

DNA Hasarı Analizinde μ -FADU ve COMET Yöntemlerinin Karşılaştırılması

The Comparison of μ -FADU and COMET Methods in DNA Damage Analysis

Abdulkerim Bedir* **Birşen Bilgici**** **Zafer Yurdakul****
Bilge Ş. Gürsel** **Muhlise Alvr***

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Samsun

*Biyokimya Anabilim Dalı, **Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı

ÖZET

μ -FADU (Florometrik DNA Unwinding Analizi) ve COMET, DNA hasarı ve tamir yeteneğinin hızlı tayini için geliştirilen yöntemlerdir. Bu iki yöntem de uygun denatüre edici şartlar altında DNA'da zamana bağlı alkali unwinding temeline dayanmaktadır. COMET florometrik, FADU ise spektrofotometrik bir yöntemdir. COMET yönteminde kuyruk momentini ve uzunluğu değerlendirilirken, FADU'da floresans miktarındaki değişim değerlendirilir. DNA hasarını gösteren bir çok yöntem bulunmaktadır. Biz bu çalışmada FADU ve COMET yöntemlerini DNA hasarı analizi açısından karşılaştırdık. Bunun için EDTA'lı tüplere alınan tam kandan lenfositler izole edildi (2000 hücre/ μ L). FADU yöntemi için bu hücre solüsyonundan total (T), background (B) ve g-radyasyon (cobalt 60) verilen örnek standart P tüpleri (P1 1 Gy, P2 2 Gy, P3 3 Gy, P4 4 Gy, P5 5 Gy) hazırlandı. Tüm tüplere FADU yöntemi Light Cycler'da (Roche) uygulanırken, farklı dozlarda g-radyasyon verilen P standart tüplerindeki hücrelere COMET yöntemi uygulandı ve floresans mikroskopta (Nikon E800) değerlendirildi. Hücrelerde oluşturulan DNA hasarı COMET ve FADU yöntemi ile kantitatif olarak değerlendirildi. FADU yöntemi ile T (total) en yüksek, B (background) en düşük floresansı verirken, P standart tüplerinin floresanslarının ise P1 > P2 > P3 > P4 > P5 şeklinde olduğu gösterildi. COMET yönteminde ise artan g-radyasyon ile uyumlu olarak kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentinin arttığı tespit edildi. İki yöntem regresyon analizi ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı (SPSS 10.0). Yöntemler arasında anlamlı bir ilişki tespit edildi ($r=0.9525$, $P=0.004$). Bu çalışma ile geleneksel FADU yöntemini 20 μ L gibi düşük hacimde, light cycler cihazında çalışarak DNA hasarının saptanabileceğini gösterdik ve COMET yöntemi ile karşılaştırarak iki yöntemin uyumlu olduğunu tespit ettik.

Anahtar Sözcükler: FADU (Florometrik DNA Unwinding Analizi), COMET, genotoksisite, -radyasyon

ABSTRACT

μ -FADU (Fluorometric Analysis of DNA Unwinding) and COMET are methods developed for the rapid detection of DNA damage and repair capacity. Both are based on time dependent alkaline DNA unwinding under appropriate denaturing conditions. COMET and μ -FADU are fluorometric and spectrofluorometric assays, respectively. Tail length and tail moment are assessed by the COMET method, while the decrease of fluorescent intensity are determined by FADU. There are lots of different methods for detecting DNA damage. In this study, we selected and compared μ -FADU and COMET methods for

