizmalar üzerinde oldukça zarar vericidir ve sıklıkla hücre ölümleriyle sonuçlanmaktadır. Bu atık alanların temizlenmesi için kullanılan yöntemler oldukça maliyetlidir. Bundan dolayı bu alanlar metalik ve organik kirleticileri yıkabilen özel mikroorganizmaları kullanan biyoremediasyon teknolojisi için potansiyel birer hedef olmaktadır. Fakat mikrobiyal tekniklerin bu amaçla kullanımı için ilk olarak, yüksek oranda radyoaktif atıkların bulunduğu alanların temel arıtımı ve radyasyon stresi altındaki fonksiyonları ile canlı kalma yetenekleri belirlenmelidir, ikinci olarak, basit araştırmaların çevreye zarar veren ve halk sağlığı için tehdit unsuru oluşturmayan biyoremediasyon sistemlerini oluşturma yeteneği tespit edilmelidir [4].

Shewanella ve *Pseudomonas* spp. gibi bakterilerin çeşitli metalik ve organik kirleticileri transforme, detoksifiye yada immobilize etme yetenekleri çalışılmıştır [92,93]. Fakat çoğu bakteri gibi bu bakteriler de radyasyonun zararlı etkilerine duyarlıdır ve bu nedenden dolayı da bunların biyoremediasyonda kullanımları ancak çok düşük radyasyon seviyelerinin olduğu yerlerle sınırlıdır. Mikrobiyal tekniklerin gelişmesiyle birlikte radyasyon seviyelerinin yüksek olduğu yada buralara yakın alanlarda bu organizmaların, kirleticilerin çevreye yayılmadan önce stabilizasyon ve dekontaminasyon amacıyla kullanılması uygun hale gelmiştir. Bundan dolayı radyasyona dirençli bakteriler çevresel arıtım için kullanılabilir. Bu amaçla kullanılacak olan radyasyona dirençli organizmaların çoğu patojendir ve genetik manipulasyon için geliştirilen sistemlerinin çoğu eksiktir [94]. *Enterococcus faecium* ve *Alcaligenes* spp. gibi birkaç vejetatif bakteri radyasyona yüksek direnç göstermiştir [95]. Fakat bunların çoğu patojen olduğundan dolayı biyoremediasyon için uygun olmamaktadır. Deinococcaeae familyasına ait bakteriler radyasyona dirençli olmaları, vejetatif olmaları, kolay kültüre edilebilmeleri ve patojen olmamaları nedeniyle dikkat çekmektedir [96]. Deinococcaeae familyasına ait yedi tür tanımlanmakla birlikte, *Deinococcus radiodurans* bunlardan genetik transformasyonu ve manipulasyonu geliştirilen bakterilerden sadece biridir [97].

Brim vd. (2006) toluen ve diğer hidrokarbonların yıkımını tamamlamak için ağır metaller içeren bu ortamlardan Cr (IV)'un indirgemesinde *Deinococcus radiodurans*'ı kullanmıştır. *D. radiodurans* Cr(IV)'u daha az toksik olan Cr(III)' e doğal olarak indirgeyebilmektedir. Toluenin yıkımı için *Pseudomonas putida*'dan tod ve xyl genleri bakteriye klonlanmış ve rekombinant Tod/xyl soyunun ¹⁴C etiketli toluenin karbon dioksit ve hücrel makromoleküllerle birleştiği gösterilmiştir. Bakterinin kronik iyonize radyasyon varlığında veya yokluğunda kompleks besi veya minimal ortamlarda tolueni oksidize edebildiği ve Cr(IV)'u indirgeyebildiği ve Cr(III) 'e dönüştürebildiğini saptamışlardır [98].

Gao vd. (2003) *Deinococcus radiodurans*'da radyasyona dirençte rol oynayan pprI genini *Escherichia coli*'ye aktararak bakterinin radyasyona olan direncini arttırmayı hedeflemişlerdir. *D. radiodurans* pprI proteinini kodlayan gen *E. coli*'ye transfer edilmiş ve sonuçta bakterinin γ radyasyonun yüksek seviyelerine 1,6 kez daha dirençli olduğu tespit edilmiştir. *E. coli*' de Deira-pprI'ın sentezi, iyonize radyasyonun yüksek dozlarını takiben RecA'nın sentezinde önemli bir artış meydana getirmiştir. Deira pprI sentezleyen *E. coli*'de antioksidan enzimlerin de seviyeleri ölçülmüş ve bu

proteinin sentezinin Kat G 'nin enzimatik aktivitesini indükleyerek serbest radikallerin zararlı etkisinden korunma yeteneğini arttırdığı saptanmıştır [99],

Deinococcus radiodurans R1 soyunun Fe(III), Cr(IV), U(VI) ve Tc(VII) gibi metalleri indirgeme kapasitelerini araştıran Frederickson vd. bu amaçla anaerobik koşullar altında kültüre bu metalleri indirgemek için elektron alıcı ve verici substratlar ilave etmişlerdir. Fe(III) için kültür ortamına 10 mM Fe(III)-NTA(nitrilo asetik asit) ve 10 mM laktat eklenmiştir. Cr(IV), U(VI) ve Tc(VII) metalleri için laktat ve Antraquinon-2,6-disülfonat (AQDS) içeren ortamlar geliştirilmiştir. *D. radiodurans* R1, Fe(III)-nitrilotriasetik asit, laktatı CO₂ ve asetata okside etmiş, fakat bu ortamda humik asit analogu AQDS varlığında *D. radiodurans*'ın üremesi engellenmiştir. *D. radiodurans*'ın, Fe(III), U(VI) ve Tc(VII) 'i 0.1 mM AQDS varlığında okside ettiği saptanmıştır. Cr(VI), ortamda AQDS varlığında indirgeme oranı daha yüksek olmasına rağmen laktat içeren anaerobik bir kültürde direkt olarak indirgenmiştir. Bu sonuçlar *D. radiodurans*'ın laktatın veya diğer organik bileşiklerin oksidasyonu ile Fe(III)'i indirgeyebildiğini ayrıca humik asit veya sentetik elektron verici ajanların kombinasyonu ile U ve Tc' i de indirgeyebildiği tespit edilmiştir. Bundan dolayı iyonize radyasyonla muamele olmuş radyonuklid içeren alanlarda metal remediasyonunun potansiyel uygulanabilirliği kanıtlanmıştır [100],

Minton vd. (2000) *Escherichia coli*'den merA geni transfer edilmiş *Deinococcus radiodurans*'ın radyoaktif alanlardaki Hg'i indirgeyebilme kapasitesini araştırmışlardır. Bu amaçla yüksek oranda karakterize edilen merA geni *Escherichia coli*' den *D. radiodurans*'a klonlanmıştır. merA geni tarafından kodlanan Civa redüktaz enzimi, yüksek oranda toksik ve tiyol reaktifi Hg(II)'i daha az toksik olan, elementsel olarak kararlı ve uçucu Hg(0) formuna dönüştürmektedir. *D. radiodurans*'da merA geninin dört farklı sentez sistemi geliştirilmiş ve çeşitli hücresel gen düzeylerinde regulasyonları sağlanmıştır. MerA sentezleyen *D. radiodurans* soylarının 6000 rad/saat dozda ve 30–50 µM Hg(II) varlığında civanın bakteriosidal etkisine karşı direnç gösterdiği saptanmıştır. Elde edilen bu soyların yüksek düzeyde Hg ve radyasyonlu atık alanlarında gelişebildiği gösterilmiş ve HgII 'yi etkili bir şekilde daha az toksik olan, buharlaşabilen Hg(0) elementine dönüştürdüğü tespit edilmiştir [101].

Suzuki vd. (2004) *Deinococcus radiodurans*' ın Uranyuma direncini ve bu metali akümüle etme kapasitesini çalışmışlardır. Bu amaçla hücreler, pH= 4 olan ve 80 ppm U(VI), UO₂²⁺ formda solusyonda 1 saat boyunca inkübe edilmiş ve *D. radiodurans*'ın UO₂²⁺ 'in kimyasal toksisitesini, ekstraselüler olarak uranil fosfat

mineralinin nano kristalleri şeklinde depolayarak elimine ettiğini tespit etmişlerdir. Bunun muhtemelen hücre lizisi boyunca fosfat salınmasının bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmayla toksik organik bileşikler ve radyonüklidlerle kontamine olmuş alanlarda bakterinin doğal biyoremediasyonu gösterilmiştir [102].

2.2. *Deinococcus radiodurans* ve Antioksidan Enzim Sistemi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Yapılan bir çalışmada Melin vd. (1997) *Deinococcus radiodurans*'ın farklı soylarının oksidatif zarara karşı duyarlılıklarını araştırmışlardır. Bu amaçla kültür ortamına farklı konsantrasyonlarda hidrojen peroksit, bakır sülfat, ve askorbik asit gibi oksidanlar eklenmiştir. *Deinococcus radiodurans*'ın kırmızı pigmentli (yabanıl) ve renksiz mutant soylarında antioksidan enzimleri ve vitamin düzeylerindeki değişimler karşılaştırılmıştır. Buna göre farklı oksidanların yüksek konsantrasyonlarına bağlı olarak pigmentli bakterinin SOD ve CAT aktivitesinin renksiz mutant soydan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca pigmentli bakterilerle renksiz mutant soyların, radikallerin letal etkisine karşı yüksek koruma sağlayan A ve E vitamini düzeyleri karşılaştırıldığında pigment içeren bakterinin, A ve E vitamini düzeylerinin renksiz bakteriden daha yüksek oranda bulunduğu saptanmıştır [103].

Chou ve Tan (1990) Mn(II)'nin *Deinococcus radiodurans*'ın hücre bölünmesi ile SOD ve CAT enzim aktiviteleri üzerindeki etkisini araştırmışlardır. *D. radiodurans*'ın durağan fazdaki kültürlerine 2,5 µM yada daha fazla Mn(II) eklenmesi sonucunda hücre bölünmesini en az 3 kat daha hızlı olduğu ve bu Mn- İndüklü hücre bölünmesi (Mn-CD) 'nin hücreler eksponensiyel yada litik fazda iken gerçekleşmediği tespit edilmiştir. Mn-CD'nin oluşan yeni hücrelerin boyutunda, pigmentasyon ve radyasyon direncinde bir azalmaya neden olduğu ancak hücrelerin süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan savunma enzimlerin miktarında bir artışın olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, hücre bölünmesinin Mn(II) duyarlı bir mekanizma ile kontrol edildiği ve Mn-CD etkisinin radyasyona dirençli *D. radiodurans* ve Mn(II) için spesifik olduğu tespit edilmiştir. [104],

Bing Tian vd. (2007) *Deinococcus radiodurans*'ın nokta mutasyon, kemuluminisans ve DNA zarar analizleri gibi yöntemlerle karetenoidlerin antioksidan etkisini araştırmışlardır. *D. radiodurans*'daki karetenoidlerin antioksidan etkisinin saptanması için, çevresel stres durumları altında hücrelerin canlılığının korunmasında

önemli olan karetenoidlerin sentezini bloke eden fitoen sentaz geninin mutasyonu ile yapılmıştır. *D. radiodurans*'ın renksiz R1Δcrt B mutantının, karetenoidleri sentezleyemediği ve iyonize radyasyona, hidrojen peroksite ve kuraklığa karşı yabanıl tipten daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Kemuluminisans analizleri, karetenoid sentez yolunda önemli bir ürün olan deinoksantin'in, H₂O₂'e ve tekil oksijene karşı likopen ve β-karoten gibi karetenoidlerden ve zeaksantin ve lutein gibi ksantofillerden daha güçlü bir şekilde korunduğu saptanmıştır. Deinoksantin ayrıca DNA üzerinde de koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular deinoksantin güçlü antioksidan etkisinin *D. radiodurans*'ın direncine katkıda bulunduğunu desteklemektedir [55],

Markillie vd. (1999) radyasyona dirençli *Deinococcus radiodurans* bakterisinde duplikasyon mutasyon ile radyasyona duyarlı süperoksit dismutaz (sodA) ve katalaz (cat A) mutantlarını oluşturarak bu mutantların enzim aktivitelerini araştırmışlardır. Bu çalışmada, *D. radiodurans*'da her hangi bir hedef geni inaktive etmek için bir genel ve bir basit metodla sod ve cat mutantlarını oluşturmak amacıyla plazmit ve soylarını kullanmışlardır. Sonuçta, sodA ve catA mutantlarının iyonize radyasyona yabanıl tipten daha duyarlı oldukları kanıtlanmıştır [105].

Yapılan bir çalışmada Song vd. (2000) *Deinococcus radiodurans*' da süperoksit dismutaz ve katalaz enzimlerinin indüklenme durumlarını araştırmışlardır. Enzimlerin indüklenme durumlarını saptamak amacı ile *D. radiodurans*, artan dozlarda (6.10^{15} ile 8.10^{14} iyon/cm² - 8.10^{14} iyon/cm²) N⁺ ışınlarına maruz bırakılmış ve buna bağlı olarak hücrelerdeki SOD ve CAT enzimi arasındaki değişim karşılaştırılmıştır. Buna göre N⁺ ışını ile maruz bırakılan örneklerde enzim aktivitelerinde bir artışın olduğu saptanmıştır. Özellikle hücrelerin Mn-SOD aktivitesinde artışlar tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bakterinin, oksidasyonun zararlı etkisine karşı etkin bir savunma mekanizmasına sahip olduğunu ve Mn-SOD 'un indüklenebilir bir enzim olduğunu göstermiştir. Aynı çalışmada bakterilerin büyüme ortamlarına bir protein sentezi inhibitörü olan kloramfenikol eklenerek enzim aktivitelerindeki değişimler araştırılmıştır. Sonuçta kloramfenikol içeren ortamlardaki bakterilerin enzim aktivitelerinde bir artış gözlenmemiştir. Bu da *D. radiodurans*'ın oksidatif strese adapte olmak için de-novo protein sentezine ihtiyaç duyduğunu göstermiştir [106],

2.3. *Deinococcus radiodurans* 'ın Direnç Mekanizması ile ilgili Çalışmalar

Yapılan bir araştırmada *Deinococcus radiodurans*'ın intraselüler Mn/Fe düzeyi ve bu Mn/ Fe oranının bakterinin radyasyona olan direncindeki rolü araştırılmıştır. Mn/ Fe oranının 1 den büyük olduğu durumlarda radyasyonun neden olduğu çift zincir kırıklarının onarımının daha etkili bir şekilde gerçekleştiği bulunmuştur ve *D. radiodurans*'ın hücrelerinde yüksek oranda Mn(II) biriktirdikleri tespit edilmiştir. Yüksek Mn(II) oranının radyasyonun meydana getirdiği reaktif oksijen türlerine karşı koruyucu bir rol üstlendiği de rapor edilmiştir [86].

Daly ve Minton (1995) radyasyona dirençli *Deinococcus radiodurans* bakterisinde interkromozomal rekombinasyon üzerinde çalışmışlardır. Bu çalışmada in vivo radyasyon aracılığıyla interplazmidik tamir mekanizmasına katılan rekombinasyonel prosesler gösterilmiştir. Durağan fazdaki radyasyonla muamele edilmiş kromozomlar arasında interkromozomal rekombinasyon üzerine direkt çalışmalar yapılmış ve 1,75Mrad radyasyon (dört kromozomun 500 fragmentinde hasar meydana getiren doz) uygulanmasının sonucunda her kromozomda yaklaşık 175 kadar crossing-over meydana geldiği tespit edilmiştir. Aynı zamanda tamir boyunca meydana gelen crossing-overlerin çoğunun karşılıklı olmadığı saptanmıştır [107],

Heidi vd. (1996) sıra dışı ve etkili DNA tamir mekanizmasına sahip *Deinococcus radiodurans* bakterisinde *uvrA* geninin tanımlanması ve karakterizasyonu üzerinde çalışmışlardır. *D. radiodurans*'ın *mtcA* ve *mtcB* genlerinin her ikisinde eksizyon tamirle klonlanmış ve sıralanmıştır. Bunlar tek bir gen gibi davranarak diğer bakterilerdeki *uvrA* ile yüksek oranda homolog özellik göstermişlerdir. *Escherichia coli uvrA* geninin *mtcA* ve *mtcB* soylarında sentezi yapılmış ve bu genler hasarın onarılmasında yüksek oranda üretilmişlerdir. *D. radiodurans*'ın *uvrA* proteininin, bakterinin ekstrem DNA zararına direncinde gerekli olduğu fakat çok da etkili olmadığı saptanmıştır [108].

