



**TALASEMİ TAŞIYICISI ÇOCUKLARDA GENOTOKSİSİTE VE
SİTOTOKSİSİTENİN SİTOM YÖNTEMİYLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ezgi ÖZEL BABACANOĞLU

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2016

Ezgi ÖZEL BABACANOĞLU tarafından hazırlanan “Talasemi Taşıyıcısı Çocuklarda Genotoksisite ve Sitotoksisitenin Sitom Yöntemiyle Değerlendirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Gonca ÇAKMAK DEMİRCİGİL
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Başkan : Prof. Dr. Sema BURGAZ
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Üye : Prof. Dr. Ülkü ÜNDEĞER BUCURGAT
Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum



Tez Savunma Tarihi: 14/07/2016

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

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

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

Ezgi ÖZEL BABACANOĞLU
14.07.2016

TALASEMİ TAŞIYICISI ÇOCUKLARDA GENOTOKSİSİTE VE SİTOTOKSİSİTENİN SİTOM YÖNTEMİYLE DEĞERLENDİRİLMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Ezgi ÖZEL BABACANOĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2016

ÖZET

Kalıtsal hemoglobin bozukluklarından biri olan talaseminin, en sık görülen türü beta talasemidir. Beta talasemi majör bireylerle yapılan çalışmalarda genotoksisite riskinde artış gösterilmiştir. Ancak günümüze dek beta talasemi minör (BT minör) bireyler ile yapılmış genotoksisite riskinin değerlendirildiği kapsamlı bir çalışma bulunmamakta ve yapılmış çalışmaların sonuçlarından yeterli bilgi sağlanamamaktadır. Çalışmamızda BT minör çocuklardaki genotoksisite riskinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Genotoksisitenin kanser gelişiminde ara bir basamak olduğu bilinmektedir. Çocukluk çağında olası bir riskin saptanması, gelecekte kanser oluşumunu engellemeye yönelik önlemlerin alınması için fırsat sağlayacaktır. Çalışma grubunu oluşturan BT minör çocuklar (n=79) ile bu çocukların sağlıklı kardeşleri ya da benzer demografik özelliklerdeki sağlıklı çocuklarda (n=74), geçerlenmiş ve etkin bir yöntem olan sitogenezin durdurulduğu mikroçekirdek yöntemi (SD-MÇ) (sitom yöntemi) kullanılmıştır. MÇ sayısının yanı sıra NT ve NPK sıklıkları belirlenerek, NBİ hesaplanarak sitom analizi gerçekleştirilmiştir. Çalışma tasarımında sadece hastalık etkilerini gösterebilmek için; yaş, cinsiyet, diyet, sigara ve çevresel farklılıklar gibi karıştırıcı faktörler önlenmeye çalışılmış, popülasyon büyüklüğü yeterli genişlikte seçilmiştir. Hematolojik ve biyokimyasal parametreler de incelenerek sitom yöntemi verileri ile ilişkileri araştırılmıştır. Çalışmamız BT minör çocuklarda genotoksisitenin araştırıldığı ve SD-MÇ yönteminin kullanıldığı bilimsel literatürdeki ilk çalışmadır. Çalışmamızda, genotoksisite ve sitotoksisite parametreleri ve oksidatif stres ile ilişkilendirilen biyokimyasal parametreler, BT minör ve sağlıklı çocuklarda benzer bulunmuştur ($p>0,05$). MÇ sıklığı için bulunan kesim noktasının üstünde MÇ sıklığına sahip BT minör çocukların (%39,2), sağlıklı çocuklardan (%21,6) istatistiksel olarak daha fazla olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). BT minör çocuklar ile sağlıklı çocuklar arasında anlamlı fark gösteren biyokimyasal parametreler ile sitom parametreleri arasındaki anlamlı ilişkiler ise ileride araştırılabilir çalışma konusu olarak düşünülmektedir. Sonuç olarak, çocuklarda BT minör olmak genotoksisite açısından her ne kadar riskli görünmese de, yaşamın ilerleyen yılları ile risk faktörlerinin artması sonucu etkileşimler araştırılmalı, BT minör çocuklar takip edilmelidir. İlk olma özelliğindeki çalışmamızın, yetişkin BT minör bireylerde de tekrarlanmasında yarar vardır.