DNA damage. The lymphocytes were isolated from whole blood collected with EDTA tubes (2000 cell/ μ L). Total (T), background (B) and standart P tubes irradiated by Cobalt 60 (P1 1 Gy, P2 2 Gy, P3 3 Gy, P4 4 Gy, P5 5 Gy) were prepared for μ -FADU and COMET assays. While μ -FADU method was performed to all tubes in LightCycler (Roche), COMET was applied only to standart P tubes irradiated by different dosages and assessed by fluorescence microscope (Nikon E800). The resulting DNA damage was assessed quantitatively bath by COMET and μ FADU methods. In μ -FADU method, the fluorecence of T and B tubes were the highest and lowest, respectively. The fluorecence of standart P tubes were in the decreasing order as follows: P1 > P2 > P3 > P4 > P5. As for COMET method, tail length and tail moment correlated with the γ -radiation dosage. Both methods were compared statistically by correlation and linear regression analysis. A significant relation was detected between methods ($r = 0.9525$, $p = 0.004$). In this study, we showed that DNA damage can be detected in Light Cycler with the μ -FADU method using low volume (20 μ L) as compared with the traditional FADU method. In addition to this, we compared μ -FADU and COMET methods and found that they were in good harmony with each other.

GİRİŞ

Genotoksisite, fiziksel ya da kimyasal ajanlarla genetik materyalde oluşan hasardır. Bu hasarlar; tek zincir kırıkları (SSB), çift zincir kırıkları (DSB), alkali labil bölgeler (ALS) ve DNA adductlarıdır (1).

Genetik materyalde oluşan hasarlar tamir edilemediğinde DNA sekans değişiklikleri, kromozom aberasyonları ile sonuçlanabilen tek veya birden fazla nükleotid değişiklikleri ve bunların sonucu olarak da rekombinasyon, mutasyon, doku hasarı, yaşlanma, kanser oluşabilmektedir. Mutasyonlar sıklıkla gen fonksiyonlarında değişiklik ya da kayıpla sonuçlanabilmektedir (1).

Moleküler kanser genetiğindeki son gelişmeler, karsinogenlerin çoğunun genotoksik ve karsinogenezisin onkogenler ve antionkogenlerdeki mutasyonlarla ilişkili olduğunu göstermiştir (1,2).

Genotoksisite testleri esas olarak kanserden korunmada, çevresel etkenlerin (UV, irradasyon), endüstriyel kimyasalların etkisini araştırmada, ilaçların piyasaya sürülmeden önce toksik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada kullanılmaktadır. Bu testler 1970'lerden beri kullanılmaktadır ve o tarihten günümüze kadar birçok in-vivo ve in-vitro genotoksisite testi geliştirilmiştir. Work-group of European Union (EU), Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) ve en son olarak Work- group of the International Conference on Harmonization of Technical

Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) standart seri testler tanımlamışlardır (1,2).

ICH çalışma grubu tarafından önerilen standart testlerden ilk kullanılanları Ames testi, Timidin Kinaz assay, Mikronükleus testi ve daha sonra kullanılmaya başlanılan ve önemi giderek artmakta olan FADU (Fluorescence Analysis of DNA Unwinding), kromozomal translokasyonların gösterilmesinde FISH (fluorescent in situ hybridization), p53 mutasyon tayini, apoptosisin saptanması, antisentromer antikörler ile anoploidi tayini ve COMET (SCGE: Single Cell Gel Electrophoresis) yöntemleridir (1).

Bakteri, maya ve memeli hücrelerinde zincir kırıklarını kantitatif olarak değerlendiren nötral veya alkali şartlarda DNA hasarını ölçen birçok metod tanımlanmıştır. Nötral şartlarda (pH 7.0-9.6) DNA çift zincir yapısını korumakta ve bu nedenle sadece çift zincir kırıkları saptanabilmektedir. Alkali şartlara bağlı metotlarda, çift zincir DNA'da unwinding olayı gerçekleşmekte ve çift zincir kırıkları, tek zincir kırıkları ve alkali labil bölgeler saptanabilmektedir (3-4).

FADU; ilk olarak Birnboim ve Jevcak tarafından X-ray kaynaklı DNA hasarının tespiti için uygulanmıştır. Genotoksik ajanlarla indüklenmiş DNA hasarının göstergesi olarak, DNA zincir kırıklarının tayininde hızlı ve güvenilir bir metottur. FADU, alkali unwinding esasına dayanan spektroflorometrik bir yöntemdir

ve floresan miktarındaki değişimleri kantitatif olarak değerlendirme yapılmaktadır (5,6).