Yapılan bir çalışmada da, radyasyona dirençli *Deinococcus radiodurans* SARK 'da yüksek oranda korunmuş tekrarlı diziler araştırılmıştır. *LacZ* geniyle rastgele kromozomal gen füzyonunu oluşturmak için *D. radiodurans* SARK'da transformasyonun kullanıldığı bir metod geliştirilmiştir. Gen füzyonlarının çeşidi *D. radiodurans*'ın DNA' ya zarar veren Mitomisin C'nin varlığında indüklendiği saptanmıştır. Klonlanan mitomisin C ile indüklenen gen füzyonu (Pel21)'dan SARK DNA fragmenti SARK genomik DNA'ya southern blot tekniğiyle hibridize edilmiştir.

Buna göre elde edilen sonuçlar tekrarlı dizilerin varlığını desteklemiştir. *LacZ* ile birlikte bulunan bu terminatörlerde 7 tane translasyonel başlatıcı kodon bulunmuştur. İki ATG, ikisi GTG, üçü TTG ve biri ATG şeklinde olan bu kodonların Shine-Dalgarno dizileriyle benzer olduğu tahmin edilmektedir [109].

Bir çalışmada, *Dinococcus radiodurans*'ın iyonize radyasyona ve kuraklığa olan cevabında indüklenen yeni genlerin analizi mikroarray yöntemiyle yapılmıştır ve yeni tamir genleri araştırılmıştır. Çift zincir kırıklarının RecA- bağımlı ve RecA- bağımsız yollarla tamirinde radyasyon sonrası 72 genin indüklendiği tespit edilmiştir. Bu genlerin 33'ü radyasyonu takiben indüklenmiştir, bilinmeyen fonksiyonları olan proteinleri kodlayan 5 gen ise, her iki stres durumuna cevapta da indüklenmiştir (ddrA, ddrB, ddrC, ddrD ve pprA). Genetik analizler, iyonize radyasyonda direnci etkileyen 3 epistasi grubunu tanımlamıştır. Bu lokuslardan ikisi (ddrA ve ddrB) farklı RecA bağımsız proseslerle radyasyona dirence katkıda bulunmaktadır. Bu yeni lokusların tanımlanması *D. radiodurans*'ın radyasyon sonrasında genom tamirinde önemli rol oynayan yeni mekanizmaların varlığını göstermiştir [110].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada, oksidatif zarara, genotoksik kimyasallara, iyonize ve UV radyasyonun yüksek seviyelerine ve kurumaya karşı ekstrem olarak direnç gösteren *Deinococcus radiodurans RI* (ATCC BAA-816) ile *Escherichia coli* (ATCC 35215) bakterileri, farklı γ radyasyon dozlarına maruz bırakılmış ve radyasyonun bu bakterilerin antioksidan enzim seviyelerinde meydana getirdiği değişiklikler ve radyasyon dozuna bağlı olarak bakterilerin canlı kalma yüzdeleri tespit edildi.

3.1. Araştırmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Bu çalışmada Enterik bakterilerden Gram (-) bir bakteri olan *Escherichia coli* ile radyasyona dirençli Deinococcaaceae familyasına ait Gram (+) bir bakteri olan *Deinococcus radiodurans RI* bakterisi kullanıldı (Şekil 3.1). Her iki bakterinin de bilimsel sınıflandırılması aşağıdaki gibidir.

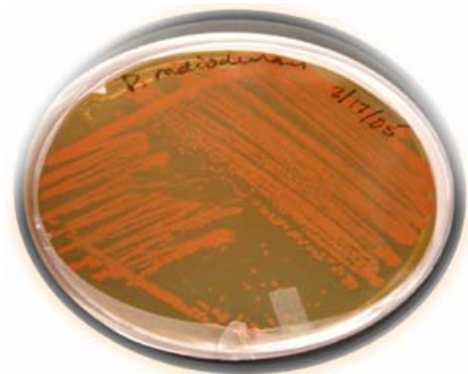
Alem: Eubacteria
Şube: Proteobacteria
Sınıf: Gamma Proteobacteria
Takım: Enterobacteriales
Familya: Enterobacteriaceae
Cins: Escherichia
Tür: *Escherichia coli*

Alem: Eubacteria
Şube: Deinococcus-Thermus
Takım: Deinococcales
Familya: Deinococcaceae
Cins: Deinococcus
Tür: *Deinococcus radiodurans*

a)



b)



Şekil 3.1. a) *Escherichia coli*

b) *Deinococcus radiodurans*

3.2. Araştırmada Kullanılan Besiyerleri

Çalışmamızda *Escherichia coli*' nin büyüme ortamı olarak zengin bir besi ortamı olan Luria-Broth (LB) ve Luria-Agar (LA) (pH 7.0), *Deinococcus radiodurans* 'ın büyüme ortamı olarak da bu bakterinin kendi özel besi ortamı olan TGY agar (Trypton Glukoz Yeast Agar) ve TGY broth (Trypton Glukoz Yeast broth) (pH:7,5) kullanıldı.

Her iki besiyerinin içeriği Çizelge 3.2.1. ve Çizelge 3.2.2.'de verilmiştir. Besiyerleri 250 ml kapasiteli erlenlerde 50ml besiyeri olacak şekilde 30 dakika 121°C'de 1 atm basınç altında otoklavize edildi.

Çizelge 3.2.1. Luria-Broth (LB) Besiyerinin İçeriği (g L⁻¹)

★ NaCl	10
★ Pepton	10
★ Yeast ekstrakt	5

Çizelge 3.2.2. TGY Broth Besiyerinin İçeriği (g L⁻¹)

★ Trypton	10
★ Yeast Ekstrakt	5
★ Glukoz	1

Bu sıvı besi yerlerinin içine 15g L⁻¹ agar ilave edilerek katı besiyerleri elde edildi.

3.3. Araştırmada Kullanılan Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan TGY agar besiyeri Sigma firmasından, Luria broth ve Luria agar besiyerleri ise Acumedia firmasından temin edildi. Ksantin, ksantin oksidaz, sitokrom-c, GSH (Redükte Glutatyon), GSSG (Okside Glutatyon), BSA (Bovine Serum Albumin), DTNB (5-5' ditiyobis 2-nitro-benzoik asit), GSSG-redüktaz (Glutatyon Redüktaz), SOD (Süperoksit Dismutaz), NADPH (Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat) ve NaOH Sigma'dan KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , EDTA (Etilen daimintetraasetik asit) ve H_2O_2 ise Merck firmasından temin edildi.

3.4. Bakteri Stoklarının Hazırlanması

Bu çalışmada kullandığımız bakterilerden *E. coli* LB agar ve *D. radiodurans* TGY agar içeren petrilere üretilmiş ve +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Buzdolabında saklanan bakterilerden steril şartlar altında öze ile alınarak Bölüm 3.2.' de anlatıldığı gibi hazırlanan Luria broth (50/250ml) ve TGY broth (50/250ml) içeren erlenlere ekimi yapılmıştır. *E.coli* 37 °C ve 150 rpm'de, *D. radiodurans* ise 32 °C'de ve 200 rpm'de çalkalamalı olarak üretildi. Üretilen bu stok kültürler bir gece inkübasyonun sonunda alınarak LB ve TGY broth besiyeri içeren erlenlere 1ml/50ml olacak şekilde ekimleri yapılmıştır. Daha sonra bu kültürler deneyin sonraki aşamalarında amaca uygun olarak kullanıldı.

3.5. Bakterilerin Üreme Eğrilerinin ıkartılması:

Bakteriler aktif canlılardır. Uygun bir çevresel ortamda sürekli olarak metabolizmaları devam etmektedir. Bakteriler belirli bir büyüklüğe ulaşınca ikiye bölünürler ve bu şekilde çoğalmaktadırlar. Bir bakteriden iki yeni bakteri oluşumuna kadar geçen süreye generasyon zamanı denir ve oluşan her yeni bakteriden iki yeni bakteri daha oluşmaktadır. Böylece oğalma sırasında oluşan her yeni bakteri topluluğu bir öncekinin iki katı kadar bakteri içermektedir.

Bu çalışmada öncelikle bakterilerin üreme eğrilerini saptamak amacıyla; *Deinococcus radiodurans* ve *Escherichia coli* bakterileri için sırasıyla TGY broth ve Luria broth besiyerleri hazırlandı, otoklavize edildi ve steril koşullar altında bakterilerin ekimi yapılarak stok kültürler oluşturuldu. Bu stok kültürlerden taze

hazırlanan besi yerlerine 1/50 ml olacak şekilde ve her bakteri için üç tekrarlı olmak koşuluyla ekimler yapıldı ve 0. saatten itibaren başlayarak 32. saate kadar her saat başı, 32. saatten sonrada her 2 saatte bir 72. saate kadar 600 nm'de absorbanslar okundu. Bu absorbans değerlerine bağlı olarak her iki bakteri için elde edilen sonuçlara göre üreme eğrileri saptandı. Aynı zamanda her iki bakteri için canlı hücre sayımı da yapılarak üreme eğrisi için elde edilen absorbans değerleri desteklendi.

3.6. Canlı Hücre Sayımının Yapılması

Radyasyona maruz kalan bir organizmanın canlı kalma yeteneği, tipik olarak radyasyon uygulanmış kültürlerin uygun dillüsyonlar kullanılarak agar içeren plaklarında canlı kalan hücrelerin sayılmasıyla belirlenmektedir

Çalışmamızda kullandığımız *D. radiodurans* ve *E. coli* bakterileri için hem radyasyon uygulamasından önce hem de radyasyon uygulamasından sonra canlı hücre sayımları yapıldı ve buna bağlı olarak da radyasyon uygulaması sonrası canlı kalan hücrelerin yüzdesi hesaplandı. Canlı hücre sayımında kullanılmak üzere her iki bakteri türü için stok kültürler ve seri sulandırma için de %0,09 NaCl içeren serum fizyolojik ve yine her bakteri için steril koşullarda Luria agar ile TGY agar dökülmüş plaklar hazırlandı. Hazırlanan serum fizyolojik 15ml'lik tüplere, her tüpe 10ml olacak şekilde aktarıldı. Seri sulandırma 5 tüp üzerinden yapılmıştır. Her iki bakteri için stok kültürlerden belli miktarlarda alınarak önce 1. tüpe sonra bu tüp karıştırıldıktan sonra 2. tüpe, 2. tüpten 3, 4 ve 5. tüpe aktarılmış ve canlı hücre sayımı 3. 4. ve 5. tüplerden 2 farklı konsantrasyonda (5 µl ve 10 µl) alınan miktarların plaklara ekilmesi ile yapıldı.

3.7. Bakterilerin Radyasyona Maruz Bırakılması

Bu çalışmada Theratron 1000E model Kobalt-60 teleterapi cihazı kullanılmıştır. Kobalt-60 cihazı, eksternal radyoterapi uygulamalarında kullanılan (Co^{60}) yapay radyoaktif bir kaynakla çalışan tedavi cihazıdır. Kaynağın yarılanma ömrü: 5,26 yıldır. Yayılan γ -ışınlarının enerjileri: 1,17 MeV ve 1,33 MeV'dir. Genelde kobalt-60 cihazının enerjisi bu iki enerjinin ortalaması olan 1,25 MeV olarak alınmaktadır ve bu enerji, çok derinde olmayan tümörlerin tedavilerinde kullanılmaktadır (Şekil 3.7.1).

Kobalt-60 cihazından elde edilen 1,25 MeV γ -ışını ile ışınlanan ışın alanı (A)= 43,5x43,5 cm² (maksimum alan büyüklüğü), tedavi cihazının kafası= Gantry(G) = 0°, kolimatör (C) = 0°, SSD = 45 cm, derinlik(d) = 5 cm ışınlama koşullarında 30, 60, 90, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 ve 10000 Gy değerleri için yapılan doz hesabı ile ışınlama yapıldı.



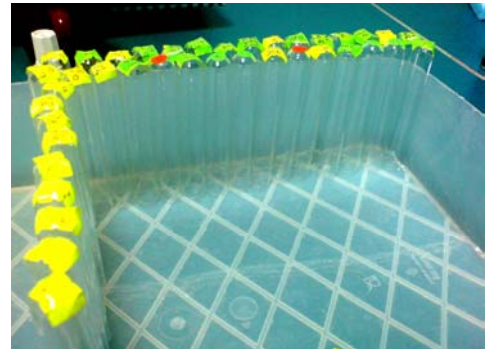
Şekil 3.7.1. Radyasyon uygulamasında kullanılan Kobalt-60 cihazı.

Deneyin bu aşamasında; yine her iki bakteri için stok sıvı kültürler hazırlandı ve bu kültürlerden, taze hazırlanan sıvı besiyerlerine steril şartlarda ekimler yapılarak logaritmik faza kadar üretildi (*E.coli* için 7. saat, *D. radiodurans* için 14.saat). Logaritmik faza gelen bakteriler radyasyon uygulaması için uygun tüplere yerleştirildi. *E.coli*'de enzim aktivitesi ölçmek amacıyla; 30, 60 ve 90 Gy, canlı hücre sayımı için de 30, 60, 90 ve 1000 Gy doz uygulaması yapılmıştır. *D. radiodurans*'da ise, enzim aktivitesi ölçmek amacıyla 30, 60, 90, 2000, 4000, 6000, 8000 ve 10000 Gy, canlı hücre sayımı yapmak için de 30, 60, 90, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 ve 10000 Gy doz uygulandı. Bu doz miktarları Çizelge 3.7.'deki gibi belirtilen sürelerde gerçekleştirildi.

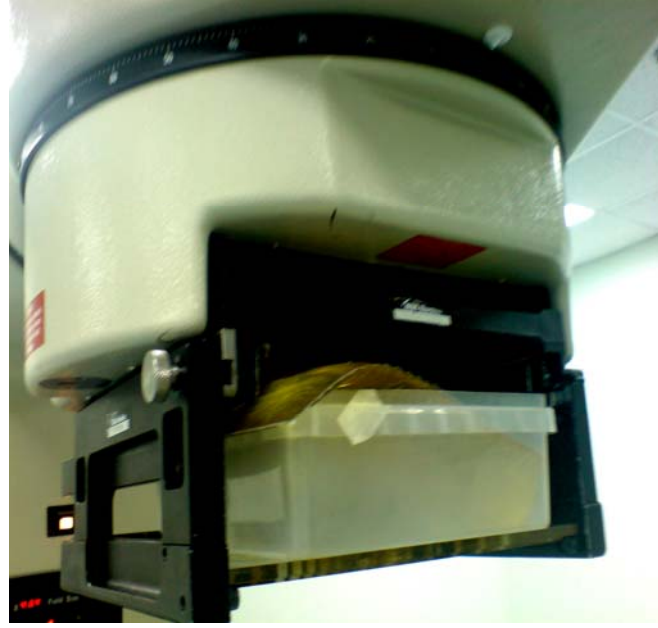
Çizelge 3.7. Bakterilere uygulanan doz miktarları ve uygulama süreleri.