Bilim Kodu : 1021

Anahtar Kelimeler : Çocuk, talasemi minör, sitom yöntemi, mikroçekirdek yöntemi

Sayfa Adedi : 71

Danışman : Doç. Dr. Gonca ÇAKMAK DEMİRCİGİL

EVALUATION OF GENOTOXICITY AND CITOTOXICITY OF THALASSEMIA
CARRIER CHILDREN BY CYTOME ASSAY

(M. Sc. Thesis)

Ezgi ÖZEL BABACANOĞLU

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

July 2016

ABSTRACT

Thalassemia is one of the hereditary hemoglobin disorders, the most common type is beta thalassemia. It is shown that genotoxicity risk is increased in beta thalassemia major patients. Until now there is no comprehensive study which the risk of genotoxicity in beta thalassemia (BT) minor individuals are evaluated and the data of these studies is insufficient for conclusion. In our study, it has been tried to clarify the possible risk of genotoxicity and cytotoxicity in BT minor children. It is known that genotoxicity is intermediate step in carcinogenesis. Detection of possible risk in childhood provides an opportunity to take measures for cancer prevention in the future. In our study, BT minor children have been included as study group (n=79), healthy sisters and brothers of these children and healthy children which have similar demographic characteristics are included as control group (n=74). Cytokinesis blocked micronucleus assay (CB-MN) (cytome assay) which is validated and efficient method has been used to assess the risk of genotoxicity and cytotoxicity. With determination of number of micronucleus (MN), frequency of nuclear bud and nucleoplasmic bridge and calculation of nuclear division index cytome analysis has been done. In the design of this study, it has been tried to prevent any confounding factors such as age, gender, diet, smoking and environmental differences between the study and control group and adequate population is chosen to demonstrate only the disease effects. Hematologic and biochemical parameters also were evaluated and the relation between these outcomes and data of cytome assay were assessed. Our study is the first in the literature with regards to study design to investigate the genotoxicity and cytotoxicity in thalassemia minor children by usage of CB-MN assay. Similar outcomes were found in control and study group in terms of genotoxicity, cytotoxicity parameters and, biochemical parameters associated with oxidative stress ($p>0,05$). It is found that number of study group is higher than the number of control group which are over the cut off point of MN frequency. The control and study group were evaluated according to MN frequency cut off point, and the number of individuals in BT minor group (%39,2) according to the cut off point were statistically higher than the number of individuals in healthy children group (%21,6). The significant relations between the cytome parameters and parameters which are significant between BT minor and healthy children can be subjects for further evaluations. However our results indicate that being BT minor children is not a risk in terms of genotoxicity, with the continuation of life the risk factors can be induced, so that the interactions and monitorization should be considered for BT minor children. It is beneficial to repeat our research in BT minor adults.

Science Code : 1021

Key Words : Children, thalassemia minor, cytome assay, micronucleus assay

Page Number : 71

Advisor : Assoc. Prof. Dr. Gonca ÇAKMAK DEMİRCİGİL

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanmasından tamamlanmasına kadar her aşamasında, değerli bilgi ve katkılarıyla bana yön veren, desteğini, ilgisini ve anlayışını hiçbir koşulda eksik etmeyen çok değerli hocam Doç. Dr. Gonca ÇAKMAK DEMİRCİGİL'e her türlü desteği için sonsuz teşekkür ederim.

Projenin oluşturulmasında ve deneylerimin yürütülmesi sırasındaki yardım ve destekleri için Uzm. Dr. Esra EMERCE'ye, bu çalışmanın gerçekleştirilmesindeki katkılarından dolayı Prof. Dr. Deniz ASLAN, istatistiksel analizlerdeki desteği için Doç. Dr. Umut ARSLAN'a ve tezimde kullandığım teorik bilgileri edinmemde katkıda bulunan fakültemiz Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince beni her zaman cesaretlendiren, attığım her adımda arkamda olduğunu bildiğim, karşılaştığım her sorunu dinleyip sabırla çözüm bulan, tüm stresli zamanlarımda anlayış ve sabrını hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili eşim Uzm. Ecz. Can BABACANOĞLU'na tüm kalbimle teşekkürler.