COMET; Singh ve ark. (7) (1988) tarafından, tek hücre düzeyinde DNA hasarını saptamak için alkali şartlar (pH>13) altında elektroforezi içeren mikrojel tekniği kullanılarak uygulanmıştır. Diğer genotoksisite tayin yöntemleri ile karşılaştırıldığında; düşük düzeylerde DNA hasarlarının saptanabilmesindeki yüksek sensitivitesi, tek hücre düzeyinde çalışılabilir olması, kısa sürede ve kolay uygulanabilirliği ve düşük maliyeti COMET yönteminin avantajlarından (7).

Bu çalışmadaki amacımız, γ -radyasyon vererek DNA hasarı oluşturduğumuz lenfositlerde genotoksisite tayini ve hasarın gösterilmesinde FADU ve COMET yöntemlerinin karşılaştırılmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre İzolasyonu

Bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalının katkılarıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda kullanılan tüm kimyasallar Sigma (Taufkirschen, Almanya) Türkiye bayisinden temin edilmiştir. Lenfositler periferik tam kandan kolay elde edilebilmeleri ve vücuttaki oksidatif stres düzeyini iyi yansıtılabilmeleri nedeniyle genotoksisite çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir (8). Bizim çalışmamızda da, K3-EDTA'lı tüplere alınan tam kandan Histopaque- 1077 (Sigma, Taufkirschen, Almanya) ile izole edilen lenfositler kullanıldı. PBS (pH 7.4, 10 mM) ile hücre sayısı 2000/ μ L olacak şekilde ayarlandı.

Lenfositlere radyasyon uygulanması; polistiren tüplerde PBS içerisindeki 2000/ μ L lenfositler buz üzerinde Kobalt 60 teleterapi cihazı (Theratronics, Theratron 780-C) kullanılarak elde edilen gamma ışınları ile kaynakobje uzaklığı 80 santim olacak şekilde radyasyona tabi tutuldu. Gruplara sırasıyla (0.5 cm'deki doz) 1Gy, 2Gy, 3Gy, 4Gy, 5Gy radyasyon uygulandı.

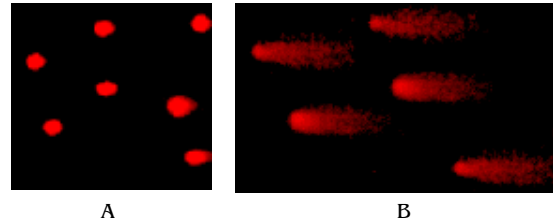
μ -FADU

FADU yöntemi için lenfosit süspansiyonunda total floresansı gösteren T tüpü, background'u gösteren B tüpü ve sırasıyla 0,1, 2, 3 ve 4 Gy γ -radyasyon (Cobalt 60) verilen 5 tane P tüpü hazırlandı. T tüpüne alkalinizasyon (0.1 M NaOH), hemen ardından nötralizasyon (0.1 M HCl), 30 dakika inkübasyon ve 30 saniye sonikasyon uygulandı. B tüpüne alkalinizasyon (0.1 M NaOH), 30 saniye sonikasyon, 30 dakika inkübasyon, nötralizasyon (0.1 M HCl) ve 30 saniye resonikasyon uygulandı. P tüplerine alkalinizasyon (0.1 M NaOH), 30 dakika inkübasyon, nötralizasyon (0.1 M HCl) ve 30 saniye sonikasyon uygulandı. Her tüpten 19 μ L alınarak Light-Cycler kapiller tüplerine konuldu. Üzerlerine 1 μ L SYBR Green (Molecular Probes, Oregon, Amerika Birleşik Devletleri) floresan boya eklendi. Kapiller tüpler Light-Cycler cihazına (Roche, Mannheim, Almanya) yüklenerek floresan boyanın dsDNA/ssDNA oranına bağlı olarak gösterdiği emisyonel değişiklik florometrik olarak değerlendirildi.

COMET

Kırk DNA'nın alkali elektroforez sırasında hücre dışına çıkması ile DNA hasarını yansıtan kuyruklu yıldız görüntüsünden adını alan SCGE floresan mikroskopik bir yöntemdir (Şekil 1).