Doz Miktarı(Gy)	Uygulama Süresi
30 Gy	5 dk.
60 Gy	10 dk
90 Gy	15 dk
1000 Gy	2.5saat
2000Gy	4.2saat
3000Gy	7.8saat
4000Gy	10.2saat
5000 Gy	11.7saat
6000 Gy	15.4saat
7000 Gy	16.9saat
8000 Gy	20.5 saat
9000 Gy	24.2 saat
10000 Gy	27,6 saat

Uygulama için logaritmik faza gelmiş her iki bakteri kültürleri 10 ml'lik cam tüplere tüpler tamamen doldurulacak şekilde aktarılarak, tüplerin ağızları parafilmle kapatılıp ve her bakteri için uygulanacak doz miktarının yazıldığı etiketlerle etiketlendi. Bu tüpler cihazın radyasyon uygulama alanına uygun bir kap içersine ters çevrilerek yerleştirildi (Şekil 3.7.2). Uygulama süresi biten kültürler çelik yelek giyilerek çıkarılmış ve diğer işlemlere tabi tutuldu.



Şekil 3.7.2. Örneklerin hazırlanması ve radyasyon uygulaması için cihaza uygun kaba yerleştirilmesi.



Şekil 3.7.3. Örneklerin cihaza yerleştirilmesi ve Co kaynaklı γ radyasyon uygulanması.

3.8. Bakterilerin Radyasyon Uygulanması Sonrası Alınması: Homojenizasyonu, Sonifikasyonu ve Santrifügasyonu

Radyasyon uygulaması sonrası süresi bitip çıkarılan tüplere sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulanmıştır (Şekil 3.8);

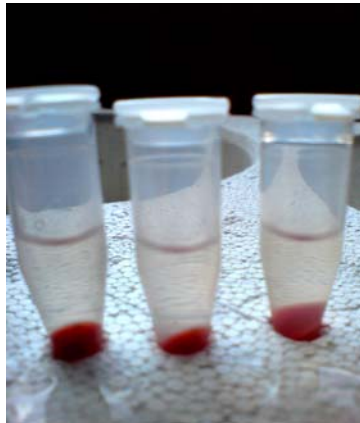
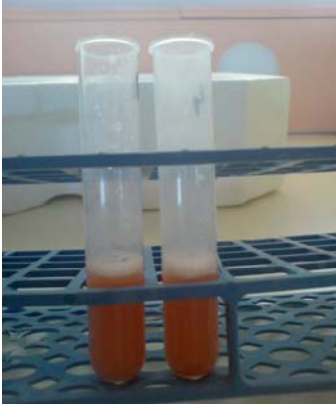
- 1 Tüplerin boş ağırlıkları hesaplandı.
- 2 Tüplere radyasyona maruz bırakılmış kültürlerden koyuldu.
- 3 10000 devirde 10 dakika süresince santrifüj edildi.



- 4 Süpernatant dökülerek hücreler tamponla yıkandı.
- 5 Tekrar 10000 devirde 10 dakika santrifüj edildi.
- 6 Süpernatant dökülerek peletin ağırlığı toplam ağırlıktan tüplerin boş ağırlıkları çıkarılarak hesaplandı.



- 7- Pelet, ağırlığının 4 katı kadar homojenizasyon tamponuyla sulandırıldı (pH=7,4 PBS tamponu)
- 8- Buz içinde 30 sn aralıklarla 3 kez homojenize edildi.
- 9- Homojenat buz içinde 30 sn aralıklarla 3 kez sonifiye edildi.





10- 15000 devirde/ 15 dk/ +4C ' de santrifüj edildi.
11- Süpernatant alınarak, ependorflara konuldu.



Şekil 3.8. Örneklerin radyasyon uygulaması sonrası alınması, homojenizasyonu, sonifikasyonu ve santrifügasyonu.

3.9. Örneklerin Elde Edilmesi ve Saklanması

Radyasyon uygulaması sonrasında *D. radiodurans* ve *E. coli* bakterileri için homojenizasyon, sonifikasyon ve santrifügasyon işlemlerinden sonra her iki bakteri için de ependorflara alınan örnekler enzim tayininde kullanılmak üzere -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.10. Enzim Aktivite Tayini

Enzim aktivitesi tayin işlemlerinde, mikropılaka okuyucu sistemi (Molecular Devices Corp., Versamax®) ve spektrofotometre (SHİMADZU UV-visible Spectrophotometer UV-1601) kullanıldı. Bütün enzimlerin aktiviteleri her bakteri için üç tekrarlı olarak ölçüldü.

3.10.1. Katalaz Aktivitesinin Ölçümü

Katalaz enziminin aktivite tayini Luck (1963) yöntemine göre yapıldı [111]. Katalaz enziminin aktivite tayini için pH=7 olan 1/15 M'lık Sodyum–Potasyum (KH_2PO_4 – NaHPO_4) tamponu hazırlandı. Tamponun 100 ml' sine 270 μl H_2O_2 eklendi. Katalaz aktivite tayininde kullanılacak olan kör için sadece tampon + H_2O_2 karışımı kullanıldı. Enzim aktivitesinin ölçümü için yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan tampon + H_2O_2 çözeltisine uygun miktarda örnek süpernatant eklendi ve 240 nm' de 1 dakika boyunca absorbans değişimi (Shimadzu-UV-1601, UV/visible) belirlendi. Absorbans belirlendikten sonra ml' deki enzim ünite sayısı spektrofotometrik olarak hesaplandı. Elde edilen değerler süpernatanın mililitresindeki miligram proteine bölünerek spesifik aktivite tespit edildi.

$$C = \text{CAT} = \frac{\text{OD} \times \text{Toplam Hacim (ml)} \times 1000}{0,036 \times \text{Süpernatant} (\mu\text{l})}$$

Spesifik aktivite = C / toplam protein

3.10.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Ölçümü

Ksantin-Ksantin oksidaz sisteminde üretilen süperoksit radikallerinin sitokrom c' yi indirgememesinin SOD tarafından inhibisyonu temeline dayanan enzim aktivite tayini Mc Cord ve Fridovich 1969 yöntemine göre yapıldı [112]. Enzim aktivite tayini için Ph = 7,8'lik 50 mM K_2HPO_4 tamponu (0,1 mM EDTA içeren fosfat tamponu) , 0,2 U/ ml ksantin oksidaz, 10 mM Ksantin ve 1 mM sitokrom-c çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler kullanılarak A ve B çözeltileri hazırlandı.

A çözeltisi için; 0,76 mg (5 mol) ksantin'in 10 ml 0,001 N NaOH' daki çözeltisi ve 24,8 mg (2 mol) sitokrom c'nin 100 ml 50 mM pH = 7,8 ve 0,1 mM EDTA içeren fosfat tamponundaki çözeltisi karıştırıldı.

B çözeltisi için taze olarak hazırlanan ksantin oksidazın (0,2 u/ml) 0,1 mM EDTA 'daki çözeltisi hazırlandı.

Bu çözeltiler hazırlandıktan sonra kör hazırlaması ve örnek okuması şu şekilde yapıldı; 3 ml' lik spektrofotometre küvetine 2,9 ml A çözeltisi ve 50 μl örnek ilave

edildikten sonra tepkime 50 µl B çözeltisinin eklenmesiyle başlatıldı. B çözeltisi eklendikten ve hızlı bir şekilde karıştırıldıktan sonra 550 nm’ de 1 dakikalık absorbans değişimi okundu. Kör okuması yapılırken örnek yerine 50 µl distile su kullanıldı. Kalibrasyon grafiği çizmek için belli konsantrasyonlardaki ($5 \cdot 10^{-7}M$) SOD çözeltilerinin 5 µl, 10 µl ve 15 µl’ deki bilinen değerlerine karşılık elde edilen % inhibisyon değerleri grafiğe geçirildi. Bu işlem saf SOD enzimiyle yapıldı. % inhibisyon aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{\text{OD (örnek)}}{\text{OD (kör)}} \times 100$$

$$\text{SOD Aktivitesi} = \frac{\% \text{ inhibisyon} - 1,4726}{1,7332}$$

3.10.3. Glutasyon S- Transferaz Aktivitesinin Ölçümü

Glutasyon S-transferaz aktivite tayini, Habig vd. (1974) yöntemine göre yapıldı [113]. Glutasyon S-transferaz aktivite tayini için Tris-HCl tamponu (pH: 7,4) içerisinde hazırlanmış 0,002 M redükte glutasyon, etanol içerisinde hazırlanmış 0,15 M CDNB (1-chloro,2-4 dinitrobenzen) ve 0,1 M potasyum fosfat tamponu (KH_2PO_4 - K_2HPO_4) (pH = 6,5) kullanıldı.

Enzim aktivitesinin saptanması hem spektrofotometrik olarak hem de mikroplate yöntemiyle yapıldı. Spektrofotometrik yöntemle enzim aktivitesi için; 1ml’lik küvete sırasıyla 400 µl potasyum fosfat tamponu, 400 µl redükte glutasyon, 75µl süpernatant ve 50 µl CDNB pipetlendi. Daha sonra 344 nm’de 3 dakika süresince absorbansları okundu. Kör olarak etanol kullanıldı. Örneklerin absorbansları okunduktan sonra mililitredeki enzimin ünite sayısı aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$C = GST = \frac{\Delta A \times \text{toplam hacim} \times 10^6}{9,6 \times 10^3 \times \text{ml süpernatant} \times 1 \times 10^3}$$

Mikroplate yöntemiyle enzim aktivitesinin ölçümü için; örnek okunacak mikroplate çukurlarına 10 µl örnek süpernatant, 100 µl fosfat tamponu ve GSH karışımı ayrıca 10 µl CDNB eklendi. Blank olarak kullanılan çukurlara süpernatant dışındaki diğer karışımlardan ilave edildi ve mikroplate okuyucuda 344 nm, 25 ° C 'de 1 dakika absorban okundu. Mililitredeki enzimin ünite sayısı aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$C = GST = \frac{\Delta A \times \text{Toplam hacim} \times 10^6}{9,6 \times 10^3 \times 10 \times 0,552 \times 10^3 \times 10^3}$$

GlutatyonS-transferaz için bulunan spektrofotometrik ve mikroplate ile elde edilen sonuçlardan mikroplate ile elde edilen sonuçlar baz alınarak hesaplamalar yapıldı.

3.10.4. Glutatyon Redüktaz Aktivitesinin Ölçümü:

Glutatyon redüktaz aktivite tayini, Carlberg ve Mannervik (1985) yöntemine göre yapılmış ve bunun için sırasıyla aşağıda belirtilen çözeltiler hazırlandı [114].

pH = 7,0'lik 0,2 M potasyum fosfat tamponu (K₂HPO₄- KH₂PO₄) (2 mM EDTA içinde) ve enzim aktivitesi ölçülürken taze olarak hazırlanan 2 mM NADPH/Tris HCl (Ph =7.0) ve distile su içinde 20 Mm GSSG kullanıldı.

GSH-R enzim aktivitesinin ölçümü için potasyum fosfat tamponu 30 ° C' de inkübe edildi. Daha sonra kör tüp hazırlamak için 1 ml'lik küvete fosfat tamponundan 0,5 ml konulup ve üzerine 50µl NADPH, 50µl GSSG ve son hacim 1 ml olacak şekilde distile su ilave edildi. Absorbans okunacak küvete ise kör tüpten farklı olarak uygun miktarda örnek süpernetant eklenip bir kez karıştırıldıktan sonra 340 nm' de 1 dakika süresince absorban okundu ve glutatyon redüktaz aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$C = GR = \frac{OD \times \text{Toplam Hacim(ml)} \times 1000}{6,22 \times \text{örnek miktarı}(\mu\text{l})}$$

3.10.5. Redükte Glutasyon (GSH) Miktar Tayini:

Redükte glutasyon miktar tayini, Akerboom ve Sies (1981) yöntemine göre yapıldı [115]. Redükte glutasyon miktar tayini için 6,3 mM EDTA içeren 125 mM'lık sodyum disülfat tamponu (Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4) hazırlandı. Tampon redükte glutasyon tayini yapılacağı zaman mililitresinde 0,248 mg NADPH olacak şekilde taze olarak hazırlandı (pH: 7,5). Aynı şekilde DTNB de, tamponun mililitresinde 2,378 mg olacak şekilde taze olarak hazırlanmıştır. Taze olarak hazırlanmış NADPH'lı tampondan 700µl ve DTNB'den 100 µl olacak şekilde etiketlenmiş deney tüplerine aktarıldı. Bu deney tüpleri 30 °C'deki sıcak su banyosunda inkübe edilerek, kör tüp için 200µl, örnek tüpler için de 185 µl distile su eklenmiş ve pastör pipetle iki kez karıştırıldıktan sonra 10-12 dakika beklendi. Daha sonra 700µl NADPH, 100µl DTNB, 185 µl distile su içeren karışım, 1 ml'lik spektrofotometrik küvete aktarıldıktan sonra 5 µl glutasyon redüktaz, 15 µl süpernatant eklenerek 412 nm'de 1 dakika süresince absorbansları okundu. Örneklerin absorbansları okunduktan sonra redükte glutasyon tayini yapmak için çizilen standart grafikten süpernatantlardaki toplam glutasyon miktarı dikkate alınarak redükte glutasyon (GSH) cinsinden hesaplandı. Bulunan değerler süpernatantın mililitresindeki miligram proteine bölünerek spesifik aktivite hesaplandı.

$$\text{GSH Miktarı} = \frac{OD + 0,0286}{0,3462}$$

Total Protein Tayini

Total protein tayini Bradford vd. (1980) yöntemine göre yapılmıştır [116]. 5 µl süpernatant mikropalakalara pipetlenip ve üzerine 250 µl Bradford reaktifi eklenerek reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 15 dakika karanlıkta inkübe edildi. Renk değişimine bağlı olarak 595 nm dalga boyunda mikropalaka okuyucu sistemi kullanılarak

absorbansları ölçüldü. Protein miktarları saptanırken BSA standart eğrisi değerleri ile karşılaştırma yapılarak örnekteki total protein değerleri hesaplandı.

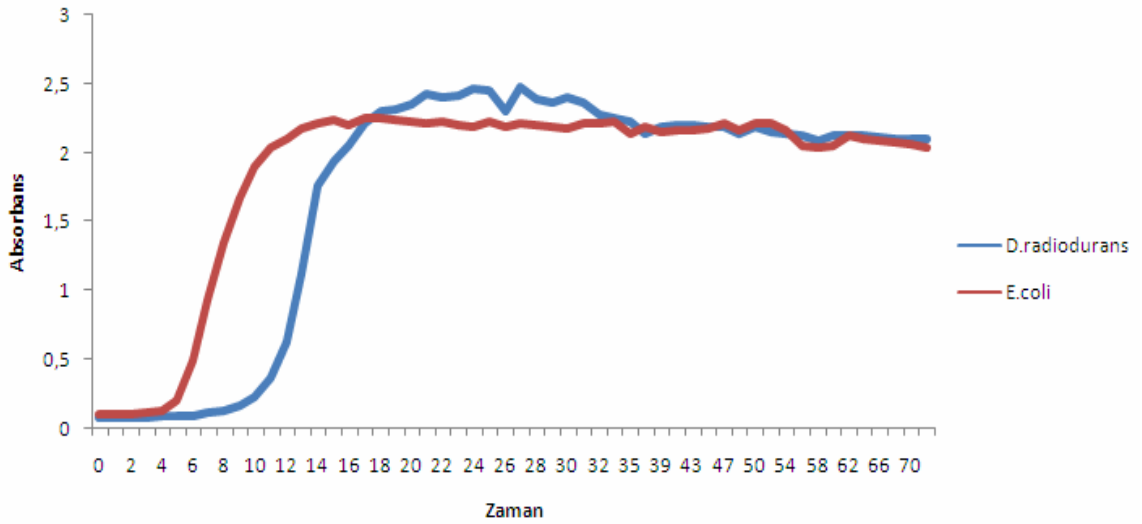
3.11. İstatistikî Analizler

Elde edilen sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla istatistiksel paket program (SPSS 10.0 for Windows İnc., USA) kullanıldı. Bu programda önem kontrolü için Duncan testi uygulandı [117].