Yine eğitim hayatım süresince gösterdikleri büyük özveri ile beni her konuda destekleyen, fedakarlıktan asla kaçınmayan, hayatımın her döneminde ilgi ve sabırlarıyla yanımda olan başta annem Hacer ÖZEL, babam Servet ÖZEL ve kardeşim Berk ÖZEL olmak üzere ailemin Hanımlar ekibine manevi hiçbir yardımlarını esirgmeden yanımda oldukları, sevgi ve desteklerini her zaman hissettirdikleri için çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Kalıtsal Hemoglobin Hastalıkları.....	5
2.1.1. Hemoglobin ve globin zincirinin yapısı.....	5
2.1.1.1. Hemoglobin yapısı.....	5
2.1.1.2. Globin yapısı.....	6
2.2. Talasemi	7
2.2.1. Talaseminin tanımı.....	7
2.2.2. Talaseminin epidemiyolojisi	8
2.2.3. Talasemi tipleri.....	9
2.2.3.1. Alfa talasemi.....	9
2.2.3.1.1. Fizyopatoloji.....	10
2.2.3.1.2. Alfa talasemi tipleri ve teşhisi	10
2.2.3.2. Beta talasemi.....	11
2.2.3.2.1. Fizyopatoloji.....	11
2.2.3.2.2. Beta talasemi tipleri ve teşhisi	11
2.2.3.2.2.1. Beta talasemi majör	12
2.2.3.2.2.2. Beta talasemi intermedia.....	12
2.2.3.2.2.3 Beta talasemi minör	13
2.3. Oksidatif Stres, Talasemi ve Genotoksisitedeki Yerleri	13
2.3.1. Oksidatif stres	13
2.3.2. Oksidatif Stresin Talasemi ile İlişkisi	14
2.3.3. Genotoksisite.....	15

2.3.3.1. Genotoksisite testleri ve kullanım alanları	16
2.3.3.1.1. Mikroçekirdek yöntemi	17
2.3.3.1.2. Mikroçekirdek yönteminin biyoizleme çalışmalarındaki kullanım alanları.....	20
2.3.3.2. Talasemi ve Genotoksisite.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. BT Minör Çocuklar (Çalışma Grubu) ve Sağlıklı Çocuklar (Kontrol Grubu) ile Çalışma Popülasyonunun Belirlenmesi	25
3.2. Çalışma ve Kontrol Grubundan Biyolojik Örneklerin Toplanması	26
3.3. Sitokinezin Durdurulduğu Mikroçekirdek (SD-MÇ) Yöntemi.....	26
3.3.1. Kullanılan kimyasallar	26
3.3.2. Kullanılan Aletler.....	27
3.3.3. Deneyin Yapılışı.....	27
3.3.3.1. Gerekli çözeltilerin hazırlanması.....	27
3.3.3.2. SD-MÇ Yöntemi.....	28
3.4. İstatistiksel Analiz.....	32
3.4.1. Popülasyon büyüklüğünün belirlenmesi için yapılan pilot çalışma.....	32
3.4.2. Çalışma ve kontrol grubunun istatistiksel analizi	32
4. BULGULAR	35
4.1. Çocuklara ait demografik özellikler.....	35
4.2. Çocuklara ait tam kan sayımı parametreleri, biyokimyasal parametreler ve hemoglobin elektroforez sonuçları.....	37
4.3. SD-MÇ yöntemine ait sonuçlar.....	39
4.4. Genotoksisite ve sitoksisite parametreleri ile biyokimyasal parametreler arasındaki ilişki analizi	46
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	55
KAYNAKLAR	57
EKLER.....	65
EK-1. Etik kurul onayı	66
EK-2. Gönüllü beyan formu.....	68

EK-3. Anket formu.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	71



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. BT minör çocuklar ve sağlıklı çocukların genel özellikleri.....	36
Çizelge 4.2. Tam kan sayımı parametreleri, biyokimyasal parametreler ve hemoglobin elektroforez sonuçları.....	38
Çizelge 4.3. Grupların genotoksisite ve sitotoksisite parametreleri ile karşılaştırılması.....	39
Çizelge 4.4. ≤ 7 yaş grupların genotoksisite ve sitotoksisite parametreleri ile karşılaştırılması.....	41
Çizelge 4.5. >7 yaş grupların genotoksisite ve sitotoksisite parametreleri ile karşılaştırılması.....	42
Çizelge 4.6. Kardeşi olan BT minör çocuklar ile bu çocukların sağlıklı kardeşleri arasındaki genotoksisite ve sitotoksisite parametreleri karşılaştırması.....	44
Çizelge 4.7. MÇ sıklığı kesim noktasına göre BT minör çocuklar ve sağlıklı çocukların çapraz tablosu.....	45
Çizelge 4.8. Lojistik regresyon analizi ile BT minör grupta olmayı etkileyen parametrelerin irdelenmesi.....	45
Çizelge 5.1. Tarihsel dizilime göre günümüze dek talasemili bireylerde yapılan tüm genotoksisite çalışmalarının özeti.....	48