COMET, FADU yönteminde de kullanılan ve değişik dozlarda γ -radyasyon (Cobalt 60) verilen hücrelerde gerçekleştirildi. Bu hücre örneklerinin her biri ayrı ayrı %0.75 Low Melting Point agarose (LMP) jel içinde resüspanse



Şekil 1. COMET yöntemi ile floresan mikroskopta görüntülenen gamma radyasyon verilmemiş sağlıklı lenfositler (A) ve gamma radyasyon verilmiş DNA kırıkları olan lenfositler (B).

edildi. Bu süspansiyonlar, %0.50 Normal Melting Point agarose (NMP) jel dökülmüş polilizin kaplı lamlara yüklendi. Üzerleri tekrar NMP agarose jel ile kaplandı. Bu hücreler 1 saat lizise tabi tutuldu (Lysis Buffer, 2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris (pH: 10), %1 Triton-X-100). Alkali unwinding ve alkali elektroforezi (Elektroforez Buffer, 10 mM EDTA, 300 mM NaOH, %0.1 w/v 8-Hydroxyquinoline, pH 13.1) takiben nötralizasyon (Nötralizasyon Buffer, 0.4 M Tris, pH:7.5) yapıldı. Ethidium Bromide ile boyamanın ardından hücreler floresan mikroskopta (Nikon Eclipse E800) değerlendirildi (7,9). Floresan mikroskopta görüntülenen hücreler dijital imaj analizine tabi tutulduktan sonra ve kuyruk uzunluğu (tail length) ve kuyruk momenti (tail moment) esas alınarak COMET skorlaması yapıldı. Her bir örnek için en az 50 hücrenin imaj analizi yapıldıktan sonra ortalamaları alındı.

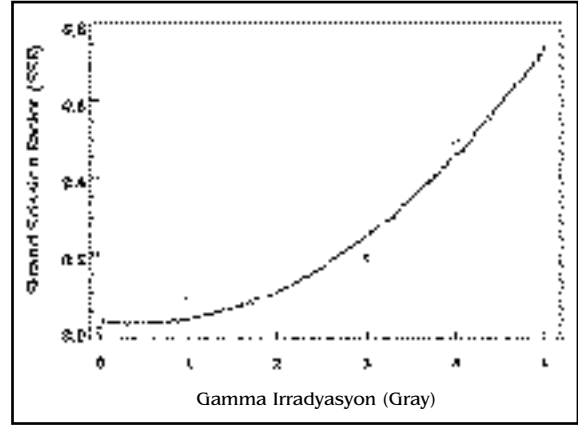
İstatistik

Her bir yöntemin kendi içinde doz-cevap bakımından tutarlılığı ayrı ayrı lineer regresyon analizleriyle ve iki yöntemin karşılaştırılması ise korelasyon ve regresyon analizleri ile yapıldı (SPSS 10.0). $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

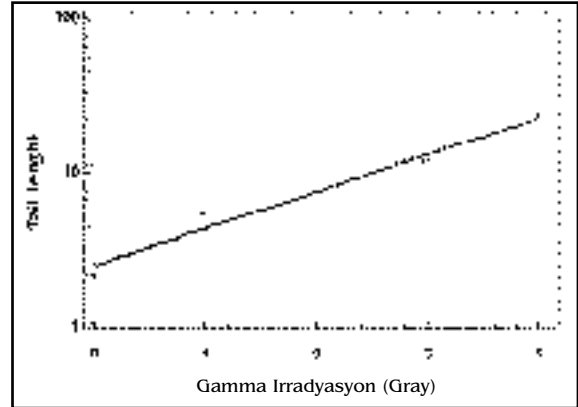
FADU yöntemi ile gama radyasyon dozu (Gy) arasındaki ilişki T, B ve P örneklerindeki dsDNA ile SYBR Green kompleksinin floresans yoğunluğuna göre değerlendirildi. Bunun için elde edilen RLU (Relative Light Unit) değerlerinden, SSF (Strand Scission Factor) = $-\ln(F_D/F_{D0})$ formülüyle hesaplandı ($F = (P-B)/(T-B)$). Lenfositlere verilen gama radyasyon dozu ile SSF arasındaki ilişki regresyon analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildi ve anlamlı ilişki bulundu ($r = 0.98$, $p = 0.001$, Şekil 2).