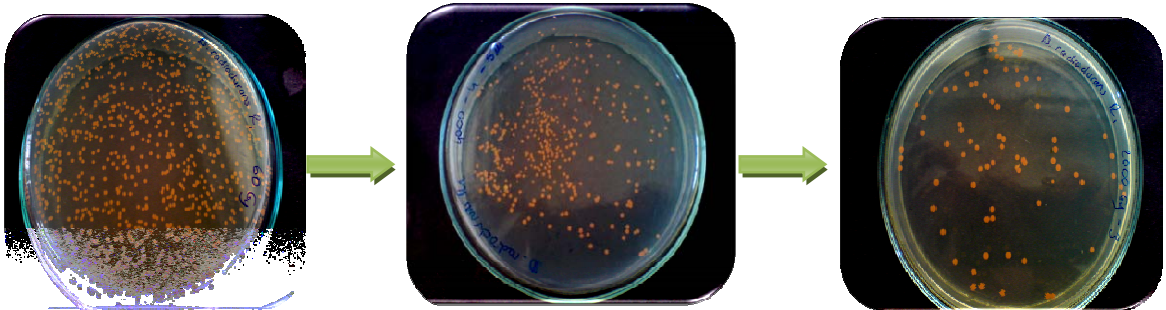
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Bakterilerin Üreme Eğrilerinin Çıkarılması

Bu çalışmada, *Deinococcus radiodurans* ve *Escherichia coli* bakterileri için absorbans değerlerine bağlı olarak elde edilen sonuçlara göre üreme eğrileri çıkarılmıştır. Aynı zamanda her iki bakteri için canlı hücre sayımı da yapılarak üreme eğrisi için elde edilen absorbans değerleri desteklenmiştir.



Şekil 4.1.1. *Deinococcus radiodurans* ile *Escherichia coli* bakteri kültürlerinin zamana bağlı olarak absorbans değerlerinin grafiği.



Şekil 4.1.2. *Deinococcus radiodurans* bakterisinin seri sulandırma sonucu canlı hücre sayıları.

D. radiodurans ve *E. coli* bakterilerinin üreme eğrilerine bağlı olarak üreme fazları tespit edilmiştir. Buna göre logaritmik üreme fazı *D. radiodurans* için yaklaşık olarak 14. saat, *E. coli* için ise 7. saat olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1.1).

4.2. Radyasyona Maruz Bırakılan *D. radiodurans* ve *E. coli* Bakterilerinde Antioksidan Enzimlerin Aktiviteleri ve Glutasyon Mikraındaki Değişimler

Farklı dozlarda uygulanan radyasyonun antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkisini saptamak amacıyla yapılan bu çalışmada, radyasyona maruz bırakılan ve bırakılmayan gruplarda enzim aktiviteleri ve glutasyon (GSH) miktarlarındaki değişimler saptanmıştır.

4.2.1 Katalaz Aktivitesi

Deinococcus radiodurans ve *Escherichia coli* bakterilerinde γ radyasyona maruz bırakılan ve bırakılmayan gruplarda katalaz (CAT) aktiviteleri saptanmış ve sonuçlar Çizelge 4.2.1. ve Şekil 4.2.1.'de verilmiştir.

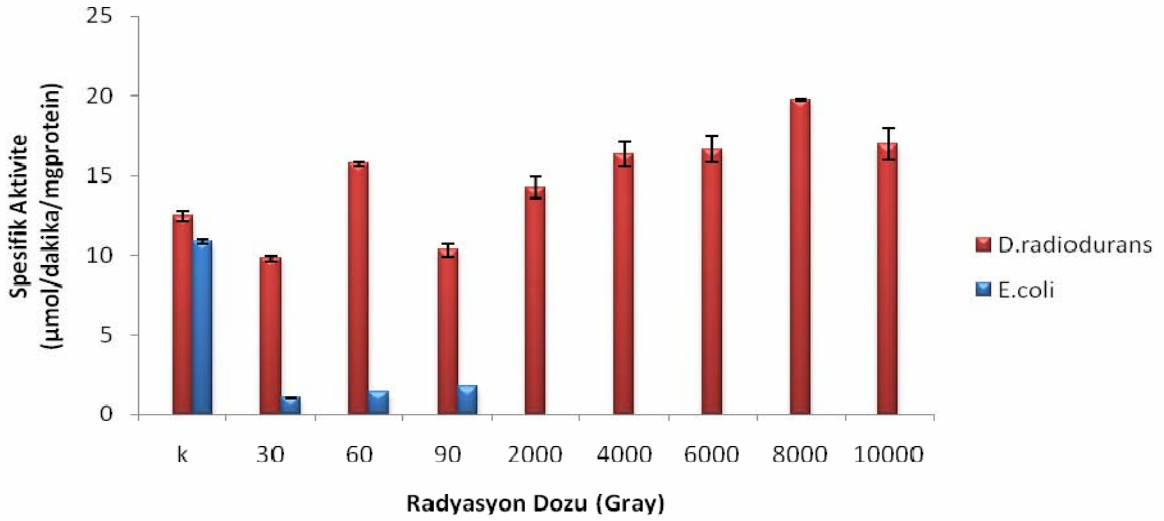
Çizelge 4.2.1' de *Deinococcus radiodurans*'ın kontrol ile kıyaslandığında radyasyon dozuna bağlı olarak genel anlamda bir artış gösterdiği saptanmıştır. En yüksek katalaz aktivite değeri $19,74 \pm 0,055^a$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein olup 8000 Gray radyasyon uygulanan örneklerde saptanmıştır. En düşük katalaz enzim aktivite değeri de $9,77 \pm 0,170^b$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein olup 30 Gray radyasyon uygulanan örneklerde görülmüştür. Diğer taraftan *E.coli* 'de radyasyon uygulaması sonrasında kontrol gruplarına göre bir azalma olduğu kaydedilmiştir. *E.coli* için en yüksek katalaz enzim aktivitesi kontrol gruplarında $10,86 \pm 0,163^a$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein olarak kaydedilmiştir. En düşük enzim aktivitesi de 30 Gray'de $1,076 \pm 0,040^b$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein olarak belirlenmiştir.

Genel olarak, *D. radiodurans*'ın kontrol gruplarındaki enzim aktivitesiyle *E. coli* 'nin kontrol gruplarındaki enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında *D. radiodurans*'ın enzim aktivitesinin *E. coli*'ye göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Aynı zamanda uygulanan doz miktarı arttıkça *D. radiodurans*'ın katalaz enzim aktivitesinin *E. coli*' ye göre daha fazla artış gösterdiği saptanmıştır. *E.coli*'de ise doza bağlı olarak kontrol gruplarına göre önemli oranda bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2.1. Farklı dozlarda γ - radyasyon uygulanan *D. radiodurans* ve *E. coli*'de katalaz (CAT) aktivitesinin doza bağlı olarak istatistiksel değerlendirilmesi [a,b: Her sütunda farklı harflerle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır.

KATALAZ AKTİVİTESİ ($\mu\text{mol/dakika/mg protein}$)

DOZLAR	BAKTERİLER	
	<i>D. radiodurans</i>	<i>E. coli</i>
Kontrol	12,43 \pm 0,287 ^{ab}	10,86 \pm 0,163 ^a
30	9,77 \pm 0,170 ^b	1,076 \pm 0,040 ^b
60	15,71 \pm 0,113 ^{ab}	1,454 \pm 0,013 ^b
90	10,308 \pm 0,427 ^b	1,737 \pm 0,005 ^b
2000	14,28 \pm 0,680 ^{ab}	-
4000	16,38 \pm 0,759 ^{ab}	-
6000	16,68 \pm 0,830 ^{ab}	-
8000	19,74 \pm 0,055 ^a	-
10000	16,95 \pm 1,00 ^{ab}	-



Şekil 4.2.1. γ - radyasyon uygulanan *Deinococcus radiodurans* ve *Escherichia coli* bakterilerinde radyasyon dozuna bağlı olarak katalaz enzim aktivitesindeki değişimler.

4.2.2. Süperoksit Dismutaz Aktivitesi

Deinococcus radiodurans ve *Escherichia coli* bakterilerinde γ radyasyona maruz bırakılan ve bırakılmayan gruplarda süperoksit dismutaz (SOD) aktiviteleri saptanmış ve sonuçlar Çizelge 4.2.2. ve Şekil 4.2.2.'de verilmiştir.

Buna göre Çizelge 4.2.2.'de *Deinococcus radiodurans*'ın kontrol ile kıyaslandığında radyasyon dozuna bağlı olarak katalaz enzim aktivitesinde olduğu gibi bir artış gösterdiği saptanmıştır. 30 Gray'de en düşük enzim aktivite değeri $0,270 \pm 0,0044^f$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein olarak kaydedilmiştir. En yüksek SOD enzim aktivitesi de $0,498 \pm 0,0039^a$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein olarak 2000 Gray radyasyon uygulanan örneklerde kaydedilmiştir. 4000 Gray' de aktivitede bir düşüş gözlenmiş, 6000, 8000 ve 10000 Gray'lik uygulanmış örneklerde aktivite tekrar artmaya devam etmiştir.

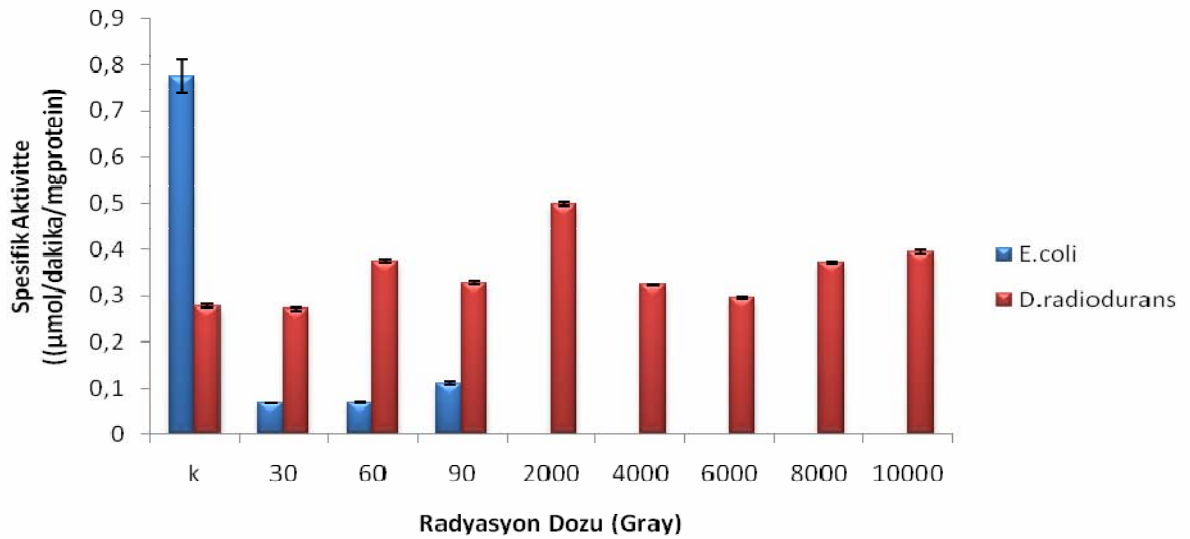
Escherichia coli 'de radyasyon uygulamaları sonrasında kontrol gruplarına göre yine bir azalmanın olduğu kaydedilmiştir. *E.coli* için en yüksek süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi kontrol gruplarında $0,776 \pm 0,037^a$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein olarak kaydedilmiştir. En düşük enzim aktivitesi de 30 Gray'de $0,068 \pm 0,001^b$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein olarak belirlenmiştir.

Genel olarak, *D. radiodurans*'ın kontrol gruplarındaki enzim aktivitesiyle *E. coli* 'nin kontrol gruplarındaki enzim aktiviteleri karşılaştırıldığında *E. coli*'nin enzim aktivitesinin *D. radiodurans*'a göre daha fazla olduğu görülmektedir. Ancak uygulanan doz miktarı arttıkça *D. radiodurans*'ın SOD enzim aktivitesinde genel olarak bir artış olmasına rağmen *E. coli*'de kontrol gruplarına göre bir azalmanın olduğu kaydedilmiştir. Bununla birlikte her iki bakterinin SOD aktivitesinin doz artışına paralel olarak arttığı gözlenmiştir.

Çizelge 4.2.2. Farklı dozlarda γ - radyasyon uygulanan *Deinococcus radiodurans* ve *Escherichia coli*'de süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin doza bağlı olarak istatistiksel değerlendirilmesi [a,b,c,d,e,f.: Her sütunda farklı harflerle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır].

SÜPEROKSİT DİSMUTAZ ($\mu\text{mol/dakika/mg protein}$)

DOZLAR	BAKTERİLER	
	<i>D. radiodurans</i>	<i>E. coli</i>
Kontrol	0,277 \pm 0,0037 ^{ef}	0,776 \pm 0,037 ^a
30	0,270 \pm 0,0044 ^f	0,068 \pm 0,001 ^b
60	0,374 \pm 0,0042 ^b	0,069 \pm 0,0008 ^b
90	0,326 \pm 0,0036 ^{cd}	0,111 \pm 0,0037 ^b
2000	0,498 \pm 0,0039 ^a	-
4000	0,322 \pm 0,0025 ^{de}	-
6000	0,294 \pm 0,0021 ^{def}	-
8000	0,370 \pm 0,0037 ^{bc}	-
10000	0,393 \pm 0,0043 ^b	-



Şekil 4.2.2. γ - radyasyon uygulanan *Deinococcus radiodurans* ve *Escherichia coli* bakterilerinde radyasyon dozuna bağlı olarak süperoksit dismutaz enzim aktivitesindeki değişimler.

4.2.3. Glutasyon Redüktaz Enzim Aktivitesi:

Deinococcus radiodurans ve *Escherichia coli* bakterilerinde γ radyasyona maruz bırakılan ve bırakılmayan gruplarda glutasyon redüktaz (GSH-R) aktiviteleri saptanmış ve sonuçlar Çizelge 4.2.3 ve Şekil 4.2.3’de verilmiştir.

Buna göre Çizelge 4.2.3 ’de *Deinococcus radiodurans*’ın GSH-R enzim aktivitesinin CAT ve SOD enzimleriyle karşılaştırıldığında oldukça düşük olduğu görülmüştür. Ancak kontrol gruplarına göre radyasyon dozuna bağlı olarak bir artış olduğu belirlenmiştir. 60 Gray’de en düşük enzim aktivite değeri $0,049 \pm 0,0000008^b$ nmol/dakika/mg protein olarak kaydedilmiştir. En yüksek GSH-R enzim aktivitesi de $0,172 \pm 0,0000009^b$ nmol/dakika/mg protein olarak 8000 Gray radyasyon uygulanan örneklerde kaydedilmiştir. 60 ve 10000 Gray’ de bir önceki doz uygulanan grubuna göre bir düşüş gözlenmiş olsa da genel olarak bir artış söz konusudur.

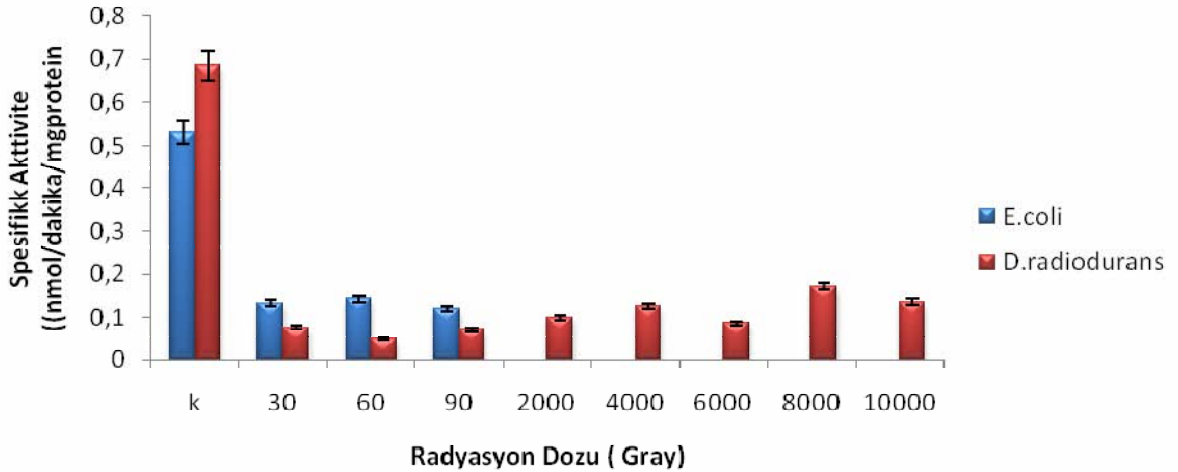
E. coli ’de GSH-R enzim aktivitesinin *D. radiodurans*’a göre oldukça yüksek olmakla birlikte radyasyon uygulamaları sonrasında kontrol gruplarına göre yine bir azalmanın olduğu kaydedilmiştir. *E. coli* için en yüksek GSH-R enzim aktivitesi kontrol gruplarında $0,53 \pm 0,0015^a$ nmol/dakika/mg protein olarak kaydedilmiştir. En düşük enzim aktivitesi de 90 Gray’de $0,119 \pm 0,00006^b$ nmol/dakika/mg protein olarak belirlenmiştir.