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil		Sayfa
Şekil 2.1.	Hemoglobin molekülünün yapısı.....	6
Şekil 2.2.	Globin genlerinin kromozomal organizasyonu.....	7
Şekil 2.3.	Türkiye’de beta talasemili bireylerin dağılımı.....	9
Şekil 2.4.	MÇ oluşumu	18
Şekil 2.5.	Sitotoksik/genotoksik bir ajana maruziyeti takiben hücrede SD-MÇ yöntemi ile belirlenebilen çeşitli oluşumlar.....	19
Şekil 3.1.	SD-MÇ yöntem protokolü	29
Şekil 3.2.	NPK oluşumu	31
Şekil 3.3.	Mikroskopta Mikroçekirdek (MÇ), Nükleoplazmik Köprü (NPK) ve Nükleer Tomurcuk (NT) görünüşleri	32
Şekil 4.1.	BT minör çocuklar ve sağlıklı çocuklarda MÇ, MÇ’li hücre, NT, NPK sıklıkları ve NBİ’nin karşılaştırılması.....	40
Şekil 4.2.	≤7 yaş BT minör çocuklar ve sağlıklı çocuklarda MÇ, MÇ’li hücre, NT, NPK sıklıkları ve NBİ’nin karşılaştırılması.....	42
Şekil 4.3.	>7 yaş BT minör çocuklar ve sağlıklı çocuklarda MÇ, MÇ’li hücre, NT, NPK sıklıkları ve NBİ’nin karşılaştırılması.....	43

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
ε	Epsilon
10.e6/μl	1 mikrolitredeki 10^6 sayı
10.e3/μl	1 mikrolitredeki 10^3 sayı
fl	Femtolitre
g/dl	1 desilitredeki gram ağırlık
milyon/mm^3	1 milimetreküpteki milyon sayı
mg/l	1 litredeki miligram ağırlık
ng/ml	1 mililitredeki nanogram ağırlık
μM	Mikro molar
pg/ml	1 mililitredeki pikogram ağırlık
μg/dl	1 desilitredeki mikrogram ağırlık

Kısaltmalar	Açıklamalar
BK	Lökosit sayısı
BKİ	Beden kitle indeksi
BT	Beta talasemi
CBC	Tam kan sayımı
CRP	Seroaktif protein
Cyt-B	Sitokolazin-B
DMSO	Dimetil sülfoksit

Kısaltmalar	Açıklamalar
Fe⁺²	Demir (II) iyonu
Hb	Hemoglobin
HbA	Hemoglobin A
HbA2	Hemoglobin A2
HbF	Fetal hemoglobin
HbH	Hemoglobin H
HCT	Hematokrit
K⁺	Potasyum iyonu
KA	Kromozomal aberasyon
KCl	Potasyum klorür
Maks	Maksimum
MCH	Ortalama eritrosit hemoglobini
MCHC	Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu
MCV	Ortalama eritrosit hacmi
MÇ	Mikroçekirdek
Min	Minimum
NBİ	Nükleer bölünme indeksi
NPK	Nükleoplazmik köprü
NT	Nükleer tomurcuk
OECD	Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü
PCAHC	Polisiklik aromatik hidrokarbon
RBC	Eritrosit sayısı
RDW	Eritrosit dağılım genişliği
ROT	Reaktif oksijen türleri
SCE	Kardeş kromatit değişimi
SD-MÇ	Sitokinezin durdurulduğu mikroçekirdek yöntemi
SS	Standart sapma
PKL	Periferel kan lenfositleri
PLT	Trombosit sayısı
TAS	Total antioksidan seviye
TOS	Total oksidan seviye
TSI	Transferrin saturasyon indeksi