COMET yöntemi ile gama radyasyon dozu arasındaki ilişki elektroforez esnasında anoda doğru göç eden kırık DNA'ların oluşturduğu kuyruklu yıldız floresan mikroskopta görüntüledi ve kuyruğun uzunluğu ile momenti



Şekil 2. Gama radyasyon ile FADU arasındaki ilişki ($r=0.98$, $p=0.001$).

imaj analizi ile değerlendirildi. Lenfositlere verilen gama radyasyon dozu ile Tail length ve Tail moment arasındaki ilişki regresyon analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Tail length ($r = 0.99$, $p = 0.012$, Şekil 3) ve Tail moment ($r = 0.99$, $p = 0.008$, Şekil 4) ile anlamlı ilişkili bulundu.



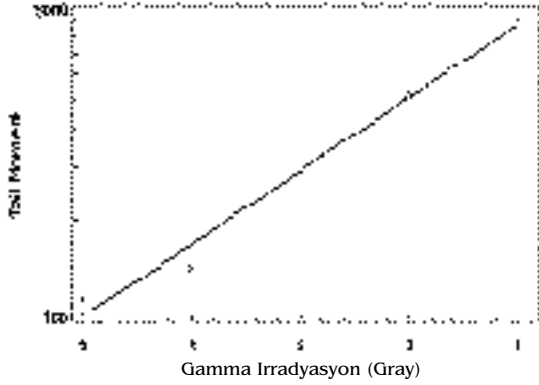
Şekil 3. Gama radyasyon ile COMET arasındaki ilişki ($r=0.99$, $p=0.012$).

Tablo 1'de lenfositlere verilen gama radyasyon dozları (Gy), FADU yöntemi ile elde edilen RLU (Relative Length Unit), SSF (Strand Scission Factor), COMET yöntemi ile elde edilen Tail length ve Tail moment değerleri verilmiştir.

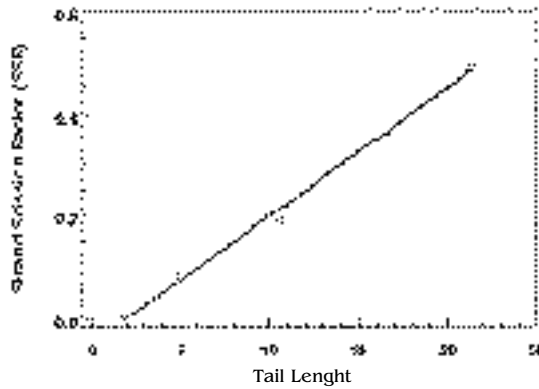
FADU ve COMET yöntemlerinin karşılaştırılmasında ise SSF ile Tail length ve Tail moment ayrı ayrı regresyon analizi ile karşılaştırıldı; sırasıyla $r = 0.99$, $p = 0.004$ ve $r = 0.98$, $p = 0.021$ bulundu (Şekil 5 ve 6).

Tablo 1. Radyasyon dozu ile uyumlu FADU (RLU, SSF) ve COMET (Tail length, Tail moment) parametreleri.