Genel olarak, *D. radiodurans*’ın GSH-R enzim aktivitesinin *E. coli* ile karşılaştırıldığında yaklaşık 100 kat daha düşük olduğu ancak *D. radiodurans* ’da uygulanan doz miktarı arttıkça enzim aktivitesinde bir artış gözlenirken *E. coli*’de kontrol gruplarındaki enzim aktivitesiyle karşılaştırıldığında uygulanan doz miktarındaki artışa bağlı olarak bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2.3. Farklı dozlarda γ - radyasyon uygulanan *Deinococcus radiodurans* ve *Escherichia coli*'de glutatyon redüktaz (GSH-R) aktivitesinin doza bağlı olarak istatistiksel değerlendirilmesi [a,b: Her sütunda farklı harflerle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır].

GLUTATYON REDÜKTAZ AKTİVİTESİ (nmol/dakika/mg protein)

DOZLAR	BAKTERİLER	
	<i>D. radiodurans</i>	<i>E. coli</i>
Kontrol	0,68 ± 0,00012 ^a	0,53 ± 0,0015 ^a
30	0,076 ± 0,0000003 ^b	0,133 ± 0,00026 ^b
60	0,049 ± 0,0000008 ^b	0,143 ± 0,00031 ^b
90	0,071 ± 0,0000012 ^b	0,119 ± 0,00006 ^b
2000	0,099 ± 0,0000011 ^b	-
4000	0,126 ± 0,0000012 ^b	-
6000	0,086 ± 0,0000008 ^b	-
8000	0,172 ± 0,0000009 ^b	-
10000	0,136 ± 0,0000003 ^b	-



Şekil 4.2.3. γ - radyasyon uygulanan *Deinococcus radiodurans* ve *Escherichia coli* bakterilerinde radyasyon dozuna bağlı olarak glutatyon redüktaz enzim aktivitesindeki değişimler. (Bu grafikte *E. coli*'ye ait GSH-R enzim aktivitesi, *D. radiodurans*'a ait değerlerinin grafikte daha rahat görülebilmesi açısından 1/100 oranında küçültülmüştür).

4.2.4. Glutasyon S-Transferaz Aktivitesi

Deinococcus radiodurans ve *Escherichia coli* bakterilerinde radyasyona maruz bırakılan ve bırakılmayan kontrol gruplarında glutatayon S-transferaz (GST) aktiviteleri saptanmış ve sonuçlar Çizelge 4.2.4 ve Şekil 4.2.4 'de verilmiştir.

Buna göre Çizelge 4.2.4'de *Deinococcus radiodurans*'ın kontrol grupları ile kıyaslandığında radyasyon dozuna bağlı olarak GST enzim aktivitesinde 30 ve 60 Gray doz uygulanan örneklerde bir düşüşün olduğu, 90, 2000, 4000, 6000 ve 8000 doz uygulanmış örneklerde tekrar arttığı 10000 Gray doz uygulanan örnekte ise tekrar düştüğü tespit edilmiştir. 30 Gray'de en düşük enzim aktivite değeri $0,0084 \pm 0,0000006^f$ nmol/dakika/mg protein olarak kaydedilmiştir. En yüksek GST enzim aktivitesi de $0,084 \pm 0,00000007^a$ nmol/dakika/mg protein olarak 8000 Gray radyasyon uygulanan örneklerde kaydedilmiştir.

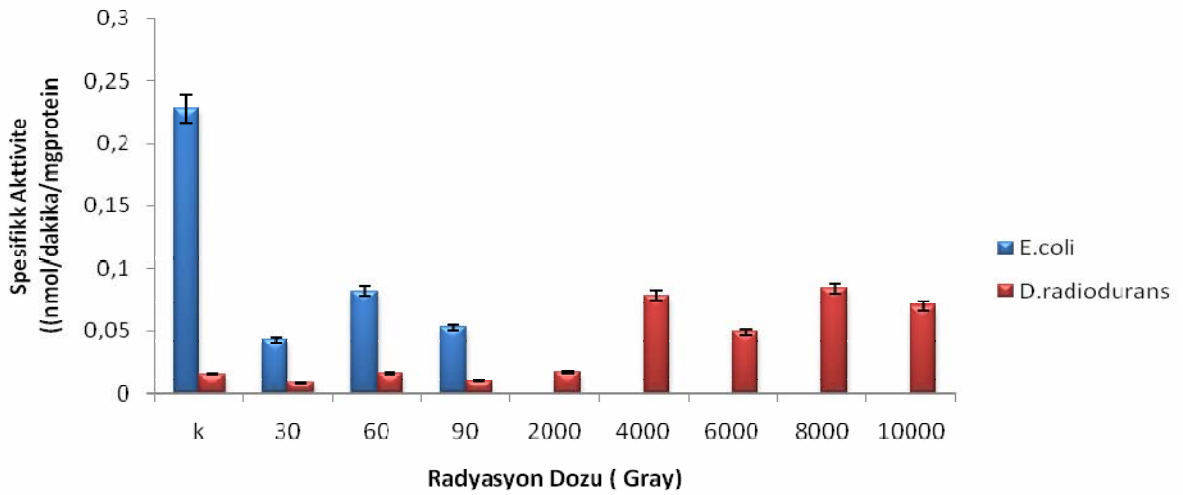
Escherichia coli 'de radyasyon uygulamaları sonrasında kontrol gruplarına göre yine bir azalmanın olduğu kaydedilmiştir. 30 Gray' de enzim aktivitesi düşmüş, 60 Gray' de yükselmiş 90 Gray' de ise tekrar düşmüştür. Buna göre *E. coli* için en yüksek GST enzim aktivitesi kontrol gruplarında $0,228 \pm 0,0000009^a$ nmol/dakika/mg protein olarak kaydedilmiştir. En düşük enzim aktivitesi de 30 Gray'de $0,0424 \pm 0,0000006^c$ nmol/dakika/mg protein olarak belirlenmiştir.

Genel olarak, *D. radiodurans*'ın GST enzim aktivitesinin *E. coli* ile karşılaştırıldığında 10 kat daha düşük olduğu ancak *D. radiodurans* 'da uygulanan doz miktarı arttıkça enzim aktivitesinde bir artış gözlenirken *E. coli*'de kontrol gruplarındaki enzim aktivitesiyle karşılaştırıldığında uygulanan doz miktarındaki artışa bağlı olarak bir azalmanın olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2.4. Farklı dozlarda γ - radyasyon uygulanan *Deinococcus radiodurans* ve *Escherichia coli*'de Glutasyon S-Transferaz aktivitesinin doza bağlı olarak istatistiksel değerlendirilmesi [a,b,c,d,e,f: Her sütunda farklı harflerle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır].

GLUTATYON-S- TRANSFERAZ AKTİVİTESİ (nmol/dakika/mg protein)

DOZLAR	BAKTERİLER	
	<i>D. radiodurans</i>	<i>E. coli</i>
Kontrol	0,0156 ± 0,0000006 ^{de}	0,228 ± 0,0000009 ^a
30	0,0084 ± 0,0000006 ^f	0,0424 ± 0,0000006 ^c
60	0,016 ± 0,0000009 ^s	0,0816 ± 0,0000002 ^b
90	0,01 ± 0,0000002 ^{ef}	0,0524 ± 0,0000005 ^{bc}
2000	0,0168 ± 0,00000007 ^d	-
4000	0,078 ± 0,0000009 ^a	-
6000	0,0488 ± 0,0000006 ^c	-
8000	0,084 ± 0,00000007 ^a	-
10000	0,07 ± 0,0000015 ^b	-



Şekil 4.2.4. γ - radyasyon uygulanan *Deinococcus radiodurans* ve *Escherichia coli* bakterilerinde radyasyon dozuna bağlı olarak glutasyon S-transferaz enzim aktivitesindeki değişimler.

4.2.5.Redükte Glutasyon (GSH) Miktar Tayini

Deinococcus radiodurans ve *Escherichia coli* bakterilerinde radyasyona maruz bırakılan ve bırakılmayan gruplarda redükte glutasyon (GSH) miktarları saptanmış ve sonuçlar Çizelge 4.2.5 ve Şekil 4.2.5 'de verilmiştir.

Buna göre Çizelge 4.2.5'de *Deinococcus radiodurans*'ın kontrol ile kıyaslandığında radyasyon dozuna bağlı olarak GSH miktarında genel olarak bir artış gösterdiği saptanmıştır. 90 Gray'de en düşük GSH miktarı $0,0046 \pm 0,00008^d$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein olarak kaydedilmiştir. En yüksek GSH miktarı 4000, 8000 ve 10000 Gray doz uygulanan örneklerde $0,0078 \pm 0,00008^a$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein olarak kaydedilmiştir. 30 Gray radyasyon uygulanan örneklerde. kontrol gruplarına göre, 90 Gray doz uygulanan örneklerde de 60 Gray doz uygulanan örneklere göre bir düşüş olduğu gözlenmiştir.

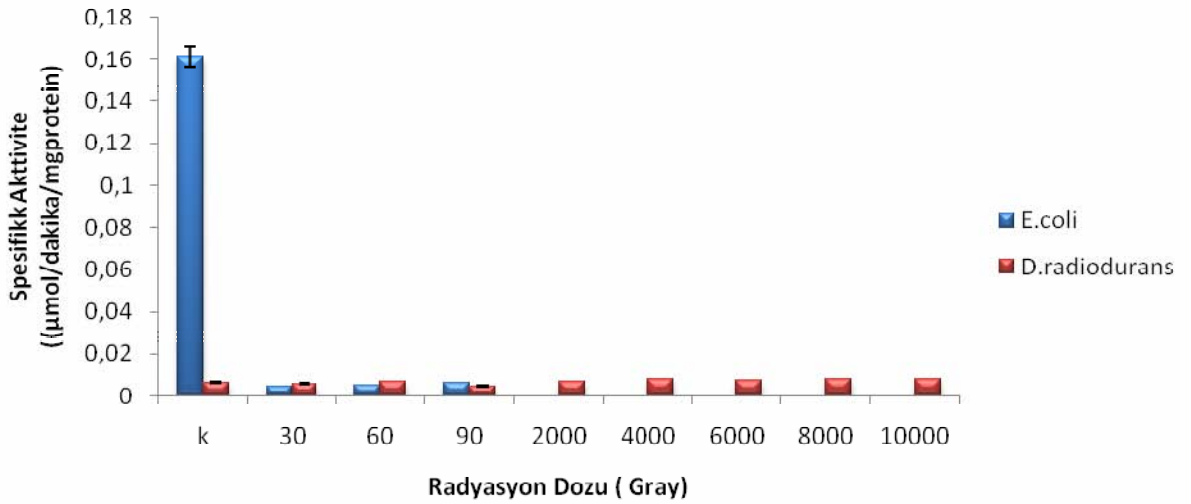
Escherichia coli 'de radyasyon uygulamaları sonrasında kontrol gruplarına göre yine bir azalmanın olduğu kaydedilmiştir. *E. coli* için en yüksek GSH miktarı kontrol gruplarında $0,161 \pm 0,0048^a$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein olarak kaydedilmiştir. En düşük GSH miktarı da 30 Gray'de $0,0044 \pm 0,00005^b$ $\mu\text{mol/dakika/mg}$ protein olarak belirlenmiştir.

Genel olarak, *D. radiodurans*'ın kontrol gruplarındaki GSH miktarıyla *E. coli* 'nin kontrol gruplarındaki GSH miktarları kıyaslandığında *E. coli*'nin GSH miktarının *D. radiodurans*'a göre yaklaşık olarak 25 kat daha fazla olduğu görülmektedir. Uygulanan doz miktarı arttıkça *D. radiodurans*'ın GSH miktarında genel olarak bir artış olmasına rağmen *E. coli*'de kontrol gruplarına göre oldukça fazla bir düşüş görülmüş ancak doz artışına bağlı olarak tekrar bir artışın olduğu kaydedilmiştir.

Çizelge 4.2.5. Farklı dozlarda γ - radyasyon uygulanan *Deinococcus radiodurans* ve *Escherichia coli*'de redükte GSH miktarının doza bağlı olarak istatistiksel değerlendirilmesi [a,b,c,d: Her sütunda farklı harflerle gösterilen rakamlar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır].

GLUTATYON MİKTARI ($\mu\text{mol/dakika/mg protein}$)

DOZLAR	BAKTERİLER	
	<i>D. radiodurans</i>	<i>E. coli</i>
Kontrol	0,0063 \pm 0,00014 ^{bc}	0,161 \pm 0,0048 ^a
30	0,0058 \pm 0,00003 ^c	0,0044 \pm 0,00005 ^b
60	0,0068 \pm 0,00004 ^{abc}	0,0052 \pm 0,00004 ^b
90	0,0046 \pm 0,00008 ^d	0,0062 \pm 0,00008 ^b
2000	0,0067 \pm 0,00005 ^{abc}	-
4000	0,0078 \pm 0,00011 ^a	-
6000	0,0070 \pm 0,00005 ^{abc}	-
8000	0,0078 \pm 0,00005 ^a	-
10000	0,0078 \pm 0,00008 ^a	-



Şekil 4.2.5. γ - radyasyon uygulanan *Deinococcus radiodurans* ve *Escherichia coli* bakterilerinde radyasyon dozuna bağlı olarak redükte glutatyon (GSH) miktarındaki değişimler.

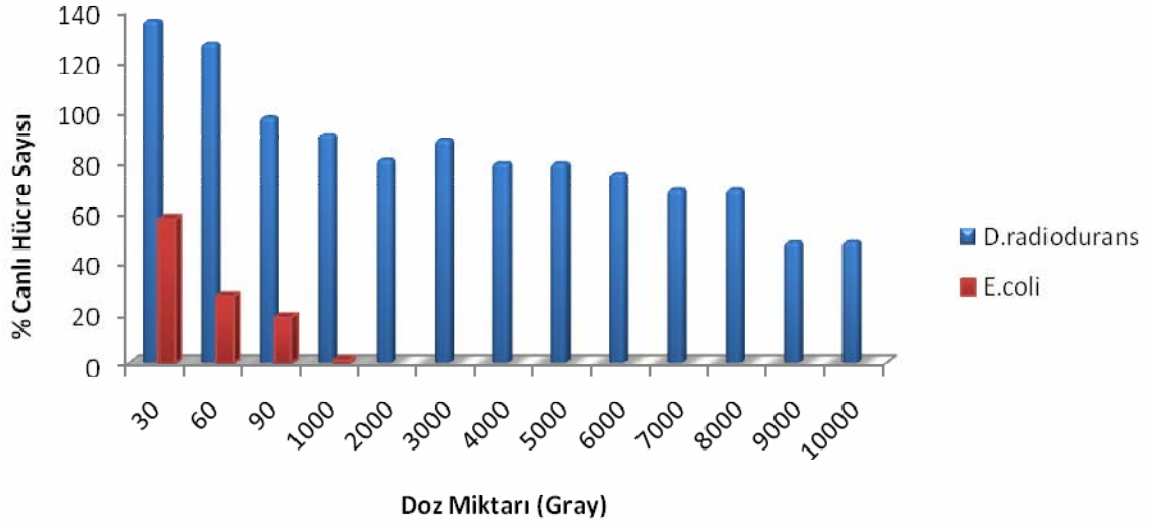
4.3. Radyasyon Sonrası Bakterilerin Canlı Hücre Sayıları

Koloni oluşturan birimin (CFU) % 37'sini canlı bırakan doz, radyasyon direnç kapasitesi araştırılan diğer organizmalarla karşılaştırıldığında direncin standart bir ölçütü olarak değerlendirilmekte ve bu doz D_{37} olarak tanımlanmaktadır. CFU nun % 10' na karşılık gelen D_{10} değeri daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Zengin bir besiyerinde logaritmik olarak üreyen *D. radiodurans*'ın D_{37} değeri benzer şekilde kültüre edilen *E. coli*'nin D_{37} değerinden yaklaşık 16 kez daha büyük olduğu tespit edildi [35].