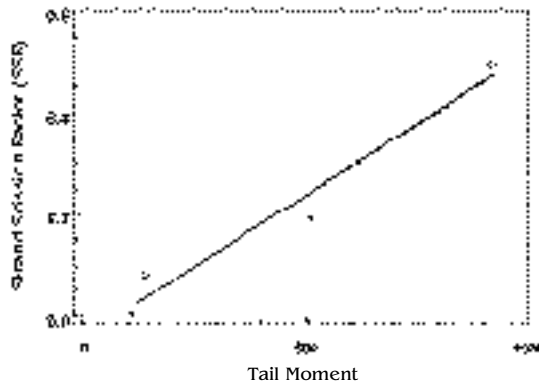
Radyasyon dozu (Gy)	RLU	SSF	Tail length	Tail moment
0	1.087	0	1.9525	109.61
1	0.921	0.082	4.8520	139.40
2	0.827	0.189	6.3100	206.35
3	0.609	0.496	10.678	507.76
4	0.478	0.738	21.452	917.88



Şekil 4. Gama radyasyon ile COMET arasındaki ilişki ($r=0.99$, $p=0.008$).



Şekil 5. FADU ile COMET arasındaki ilişki ($r=0.99$, $n=0.004$).



Şekil 6. FADU ile COMET arasındaki ilişki ($p=0.98$, $r=0.021$).

TARTIŞMA

İyonize radyasyonun SSB, DSB, ALS ve okside pürin ve pirimidinlere neden olduğu bilinmektedir (12, 13). İyonize radyasyon ile hücrelerde oluşan hasarlar ya tamamen tamir edilir veya eksik, hatalı tamir edilir ya da hücreyi apoptosise götürür. Eğer hatalı tamir gerçekleşirse hücre karsinogenezis için potansiyel risk taşır (10).

İn vitro olarak insan periferik kan hücrelerinde radyasyonla oluşturulan DNA hasarının tayininde ve tamir yeteneğinin değerlendirilmesinde COMET yönteminin uygunluğu birçok çalışmada belirtilmiştir. COMET yönteminin avantajlarından dolayı, genotoksisite çalışmalarında kullanımı giderek artmıştır. Düşük dozlardaki radyasyona maruziyetin tayini için yeterli sensitiviteye sahiptir (14-16).

FADU yöntemi Birnboim ve Jevcak tarafından genotoksik ajanların etkisini saptayabilmek amacıyla, DNA zincir kırıkları tayini için geliştirilmiş ve daha sonra diğer araştırmacılar tarafından modifiye edilmiştir. Metodun kesinliğini ve sensitivitesini belirleyen faktörler; 1- maruz kalmamış hücrelerdeki zincir kırıklarının sayısı, 2- maruz kalmış hücrelerdeki serbest DNA uçlarının sayısı, 3- unmiding prosedürü ile oluşan tek zincir fragmanlarının boyutu ve dağılımı, 4- ssDNA ve dsDNA ayırımıdır. Radyasyon ve kimyasal ajanların potansiyel DNA hasarlarının bir indeksi olarak, DNA'daki zincir kırıklarının tespitinde FADU, hızlı sensitif ve güvenilir bir methodur. DNA hasarı SSF olarak ölçülmektedir (11).

FADU yöntemi ile radyasyon dozu arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalar yapılmıştır ve doz-efekt eğrisi, radyasyondan hemen sonra

alkali unwinding protokolü uygulandığında lineer bulunmuştur (11).

Yapılan bir çalışmada UV light, MMS(methyl methane sulfonate), BPDE(benzopyren-diol-epoxide) gibi genotoksik ajanlara maruz tutulan periferik lenfositler DNA hasar ve tamir paternleri için FADU ve UDS (Unscheduled DNA Synthesis) yöntemleri ile karşılaştırılmıştır ve UV ile benzer bulunurken kimyasal ajanlarla oluşturulan DNA hasar kimyasalın dozuna bağlı olarak yöntemler arası farklı bulunmuştur (6). Bu çalışmada FADU yöntemi UDS yönteminden daha sensitif ve 3-4 kat daha düşük dozdaki genotoksik etkileri tespit edebildiği gösterilmiştir.

Genotoksisite çalışmalarında kullanılan yöntemin başka bir yöntemle desteklenmesi başka bir deyişle bir maddeye genotoksik denmesi için en az iki yöntemle çalışılması önerilmektedir (1).