Çizelge 4.3. *Deinococcus radiodurans* ve *Escherichia coli* bakterilerinde radyasyon uygulaması sonrasında % canlı hücre sayıları.

Doz (Gray)	% Canlı hücre Sayıları	
	<i>D.radiodurans</i>	<i>E.coli</i>
30	136	57,27
60	126,8	26,72
90	97,56	18,18
1000	90,9	0
2000	80,8	
3000	88,68	
4000	79,43	
5000	79,43	
6000	75,43	
7000	68,96	
8000	68,96	
9000	48,27	
10000	48,38	

Buna göre *D. radiodurans*'ın ilk 30 ve 60 Gray doz uygulanan örneklerdeki canlı hücre sayıları radyasyon uygulanmamış örneklerden daha yüksek olduğu saptandı. 90 Gray uygulama sonrası canlılık kaybı % 2,44 olarak tespit edildi. 5000 Gray uygulanan örneklere kadar canlılık kaybı % 20,57 olarak hesaplandı. 10000 Gray sonunda ise canlılık kaybı 51,62 olarak saptandı.



Şekil 4.3. Radyasyon uygulanan *Deinococcus radiodurans* ve *Escherichia coli* bakterilerinde radyasyon sonrası canlı kalma % 'leri.

E. coli' de 90 Gy sonucu canlılık kaybı %81,82 olarak bulunmuştur. 1000 Gy sonunda ise kültürdeki hücrelerin tümü canlılıklarını kaybetmiştir. *D. radiodurans*' a ait D_{37} değeri radyasyon uygulama dozumuzun en fazla 10000 Gy' e kadar olması nedeni ile hesaplanamamıştır. *E. coli*'nin D_{37} değeri ise, 30–60 Gy doz aralığında olduğu tahmin edilmektedir [50].

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İyonize ve UV radyasyon, hücrelerde oksidatif stresi tetikleyerek reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olmaktadır. İyonize radyasyonun etkilerinin çoğu, reaktif oksijen türlerini arttırdığı için radyasyonun toksisitesinde önemli rol oynamaktadır. Song vd. (2000) yaptıkları çalışmada da radyasyonun hidrojen peroksit radikalının miktarında artışlara neden olduğunu tespit etmişlerdir [18]. Aerobik organizmalarda reaktif oksijen türlerini uzaklaştıran ve hücre homeostasisinde önemli rol oynayan antioksidan enzim sistemi bulunmaktadır. Normal koşullarda hücredeki reaktif oksijen türleriyle antioksidan savunma sistemi arasında bir denge vardır. Oksidatif stresin artmasıyla birlikte antioksidan sistemde yer alan enzimlerin aktivitelerinde değişiklikler meydana gelmektedir.

Radyasyonun neden olduğu oksidatif stresi göstermek, antioksidan savunma sisteminde yer alan enzimlerdeki değişimlerin saptanmasıyla açıklanabilmektedir. Radyasyonun antioksidan sistem üzerindeki etkisini araştırdığımız bu çalışmada, *Deinococcus radiodurans R1* ile *Escherichia coli* bakterilerine farklı dozda γ radyasyon uygulanarak bu bakterilerin antioksidan enzim ile GSH seviyelerinde meydana getirdiği değişiklikler ve radyasyon dozuna bağlı olarak bakterilerin canlı kalma yüzdeleri tespit edildi. Çalışmamızın sonunda farklı dozda γ radyasyon uygulamalarına bağlı olarak her iki bakterinin antioksidan enzim ve GSH seviyelerinde değişiklikler saptanmıştır.

Buna göre, farklı radyasyon dozlarına maruz bırakılan *D. radiodurans* ve *E. coli* bakterilerinden *D. radiodurans*'ın GSH seviyelerinde ve enzim aktivitelerinde özellikle de SOD ve KAT enzimlerinin yüksek aktivite gösterdiği ve doz artışına bağlı olarak kontrol gruplarına kıyasla genel olarak bir artışın olduğu görülmüştür. *E. coli*'de radyasyon dozuna bağlı olarak enzim ve GSH seviyelerinde belirgin bir azalış olduğu ve radyasyonun yarattığı oksidatif stresden daha fazla etkilendiği görüldü. Battista vd. (2000) yaptığı araştırmada da radyasyon uygulamasının *D. radiodurans*'ın hücre ekstraktlarında SOD ve CAT aktivitelerinin oldukça yüksek olduğu, özellikle SOD aktivitesinin *E. coli* 'den 6 kat daha yüksek olduğu gösterilmiştir [118]. Bizim çalışmamızda da *D. radiodurans*'ın radyasyon sonrası enzim aktiviteleri, *E. coli*'ye göre yaklaşık 4,3 kat daha fazla olduğu görüldü.

Çalışmamızda *D. radiodurans* 'ın katalaz enzim aktivitesi hem kontrol gruplarında hemde radyasyon uygulanmış örneklerde *E. coli*'den daha yüksek olduğu saptanmıştır. Soung vd. (2000) yaptığı çalışmada da *D. radiodurans*'da oksidatif strese karşı korumada bifonksiyonel olan (hem katalitik aktivite hemde peroksidatik aktivite) katalazın önemli rol oynadığı gösterilmiştir [119]. En düşük katalaz aktivitesi 30 Gy radyasyon uygulanan örneklerde görülmüştür. Bunun sebebi, hücrelerin radyasyon gibi ekstrem bir çevresel koşula adapte olmaya çalışmalarıdır. Buna bağlı olarak en yüksek katalaz aktivitesinin saptandığı 8000 Gy radyasyon uygulanan örnekler, radyasyon doz miktarı arttıkça enzimin daha etkili bir şekilde çalıştığını gösterdi. 10000 Gy radyasyon uygulanan örnekte enzim aktivitesinin düşmesi, radyasyonun yüksek dozunun enzimin aktivasyonunu engellemesi sonucu olduğu düşünülebilir. Uygulanan doz miktarı arttıkça *D. radiodurans*'ın katalaz enzim aktivitesinin *E. coli*' ye göre daha fazla artış gösterdiği saptandı.

E. coli'nin katalaz aktivitesinin kontrol gruplarında en yüksek olduğu görülmüştür. 30 Gy'lik radyasyon uygulaması ile birlikte enzim aktivitesinde yaklaşık olarak 8 kat bir azalma saaptandı. Bu da bakterinin radyasyonun letal etkisine karşı ne kadar duyarlı olduğunu göstermektedir. Uygulanan doz miktarı arttıkça enzim aktivitesinde az da olsa artışlar görülmüştür. Bunun nedeni, ortamda oluşan hidrojen peroksit radikallerinin katalaz enzimini aktive edecek konsantrasyona ulaşmasıdır. Ott vd. (2002) yaptıkları çalışmada da oksidatif stres yaratan bir diğer eksojen kaynak olan ağır metal uygulamasının, hidrojen peroksit radikalini ortamdaki temizleyen katalaz enziminin hücrel redoks dengesini muhafaza etmek için indüklendiği rapor edilmiştir [120].

D. radiodurans'ın süperoksit dismutaz enzim aktivitesinin, katalaz enziminde olduğu gibi kontrol gruplarına göre radyasyon dozuna bağlı olarak yine arttığı görüldü. *D. radiodurans*'ın en yüksek enzim aktivitesi 2000 Gy'de görülmüş, 4000 Gy'de bir düşüş olmuş ancak sonra 6000, 8000 ve 10000 Gy'de tekrar yükselmeye devam etmiştir. *D. radiodurans*'da SOD ve KAT enzimlerinin radyasyon uygulamasına bağlı olarak benzer cevaplar vermesini, bu enzimlerin birlikte korelasyon içinde çalışmasına dayandırabiliriz. Markillie vd. (1999) yaptıkları çalışmada *Deinococcus radiodurans* 'ın yabancı tipinin, sodA ve katA mutantlarına göre iyonize radyasyon ve oksidatif strese karşı oldukça dirençli olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar, bu direncin bakterilerin sahip olduğu SOD ve KAT enzimleriyle ilişkili olduğunu göstermişlerdir [105]. Battista vd. (2000) yaptıkları çalışma sonucunda da, *D. radiodurans*'da SOD ve KAT enzimlerinin,

bakterinin radyasyona olan direncinde aktif olarak iş gören iki enzim olduğu rapor edilmiştir [118]. Bizim çalışmamız da bu verileri destekler niteliktedir.

E. coli'nin SOD enzim aktivitesi, uygulanan doz miktarı arttıkça *D. radiodurans*'ın SOD enzim aktivitesinde olduğu gibi genel olarak bir artış olmasına rağmen, *E. coli*'de kontrol gruplarına göre yaklaşık 10 kat bir azalmanın olduğu görüldü. Bunu, *E. coli*'nin radyasyona *D. radiodurans*'dan daha duyarlı olmasına bağlı olarak, radyasyonun meydana getirdiği radikalleri ortamdan temizleyecek enzimin inaktivasyonuna bağlayabiliriz. Uygulanan ilk dozla birlikte meydana gelen bu düşüş, daha sonra radyasyon dozuna bağlı olarak enzim aktivitesinin yeniden artmasına neden oldu. Bunu da, uygulanan radyasyon dozu arttıkça hücrelerde birikmeye başlayan süperoksit radikallerini ortamdan temizleyecek olan enzimin kısmi olarak aktive olmasıyla ilişkilendirebiliriz. Mates (2000) 'in yaptığı çalışmada da hücre içinde oksidatif stres yaratacak herhangi bir durum sonucunda çeşitli sinyal molekülerinin gen regülasyonunu tetikleyerek antioksidan enzimlerin sentezinde artışa neden olduğunu göstermiştir [121].

D. radiodurans'ın hücre içi glutatyon redüktaz aktivitesi nmol seviyesinde düşük çıkmasına rağmen, uygulanan doz miktarına bağlı olarak enzim aktivitesinde genel bir artış görüldü. Çeşitli stres koşullarında GSH-R enzimi, redükte glutatyonu oluşturmak üzere indüklenmektedir. Griffith (1999), GSH metabolizmasını araştırdığı çalışmalarda GSH-R enziminin aktivasyonunun, hücredeki GSH oranıyla ilişkili olduğu ve çeşitli stres durumlarının bu oranı etkilediğini tespit etmiştir [42].

E. coli 'nin kontrol gruplarındaki GSH-R aktivitesi *D. radiodurans*'dan yüksek olmakla birlikte radyasyon uygulamasına bağlı olarak yaklaşık 4 kat bir azalma göstermiştir. Enzim aktivitesindeki bu azalmayı GSH-R enzim aktivitesinin radyasyonun oluşturduğu oksidatif stresin etkisiyle inhibe olmasına bağlayabiliriz.

Hücrelerde Se- bağımsız glutatyon peroksidaz aktivitesi gösteren glutatyon S-transferaz, lipit hidroperoksitlerine karşı bir savunma mekanizması oluşturur. Her iki bakteri için enzim aktivitesi nmol seviyesinde düşük olmasına rağmen, *D. radiodurans*'ın GST aktivitesi'nin *E. coli*'ye göre daha düşük olduğu görülmüştür ve radyasyon dozuna bağlı olarak, 4000 Gy'e kadar aşağı yukarı aynı seviyelerde görülen aktivite 4000 Gy'den sonra yaklaşık olarak 4,5 kat artmıştır. Bunu enzimin yüksek dozlardaki radyasyon düzeylerinde daha etkili çalışmasıyla açıklayabiliriz.

E. coli'nin GST aktivitesi kontrol gruplarında oldukça yüksek çıkmasına rağmen 30 Gy radyasyon uygulaması ile birlikte yaklaşık 5 katlık bir azalma görüldü. Bunu radyasyonun toksisitesine bağlı olarak enzimin inhibisyonuna bağlayabiliriz.

D. radiodurans'ın hücre içi GSH seviyesinin *E. coli*'ye göre daha düşük olduğu ve uygulanan radyasyon dozuna bağlı olarak da genel bir artış gösterdiği saptandı. Hücre içi GSH seviyesindeki artış, GSH-R enziminin aktivasyonuna bağlı olabileceği gibi, GSH sentezinden sorumlu γ -glutamilsistein sentetaz (γ -GCS) enziminin regülasyonu ya da GSH prekürsörlerinin seviyesindeki artışla da olabilmektedir. Buna göre, *D. radiodurans*'da radyasyon dozundaki artışla birlikte radikallerin ortamda birikmesi, hücredeki GSH havuzunun azalmasına ve bu durum GSH'ın sentezini indükleyerek bu mekanizmalardan herhangi biriyle GSH'ın sentezinin artmasına neden olabileceği düşünülebilir. Griffith 'in (1999) GSH metabolizması üzerine yaptığı araştırmada, GSH seviyesindeki artışın GSH-R indüksiyonuyla bağlantılı olduğunu göstermiştir [42]. Bizim çalışmamızda da GSH-R aktivitesinin radyasyon dozuna bağlı olarak artması bu çalışmada elde edilen sonuçlarla örtüşmektedir.

E. coli'nin GSH seviyesi kontrol gruplarında yüksek çıkmasına rağmen, radyasyon uygulamasına bağlı olarak GSH seviyesinde yaklaşık olarak 36,5 kat bir azalma görülmüş ve doz artışına bağlı olarak tekrar artışlar görülmüştür. Radyasyon uygulaması ile GSH seviyesinde meydana gelen bu düşüş bakterinin radyasyona olan duyarlılığının sonucu oluşan oksidatif stres ile hücrelerdeki GSH havuzunun azalmasına, doz artışına bağlı olarak meydana gelen artış ise GSH'ın ortamda azalması sonucu GSH-R enziminin indüklenmesiyle yeniden GSH'ın ortamda artmasına bağlayabiliriz.

D. radiodurans'ın radyasyona karşı geliştirdiği direnç mekanizmalarından biri de etkili bir antioksidan enzim sistemine sahip olmasıdır. Bu şekilde radyasyon sonucu meydana gelen oksidatif stres ürünleri bu antioksidanlar tarafından temizlenmektedir. Çalışmamızda *D. radiodurans*'ın radyasyon sonrası SOD, KAT, GST, GSH-R enzimleri ve GSH seviyelerine baktığımızda bakteride radyasyonun meydana getirdiği reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde temel olarak SOD ve KAT enzimlerinin etkin rol oynadığı görülmüştür. Battista vd. (2000) yaptığı araştırmada da *D. radiodurans*'ın SOD ve CAT aktivitelerinin hücre ekstraktlarında oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Diğer enzimler ve GSH 'ın hücre içinde düşük aktiviteye sahip olduğu görüldü. Bu nedenle *Deinococcus radiodurans*'ın antioksidan enzim sistemi üzerine

yapılan çalışmaların çoğunda özellikle SOD ve KAT enzimlerinin çalışıldığı göze çarpmıştır.