Bu araştırmada sensitiviteyi oldukça yüksek olan FADU ve COMET yöntemlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde paralellik gösterdiği bulunmuştur. Bu iki yöntemin radyasyon doz-efekt eğrilerinin lineer olduğu gösterilmekle birlikte iki yöntemin karşılaştırıldığı başka bir çalışma, literatürde bulunmamıştır. Ayrıca literatürde FADU doz efekt eğrisi ile ilgili çalışma bulunmasına rağmen, COMET doz-efekt eğrisi ile ilgili çalışmaya da rastlanmamıştır.

Kullandığımız bu iki yöntem, uygulaması kolay, fazla zaman almayan, az miktarda numune ile çalışılan sensitiviteyi yüksek genotoksisite yöntemleridir. Genotoksisite çalışmalarında periferik lenfositlerde DNA hasarının gösterilmesinde COMET yöntemi ile FADU yönteminin birarada kullanılması durumunda sensitiviteyi ve güvenilirlikleri daha da artacaktır.

KAYNAKLAR

1. Kramer PJ. Genetic Toxicology. J Pharm Pharmacol 1998; 50: 395-405.
2. Jena B, Kaul CL, Ramarao P. Genotoxicity Testing, a Regulatory Requirement For drug Discovery and

Development: Impact of ICH Guidelines. Indian Journal of Pharmacology 2002; 34: 86-99.

3. Ahnstrom G, Erixon K. Radiation induced strand breakage in DNA from mammalian cells. Int J Radiat Biol 1973; 23: 285-289.
4. Birnboim HC. Fluorometric analysis of DNA unwinding to study strand breaks and repair in mammalian cells. Methods Enzymol 1990; 186: 550-555.
5. Birnboim HC, and Jevcak JJ. Fluorometric method for rapid detection of DNA strand breaks in human white blood cells produced by low doses of radiation. Cancer Res 1981; 41: 1889-1892
6. Celotti L, Ferraro P, and Biasin MR. Detection by fluorocence analysis of DNA unwinding and unscheduled DNA synthesis of DNA damage and repair induced in vitro by directacting mutagens on human lymphocytes. Mutat Res 1992; 281: 17-23.
7. Tice RR, Agurell E, Anderson D, and Burlinson B, Hartman A, Kobayashi H, et al. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Mutation Research 2000; 35: 206-221.
8. Giovannelli L, Pitozzi V, Riolo S, Dolara P. Measurement of DNA breaks and oxidative damage in polymorphonuclear and mononuclear white blood cells: a novel approach using the comet assay. Mutation Research 2003; 538: 71-80.
9. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clayn P, et al Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. Mutagenesis 2003; 18: 45-51.
10. Creagen SP, Boreham DR, Walker PR, Brown DL, Mitchel REJ. Biochem. Cell Biol., Modification of radiation-induced apoptosis in radiation- or hyperthermia-adapted human lymphocytes 1994; 72: 475-482.
11. Baumstark-Khan C, Hentschel U, Nikandrova Y, Krug J, and Horneck G. Photochemistry and Photobiology, Fluorometric Analysis of DNA unwinding (FADU) as a method for detecting repair-induced DNA strand breaks in UV-irradiated mammalian cells., 2000; 72(4): 477-484.
12. Frankenberg-Schwager M. Radiat. Environ. Biophys., Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eucaryotic cells., 1990; 29: 273-292.
13. Ward JF. Radiat. Res., Radiation mutagenesis: the initial DNA lesions responsible., 1995; 142: 362-368.
14. Vijayalaxmi RR, Tice RR, and Strauss GHS. Mutation Res., Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single cell electrophoresis technique., 1992; 271: 243-252.

15. Olive PI, Wlodek D, and Banath JP. Cancer Res., DNA double strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis., 1991; 51: 4671-4676.
16. Lankinen MH, Vilpo LM, and Vilpo JA. Mutation Res., UV and -irradiation-induced DNA single-strand breaks and their repair in human blood granulocytes and lymphocytes., 1996; 352: 31-38.

Yazışma adresi:

Dr. Abdulkerim Bedir
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı, 55139 SAMSUN
Tel.: (0 362) 457 60 00 / 2667
E-posta: abedir@omu.edu.tr