Biyolojik sistemlerde görülen radyasyon hasarı atomik seviyede olan etkilere bağlı moleküler yapının bozulması sonucunda oluşmaktadır. Her hücre de radyasyondan farklı derecelerde etkilenirler. Çalışmamızda da *D. radiodurans* ve *E. coli* bakterilerinde farklı dozda γ - radyasyon uygulaması sonucu hücrelerin canlı kalma yetenekleri araştırılmıştır. Buna göre, radyasyona dirençli olan *D. radiodurans*'ın 90 Gy radyasyon uygulaması sonucu hücrelerin canlılık kaybı % 2,44 olarak tespit edildi. 5000 Gy radyasyon uygulaması sonucunda bu sayı % 20,57 olarak hesaplandı. 10000 Gy radyasyon uygulaması sonucunda ise, canlılık kaybı % 51,62 olarak saptandı. Bu sonuçlar *D. radiodurans*'ın yüksek dozda radyasyon uygulamalarında canlılık kayıplarının olmasına rağmen direnç gösterebildiğini ve 10000 Gy'lik radyasyon uygulaması sonucunda hücrelerin hala % 48,38 'inin canlı kaldığını göstermiştir. Benzer sonuçlar Makarova vd. (2001) 'nin yaptıkları çalışmada, *Deinococcus radiodurans* 5000 Gy'lik dozda hiç canlılık kaybı olmadan 15000 Gy'lik dozda ise kültürün % 37 si canlı kalacak şekilde dayanıklılık gösterdiği tespit edilmiştir [50].

E. coli' de 90 Gy 'lik radyasyon uygulaması sonucu canlılık kaybı %81,82 olarak bulundu. 10000 Gy 'lik uygulama sonunda ise kültürdeki hücrelerin tümü canlılıklarını kaybetti. Makarova vd. (2001) yaptıkları çalışmada *E. coli* 'nin 60 Gy uygulama sonunda tüm canlılık faaliyetlerini kaybettiklerini tespit etmişlerdir [50]. Ayrıca Battista vd. (1999) *E. coli*'nin D_{37} değerini 30 Gy olarak tespit etmişlerdir [76]. Bizim çalışmamızda ise *E. coli*'nin D_{37} değerinin 30-60 Gy arasında olduğu bulundu.

Çalışmamızda radyasyonun antioksidan enzim sistemi üzerindeki etkisini araştırdığımız bakterilerden *E. coli*' nin kontrol guplarında SOD, KAT, GST, GSH-R ve GSH seviyelerinin yüksek olmasına rağmen, *E.coli*' nin radyasyonun letal etkisine karşı çok duyarlı olması nedeniyle yüksek olan bu enzimler ve GSH miktarları radyasyonun meydana getirdiği reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde yetersiz kalmıştır.

Son yıllarda önem kazanan genetik mühendislikle ilgili çalışmaların yanı sıra, biyoremidasyonla ilgili çalışmalar ve ciddi çevre problemlerine neden olan ağır metallerin ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu ile ilgili yoğun araştırmalar yapılmaya başlanmıştır. Ancak UV'nin indüklediği reaktif oksijen türleri, bunların etkileri ve bunlara karşı hücrel savunma mekanizmaları ve reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinden sorumlu antioksidan sistemleri hakkında yeterince araştırma

yapılmamıştır. Yaptığımız bu çalışma ile bu tür araştırmalar bakımından yetersiz olan literatüre katkıda bulunulmuştur.

Bölüm 2.1.'de ifade edildiği gibi yeryüzünde kirililik oluşturan unsurlardan biride radyoaktif atıklardır. Nükleer reaktörlerin çok olduğu ülkelerde, özellikle Amerika Birleşik Devletleri'nde çok miktarda radyoaktif atık su altında geçici olarak depolanmakta ve sonsuza kadar saklanacağı yere götürülmeyi beklemektedir. Böyle alanlardaki yüksek radyasyon seviyeleri uzun vadede canlı organizmalar üzerinde oldukça zarar vericidir ve sıklıkla hücre ölümleriyle sonuçlanmaktadır. Bu atık alanların temizlenmesi için kullanılan yöntemler oldukça maliyetlidir. Bundan dolayı bu alanlar metalik ve organik kirleticileri yıkabilen/uzaklaştırabilen özel mikroorganizmaları kullanan biyoremediasyon teknolojisi için potansiyel birer hedef olmaktadır. Yapılacak olan çalışmalarda, enerji üretimini bakımından büyük bir potansiyele sahip olmasına rağmen atık problemlerinden dolayı günümüzde de kurulumu büyük tartışmalara yol açan nükleer santrallerin, radyoaktif atık yiyen böcek olarak bilinen *Deionococcus radiodurans* 'ın keşfiyle ve biyoremediasyon alanındaki kullanımının artmasıyla birlikte bu radyoaktif atıkların temizlenmesinde normal depolama işlemlerine alternatif olarak düşünölmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] F. Berkes, M. Kışlalıoğlu, *Ekoloji ve Çevre Bilimleri*, Remzi Kitabevi, İstanbul, 1990.
- [2] T. Gündüz, *Çevre Sorunları*, Bilge Yayıncılık, Ankara, 1994.
- [3] T.C.S. Siguid-Kutner, M.A.S. Leitao, O.K. Okomoto, *Heavy Metal Induced Oksidative Stres in Algae*, **J. Phyool**, (2003)39 1008-1018.
- [4] M.J. Daly, *Engineering radiation-resistant bacteria for environmental biotechnology*, **Current Opinion in Biotechnology**, 11 (2000) 280–285.
- [5]www.tmrtdr.org.tr/Radyasyon%20%C3%96l%C3%A7%C3%BCm%20Sistemleri.htm, Türk Medikal Radyoteknoloji Derneği.
- [6] J. L. Rothschild, R.L. Mancinelli, *Life in extreme enviroments*, **Nature**, 409 (2001) 1092-1101.
- [7] M.S. Bülbül, *Radyasyon*, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Fizik Anabilimdalı Kars, 2003.
- [8] H. Yaren, T. Karayılanoğlu, *Radyasyon ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri*, **TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni**, 2005.
- [9] R.G. Riley, J.M. Zachara, F.J. Wobber, *Chemical Contaminants on DOE Lands and Selection of Contaminant Mixtures for Subsurface Science Research*, **Nature Biotech**, (1992) 1.19:0547.
- [10] D. Appukuttan, A.S. Rao, S.K. Apte, *Engineering of Deinococcus radiodurans R1 for Bioprecipitation of Uranium from Dilute Nuclear Waste*, **Appl. Environ. Microbiol**, (2006) 72:12 7873-7878.
- [11] J.R. Battista, *Against all odds: The survival strategies of Deinococcus radiodurans*, **Annu. Rev. Microbiol**, 51 (1997) 203-224.
- [12] M. Altınışık, *Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidanlar*, ADÜ Tıp Fakültesi Biyokimya A.D, Aydın, 2000.
- [13] H. Geçkil, İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Biyokimya-1 Ders Notları, 2007 119-129.
- [14] N.P. Khairnar, H.S. Misra, S.K. Apte, *Pyrrloquinoline-quinone synthesized in Escherichia coli by pyrrloquinoline-quinone synthase of Deinococcus radiodurans plays a role beyond mineral phosphate solubilization*, **Science**, 12 (2003) 303-308.

- [15] M.J. Daly, K.W. Minton, *Recombination between a resident plasmid and the chromosome following irradiation of the radioresistant bacterium Deinococcus Radiodurans*, **Elsevier**, 187 (1996) 225–229.
- [16] S. Kitayama, S. Asaka, K. Totsuka, *DNA double-strand breakage and removal of cross-links in Deinococcus radiodurans*, **J. Bacteriol**, 155 (1983) 1200–1207.
- [17] K. Kılınç, A. Kılınç, *Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Rdaikalleri*, **Hacettepe Tıp Dergisi**, 2002 33(2):110-118.
- [18] B. Günalp, *İyonize Radyasyonun Biyolojik Etkileri*, Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Tıp Fakültesi Nükleer Tıp A.D. 2003.
- [19] G. Burçak, G. Andican, *Oksidatif DNA Hasarı ve Yaşlanma*, Temel Tıp Bilimleri, Biyokimya A.D, **Cerrahpaşa Tıp Dergisi**, (2004) 35 (4) 159-168.
- [20] D. Asma, *Biyolojik sistemlerde Radikaller ve Antioksidanlar*, İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Yüksek Lisans Ders Notları.
- [21] Y. Baykal, *Antioksidanlar ve Serbest Radikaller*.
- [22] G. Tanırğan, M. Koldaş, F. Uras, *Serbest Oksijen Radikalleri ve Oksidanlar*, **Haseki Tıp Bülteni**, (1994) 32 4.
- [23] H. Kasai, *Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis*, **Science**, (1997) 387 147-163.
- [24] Z. Yurdakul, *Oksijen ve Canlılar*, <http://www.biyokimya.8m.net/oksijen.html>.
- [25] İ. Akkuş, *Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*, Mimoza Yayınları: 38, Sağlık dizisi:5, ISBN:975-543-038-5, Konya, 1995.
- [26] J. Chaudiere, R. Ferrarı-illou, *Intracellular Antioxidants: From Chemical to Biochemical Mechanisms*, **Food. Chemical. Toxicol**, 37 (1999) 949-962.
- [27] C.S. Moody, H.M. Hassan, *Anaerobic Biosynthesis of the Manganese containing Superoxide Dismutase in E.coli*, **J. Biol. Chem**, 20: 259 (1984) 12821-12825.
- [28] K. Kılıç, *Oksijen Radikallerinin Üretilmeleri, Fonksiyonları ve Toksik Etkileri*, **Biyokimya Dergisi**, 2 (1985) 60-89.
- [29] M.S. Paller, M.T. Patent, *Hydrogen Peroxide and İschemic Renal İnjury: Effect of Catalase İnhibition*, **Free Radical Biol. Med**, 10 (1991) 29-34.
- [30] I. Marvelli, G. Rotilio, *Oxygen Free Radicals, and Tumor cells, Icosanoids and Cancer* in Ed.Thaler-Dao, H. Crastes de Panlet, A. Paoletti, R. Raven Press, New York, 1-10, 1984.

- [31] T. Yan, L.H. Tee, Y.M. Sin, *Effect of Mercury and Lead on Tissue Glutathione of the Green Mussel, Perna viridis L.* **Bull. Environ. Contam. Toxicol**, 58 (1997) 845-850.
- [32] J.L. Forney, A.C. Reddy, M. Tien, T.S. Aust, *The Involment of Hidroxy Radical Derived From Hydrogen Peroxide Lignin Deratation by the White Rot Fungus Phanerochaete chrysosporium*, **J. Biol. Chem**, 257:19 (1982) 11455-11462.
- [33] M.J. Prieto-Alamo, N. Abril, C. Pueyo, *Mutagenesis in Escherichia coli K-12 Mutants Defective in Superoxide Dismutase or Catalase*, **Mutat Res-Fund Mol M**, 14:2 (1993) 237-244.
- [34] C. Von Sonntag, *Some aspects of radiation-induced free-radical chemistry of biologically important molecules*, **J. Rad. Appl. Inst**, 39:6 (1992) 477-483.
- [35] S. Kota, H.S. Misra, *Molecular Biology of Stress Response and its Applications*, Molecular Biology Division, Bhabha Atomic Research Centre, 19-21, 2005.
- [36] U. Ermler, S. Glusla, V. Massey, G.E Schulz, *Structural Spectroscopic and Catalytic Activity Studies on Glutathione Reductase Reconstituted with FAD Analogues*, **Euro. J. Biochem**, 199 (1991) 133-138.
- [37] M.J. Pennickx, M.T. Elskens. *Metabolism and Functions of Glutathion in Microorganisms*, **Adv Microb Physiol**, 34 (1993) 12 240-291.
- [38] A. Meister, M.E. Anderson, *Glutathione*, **Ann. Rev. Biochem**, 52 (1983) 711-760,
- [39] R. Moser, T.D. Oberley, D.A. Daggett, A.L Friedman., J. Johnson, F.L. Siegel, *Effect of Lead Administration on Developing Rat Kidney*. **Toxicol. Appl. Pharm**, 131 (1995) 85-93.
- [40] W.B. Jakoby, D.M. Ziegler. *The Enzymes Detoxification*. **J. Biol. Chem**, 265:34 (1990) 20715-20718.
- [41] G.B. Quiroga, M. Lopez-Tores, R. Perez-Campo, M. Albelenda, M. Paz- Nava, M.L. Puerta, *Effect of Cold Acclimation on GSH, Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Brown Adipose Tissue*, **Biochem. J**, 277 (1991) 289-292.
- [42] O.W. Griffith, *Biologic and Pharmacologic Regulation of Mammalian Glutathione Synthesis*, **Free Radical. Bio. Med**, 27 (1999) 922-935.
- [43] M.D. Scott, B.H. Lubin, L. Zuo, F.A Kuypers, *Erythrocyte Defense Against Hydrogen Peroxide Preeminent Importance of Catalase*, **J. Lab. Clin. Med**, 118(1) (1991) 7-16.

- [44] R.A. Owens, P.H. Hartman, *Export of Glutathione by Some Widely Used Salmonella typhimurium and Escherichia coli*. **J. Bacteriol**, 168:1(1986) 199-114.
- [45] D.L Nelson, M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry* (3rd ed), Worth Publishers, New York, 2000.
- [46] Campbell. Reece, *Genel Biyoloji*, Palme, Ankara, 2006, 27, 526-544.
- [47] P. López-García, *Extremophiles, Advances in Astrobiology and Biogeophysics*, M. Gargaud et al. (Ed.), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005 1 657–679.
- [48] C. Buzea, *Planets and Life*, in Lecture 18. *Life at the extremes*. Part I., 2008.
- [49] A. Anderson, H. Nordan, R. Cain, G. Parrish, D. Duggan, *Studies on a radioresistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics and resistance to gamma radiation*, **Food Technol**, 10 (1956) 575–578.
- [50] K.S. Makarova, L. Aravind, Y.I. Wolf, R. L.Tatusov, K.W. Minton, E.V.Koonin, M.J. Daly, *Genome of Extremely Radiation- Resistant Bacterium Deinococcus radiodurans Viewed from the Perspective of Comparative Genomics*, **Microbiol Mol Biol R**, 65:1 (2001) 44-79.
- [51] E.A. Christensen, H. Kristensen, *Radiation-resistance of micro-organisms from air in clean premises*. **Acta. Pathol. Microbiol. Scand**, 89 (1981) 293-301.
- [52] A.W. Anderson, H.C. Nordan, R.F. Cain, G. Parrish, D. Duggan, *Studies on a radio-resistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics and resistance to gamma radiation*, **Food. Technol**, 10 (1956) 575-578.
- [53] R.G.E. Murray, *The family Deinococcaceae*. In: A. Ballows, H.G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, **Springer-Verlag**, New York (1992), 3732–3744.
- [54] M.J. Thornley, R.W. Horne, A.M. Glauert, *The fine structure of Micrococcus radiodurans*, **Arch. Microbiol**, 51 (1965) 267-289.
- [55] B. Tian, Z. Xu, Z. Sun, J. Lin, Y. Hua, *Evaluation of the antioxidant effects of carotenoids from Deinococcus radiodurans through targeted mutagenesis, chemiluminescence, and DNA damage analyses*, **Biochimica et Biophysica Acta**, 17770 :268 (2007) 902-911.
- [56] M. A. Carbonneau, A. M. Melin, A. Perromat & M. Clerc, *The action of free radicals on Deinococcus radiodurans carotenoids*, **Biochem. Biophy**, 275(1) (1989) 244-251.

- [57] A.M. Andersson, N. Weiss, F. Rainey, M.S. Salkinoja-Salonen, *Dust-borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centres*, **J. Appl. Microbiol**, 86 (1999) 622-634.
- [58] R. Hensel, W. Demharter, O. Kandeler, R.M. Kroppenstedt, E. Stackebrandt, *Chemotaxonomic and molecular-genetic studies of the genus Thermus: Evidence for a phylogenetic relationship of Thermus aquaticus and Thermus ruber to the genus Deinococcus*, **Int. J. Syst. Bacteriol**, 36 (1986) 444-453.
- [58] B.W. Brooks, R.G.E. Murray, *Nomenclature for "Micrococcus radiodurans" and other radiation-resistant cocci: Deinococcaceae fam. nov. and Deinococcus gen. nov. including five species*, **Int. J. Syst. Bacteriol**, 31 (1981) 353-360.
- [59] H. Ito, H. Watanabe, M. Takeshia, H. Iizuka, *Isolation and identification of radiation-resistant cocci belonging to the genus Deinococcus from sewage sludges and animal feeds*, **Agric. Biol. Chem**, 47 (1983) 1239-1247.
- [60] J.R. Grant, M.F. *Patterns Anovel radiation-resistant Deinobacter sp, isolated from irradiated pork*, **Lett. Appl. Microbiol**, 8 (1989) 21-24.
- [61] A.C. Ferreira, M.F. Nobre, F.A. Rainey, M.T. Silva, R. Wait, J. Burghardt, A.P. Chung, M.S. Da Costa, *Deinococcus geothermalis sp. nov. and Deinococcus murrayi sp. nov., two extremely radiation-resistant and slightly thermophilic species from hot springs*, **Int. J. Syst. Bacteriol**, 47 (1997) 939-947.
- [62] H. Kristensen, E. A. Christensen, *Radiation-resistant micro-organisms isolated from textiles*. **Acta. Pathol. Microbiol. Scand**, 89 (1981) 303-309.
- [63] V. Mattimore, J.R. Battista, *Radioresistance of Deinococcus radiodurans: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation*. **J. Bacteriol**, 178 (1996) 633-637.
- [64] C.C. Lange, L.P. Wackett, K.W. Minton, M.J. Daly, *Engineering a Recombinant Deinococcus radiodurans for Organopollutant Degradation in Radioactive Mixed Waste Enviroments*, **Nat. Biotechnol**, 16 (1998) 929-933.
- [65] O. White, J.A. Eisen, J.F. Heidelberg, E.K. Hickey, J.D. Peterson, R.J. Dodson, D.H. Haft, M.L Gwinn, W.C. Nelson, D.L. Richardson, K.S. Moffat, H. Qin, L. Jiang, W. Pamphile, M. Crosby, M. Shen, J.J. Vamathevan, P. Lam, L. McDonald, T. Utterback, C. Zalewski, K.S. Makarova, L. Aravind, M.J. Daly, K.W. Minton, R.D. Fleischmann, K.A. Ketchum, K.E. Nelson, S.L. Salzberg, H.O. Smith, J.C. Venter, C. M. Fraser, *Genome sequence of the radioresistant bacterium Deinococcus radiodurans RI*, **Science**, 286 (1999) 1571-157.

- [66] Harsojo, S. Kitayama, A. Matsuyama *Genome multiplicity and radiation resistance in *Micrococcus radiodurans**, **J. Biochem**, 90:3 (1981) 877-880.
- [67] M.J. Daly, K.W. Minton, *Resistance to radiation*, **Science**, 270 (1995) 13-18.
- [68] M.T. Hansen, *Multiplicity of genome equivalents in the radiation-resistant bacterium *Micrococcus radiodurans**. **J. Bacteriol**, 134 (1978) 71-75.
- [69] P.D. Gutman, P. Fuchs, L. Ouyang, K.W. Minton, *Identification, sequencing, and targeted mutagenesis of a DNA polymerase gene required for the extreme radioresistance of *Deinococcus radiodurans**. **J. Bacteriol**, 175:11 (1993) 3581-3590.
- [70] K.E. Nelson, R.A. Clayton, S.R. Gill, M.L. Gwinn, R.J. Dodson, D.H. Haft, E.K. Hickey, J.D. Peterson, W.C. Nelson, K.A. Ketchum, L. McDonald, T.R. Utterback, J.A. Malek, K.D. Linher, M.M. Garrett, A.M. Stewart, M.D. Cotton, M.S. Pratt, C.A. Phillips, D. Richardson, J. Heidelberg, G.G. Sutton, R.D. Fleischmann, J.A. Eisen, C. M. Fraser, *Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima**. **Nature**, 399 (1999) 323-329.
- [71] M.J. Daly, L. Ouyang., P. Fuchs, K. W. Minton, *In vivo damage and recA-dependent repair of plasmid and chromosomal DNA in the radiation-resistant bacterium *Deinococcus radiodurans**. **J. Bacteriol**, 176 (1994) 3508-3517.
- [72] A. Kuzminov, *Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**, 63 (1999) 751-813.
- [73] S. Kitayama, A. Matsuyama, *Mechanism for radiation lethality in *M. radiodurans**. **Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.** 19 (1971) 9-13.
- [74] F. Krasin, F. Hutchinson, *Repair of DNA double-strand breaks in *Escherichia coli*, which requires recA function and the presence of a duplicate genome*, **J. Mol. Biol**, 116 (1977) 81-98.
- [75] B.E. Moseley, D.M. Evans, *Isolation and properties of strains of *Micrococcus (Deinococcus) radiodurans* unable to excise ultraviolet light-induced pyrimidine dimers from DNA: evidence for two excision pathways*. **J. Gen. Microbiol.** 129:8 (1983) 2437-2445.
- [76] J.R. Battista, A.M. Earl, M.J. Park, *Why is *Deinococcus radiodurans* so resistant to ionizing radiation?* **Trends Microbiol.** 7:9 (1999) 362-365.
- [77] T. Zalewski, C. Makarova, K.S. Aravind, M.J. Daly, K.W. Minton, R.D. Fleischmann, K.A. Ketchum, K.E. Nelson, S.L. Salzberg, H.O. Smith, J.C. Venter, C.M. Fraser, *Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1*, **Science**, 286 (1999) 1571-1577.

- [78] M.D. Smith, C.I. Masters, B.E. Moseley, *Molecular biology of radiation resistant bacteria*, in: Herbert R. A. and Sharp R. J. (eds.). *Molecular biology and biotechnology of extremophiles*. Chapman & Hall, New York. 1992, 258-280,
- [79] V.Y. Matrosova, M.V. Omelchenko, A. Venkateswaran, M. Zhai, M. Hess, *Analysis of Novel Deinococcus radiodurans mutants following whole genome transcriptome analysis*. **New Horizons in Genomic**, 2003, 27.
- [80] V. Pogoda de la, U. Rettberg, P. Douki, T. Cadet, J. Horneck, *Sensitivity to polychromatic UV radiation of strains of Deinococcus radiodurans differing in their DNA repair capacity*, **Int. J. Rad. Biol**, 81:8 (2005) 601-611.
- [81] A. Venkateswaran, S.C. McFarlan, D. Ghosal, K.W. Minton, A. Vasilenko, K. Makarova, L.P. Wackett, M.J. Daly, *Physiologic determinants of radiation resistance in Deinococcus radiodurans*. **Appl. Environ. Microbiol**, 66 (2000) 2620-2626.
- [82] L. Aravind, Y.I. Wolf, R.L. Tatusov, K.W. Minton, E.V. Koonin, M.J. Daly, *Genome of the extremely radiation-resistant bacterium Deinococcus radiodurans viewed from the perspective of comparative genomics*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev**, 65 (2001) 44-79.
- [83] V. Mattimore, J.R. Battista, *Radioresistance of Deinococcus radiodurans: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation*, **J. Bacteriol**, 178 (1996) 633-637.
- [84] L.M. Crowe, J.H. Crowe, *Anhydrobiosis: a strategy for survival*. **Adv. Space Res**, 12 (1992) 239-247.
- [85] C.W. Boylen, *Survival of Arthrobacter crystallopoietes during prolonged periods of extreme desiccation*. **J. Bacteriol**, 113 (1973) 33-37.
- [86] M.J. Daly *et al.* *Accumulation of Mn(II) in Deinococcus radiodurans facilitates γ -radiation resistance*. **Science**, 306 (2004) 1025–1028.
- [87] L.M. Markillie, S.M. Varnum, P. Hradecky, K.K. Wong, *Targeted mutagenesis by duplication insertion in the radioresistant bacterium Deinococcus radiodurans: Radiation sensitivities of catalase (katA) and superoxide dismutase (sodA) mutants*. **J. Bacteriol.**, 181 (1999).666-669.
- [88] N.P. Khairnar, H.S. Misra, S.K. Apte, *RecBC Enzyme Overproduction Affects UV and Gamma Radiation Survival of Deinococcus radiodurans*, **Science**, 7(1), (2008) 40-47.
- [89] P. Wang, H.E. Schellhorn, *Induction of resistance to hydrogen peroxide and radiation in Deinococcus radiodurans*, **Can. J. Microbiol**, 41 (1995) 170–176.

- [90] D.A. Rew, *Deinococcus radiodurans*, **Ejso-Eur J Surg Onc**, 29 (2003) 557-558.
- [91] C. Macilwain, *Science seeks weapons clean-up role*. **Nature**, 383 (1996) 375-379.
- [92] D.R. Lovely, J.D. Coats, *Bioremediation of metal contamination*, **Curr. Opin. Biotechnol**, 8 (1997) 285-289.
- [93] G.J. Zylstra, D.T. Gibson, *Toluene degradation by Pseudomonas putida F1: nucleotide sequence of the todC1C2BADE genes and their expressio.*. **J. Biol. Chem**, 264 (1989) 14940-14946.
- [94] M.J. Thornley, *Radiation resistance among bacteria*, **J. Appl. Bacteriol**, 26 (1963) 334-345.
- [95] S.J. Van Gerwen, F.M. Rombouts, K. Van't Riet, M.H. Zwietering, *A data analysis of the irradiation parameter D10 for bacteria and spores under various conditions*, **J. Food Prot.** 62 (1999) 1024-1032.
- [96] J.R. Battista, A.M. Earl, M.J. Park: *Why is Deinococcus radiodurans so resistant to ionizing radiation*, **Trends Microbiol**, 7:9 (1999) 362-365.
- [97] L. Diels, Q. Dong, D. Van der Lelie, W. Baeyens, M. Mergeay, *The czc operon of Alcaligenes eutrophus CH34: from resistance mechanism to the removal of heavy metals*. **J. Ind. Microbiol.** 14 (1995) 142-153.
- [98] H. Brim, J.P. Osborne, H.M. Kostandarithes, J.K. Fredrickson, L.P. Wackett, M.J. Daly, *Deinococcus radiodurans engineered for complete toluene degradation facilitates Cr(VI) reduction*, **Microbiol.** 152 (2006) 2469-2477.
- [99] G. Gao, B. Tian, L. Liu, D. Sheng, B. Shen, Y. Hua, *Expression of Deinococcus radiodurans PprI enhances the radioresistance of Escherichia coli*, **DNA Repair** 2 (2003) 1419–1427.
- [100] J.K. Frederickson, H.M. Kostandarithes, S.W. Li, A.E. Plymale, and M.J. Daly, *Reduction of Fe(III), Cr(VI), U(VI), and Tc(VII) by Deinococcus radiodurans R1*, **Appl. Environ. Microbiol**, 66 (2000) 2006–2011.
- [101] H. Brim, S.C. McFarlan, J.K. Fredrickson, K.W. Minton, M. Zhai, L.P. Wackett, M.J. Daly: *Engineering Deinococcus radiodurans for metal remediation in radioactive mixed waste environments*. **Nat. Biotechnology**, 18 (2000) 85-90.
- [102] Y. Suzuki, J.F. Banfield, *Resistance to, and Accumulation of, Uranium by Bacteria from a Uranium-Contaminated Site*, **Geomicrobiol. J**, 21: 2, 2004 , 113 – 121.
- [103] A. M. Melin, E. Peuchant, A. Perromat and M. Clerc, *Sensitivity to oxidative damage of two Deinococcus radiodurans strains*, **J. Appl. Microbiol**, 1998, 84, 531,-537.

- [104] F. I. Chou, S. T. Tan, *Manganese(II) induces cell division and increases in superoxide dismutase and catalase activities in an aging deinococcal culture*, **Journal of Bacteriology**, (1990)2029- 2035.
- [105] L.M. Markille, S.M. Varnum, P. Hradecky, K.K. Wong, *Targeted Mutagenesis by Duplication Insertion in the Radioresistant Bacterium Deinococcus radiodurans: Radiation Sensitivities of Catalase (katA) and Superoxide Dismutase (sodA) Mutants*, **Journal of Bacteriology**, (1999) 666-669.
- [106] S.D. Jun, C.R. Lei, S.C. Lin, W.L. Jun, Y.Z. Liang, Effect of N⁺ Beam Exposure on Superoxide Dismutase and Catalase Activities and Induction of Mn-SOD in Deinococcus Radiodurans, **Plasma Sci. Technol**, 2:5 (2000) 491-497.
- [107] M.J. Daly, K. Minton, *Interchromosomal recombination in the extremely radioresistant bacterium Deinococcus radiodurans*, **J. Bacteriol**, 177:19 (1995) 5495-5505.
- [108] J. Heidi, J. Agostini, D. Carroll, K.W. Minton, *Identification and Characterization of uvrA, a DNA Repair Gene of Deinococcus radiodurans*, **J. Bacteriol**, 178:23 (1996) 6759–6765.
- [109] E. Lennon, P.D. Gutman, H. Yao, K.W. Minton, *A highly conserved repeated chromosomal sequence in the radioresistant bacterium Deinococcus radiodurans SARKJ*, **Bacteriol**, 173:6 (1991) 2137–2140.
- [110] M. Tanaka, A.M. Earl, H.A. Howell, M.J. Park, J.A. Eisen, S.N. Peterson, J.R. Battista, *Deinococcus radiodurans' transcriptional response to ionizing radiation and desiccation reveals novel proteins that contribute to extreme radioresistance*, **Genetics**, 168 (2004) 21–33.
- [111] H. Luck, *Catalase. Methods of Enzymatic Analysis*, (1963), 885–888.
- [112] J.M. McCord, I. Fridovich, *Superoxide Dismutase: An Enzymic Function for Erythrocyte (Hemoerythrocyte)*, **J. Biol. Chem**, Vol. 244, No. 22, 6049–6055, (1969), November 25.
- [113] W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby, *The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation Glutathion S-Transferases*, **J. Biol. Chem**, (1974), 249: 7130-7139.
- [114] I. Carlberg, B. Mannervik, *Glutathione reductase*. **Method. Enzymol**, 113 (1985) 484-490.
- [115] T.P.M. Akerboom, H. Sies, *Assay of Glutathione, Glutathione Disulfide and Glutathione Mixed Disulfides in Biological Samples*. **Method Enzymol**, 77 (1981) 373-382.

- [116] M.M. Bradford, *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, **Anal. Biochem.**, 7:72 (1976) 248-254.
- [117] B. Duncan, *Multiple Range and multiple F Tests Biometrics*, 11 (1955) 1-14.
- [118] J.R. Battista, A.M. Earl, O. White, *The Stress Responses of Deinococcus radiodurans* In: *Bacterial Stress Responses*, (Eds.) G. Storz and R. Hengge-Aronis, ASM Press, Washington D. C. 2000 383-391.
- [119] N.K. Soung, Y.L. Lee, *Iso- Catalase profiles of Deinococcus sp*, **J. Biochem. Mol. Biol**, 33:5 (2000) 412-416.
- [120] T. Ott, E. Fritz, A. Polle, A. Schützendübel, *Characterisation of Antioxidative System in The Ectomycorrhiza-Building, Basidiomycete Paxillus involutus (Bartsch) Fr. And its Reaction to Cadmium*, **FEMS Microbiol. Ecol**, 42 (2002) 359-366.
- [121] J.M. Mates, *Effect of Antioxidant Enzymes in The Molecular Control of Reactive Oxygen Species Toxicology*, Department of Molecular Biology and Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Malaga, **Toxicol**, 153 (2000) 83-104.