Kısaltmalar**Açıklamalar****UIAB**

Doymamış demir bağlama kapasitesi

8-OhdG

8-hidroksi-2'-deoksiguanozin



1. GİRİŞ

Talasemiler, dünya genelinde, tek gen hastalığı olarak en yaygın görülen önemli bir halk sağlığı sorunudur (Tuzmen ve Schechter, 2001). Kalıtsal hemoglobin bozukluklarının (hemoglobinopatiler) bir alt grubu olarak (Weatherall ve diğerleri, 2006), hemoglobin molekülünün polipeptid zincirindeki yapısal değişikliklerden veya polipeptid zincirinin sentezindeki bozukluklardan kaynaklanırlar ve sentezi bozulmuş olan globin zincirinin ismine göre sınıflandırılırlar (Tuzmen ve Schechter, 2001). Sırasıyla α ve β globin zincirinin hatalı sentezlenmesi sonucu oluşan alfa ve beta talasemi insanlarda en sık görülen talasemi tipleri olarak kabul edilmektedir. (Weatherall, 2011; Olivieri, 1999). En sık görülen talasemi türü olan beta talasemi, Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz ülkeleri, Ortadoğu, Orta Asya, Hindistan, Çin'in güney bölgesi ve Uzak Doğu ülkelerinin yanı sıra Afrika'nın kuzey kıyıları ve Güney Amerika'da yaygınlık göstermektedir (Galanello ve Origa, 2010).

Klinik ve hematolojik şiddetine göre beta talasemi majör, beta talasemi intermedia ve beta talasemi taşıyıcılığı (beta talasemi minör) olmak üzere 3 farklı tipte beta talasemi tanımlanmıştır (Cao ve Galanello, 2010). Şiddetli beta globin zinciri mutasyonları olan beta talasemi majörde (Muncie ve Campbell, 2009), sağ kalım için düzenli kan transfüzyonu gereksinimi vardır (R. Jha ve S. Jha, 2014). Beta zinciri sentezinde hafif-orta derecede azalma görülen beta talasemi intermediada hafif anemi görülmekle birlikte kan transfüzyonu yalnızca ihtiyaç duyulduğu hallerde gerekmektedir ya da hiç gerekmemektedir (Muncie ve Campbell, 2009; R. Jha ve S. Jha, 2014). Beta talaseminin en hafif klinik formu olan ve semptomsuz olduğu bilinen beta talasemi minör (BT minör) ise mikrositoz, eritrositoz, hipokromi ve artmış HbA2 seviyesi ile karakterize olup herhangi bir tedavi gerektirmemektedir (R. Jha ve S. Jha, 2014; THD, 2011: 81-97). Dünya nüfusunun %1,7'si alfa ya da beta talasemi taşıyıcısıdır (Muncie ve Campbell, 2009). Yapılan çalışmalara göre, araştırmamıza da konu olan, beta talasemi taşıyıcılığı sıklığı ülkemizde ortalama %4,3 olup en sık Çukurova, Akdeniz kıyı şeridi, Ege ve Marmara bölgelerinde görülmektedir (Canatan, 2014).

Birçok kronik hastalıkta olduğu gibi talaseminin patogenezinde de DNA hasarı ve genotoksisiteye yol açan oksidatif stresin rolünden söz edilmektedir (Halliwell, 1991;

Fibach ve Rachmilewitz, 2008). Globin zincirlerinin yapımındaki dengesizlikler sonucunda eritrosit transfüzyonlarına bağlı demir yüklemesi ile serbest radikal ve lipid peroksidasyon oluşumuyla oksidatif stresin ortaya çıktığı öne sürülmektedir (Dhawan, Kumar, Marwaha ve Ganguly, 2005). Ek olarak, globin zincirlerinin otooksidasyonu, non-hemoglobin demiri ve hücre içinde yetişkin hemoglobininin (HbA) düşük düzeyde oluşu da oksidatif hasarı artıran faktörler arasında sayılmaktadır (Waseem, Khemomal ve Raihan, 2011).

Talasemide oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı çalışması gereken antioksidan savunma mekanizmalarında da yetersizlik olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda, talasemili bireylerin vitamin E, vitamin C, vitamin A ve çinko düzeylerinde belirgin bir eksiklik olduğu gösterilmiştir (Dhawan ve diğerleri 2005; Ghone, Kumbar, Suryakar, Katkam ve diğerleri, 2008; Kassab-Chekir ve diğerleri, 2003).

Beta talaseminin en ağır formu olan beta talasemi majör ile mekanizmasında oksidatif stresin rol oynadığı düşünülen genotoksisite riski ile ilgili bulgulara rastlanmaktadır (Cote ve Papadakou-Lagoyanni, 1979; Cote ve diğerleri, 1982; Silva, Manzato ve Varella-Garcia, 1992; Offer ve diğerleri, 2005; Al-Sweedan, Khabour ve Isam, 2012; Ferro ve diğerleri, 2012). Ancak talaseminin en hafif klinik formu olan ve semptomsuz olduğu bilinen talasemi minörlü bireylerde bu bulguyu destekleyecek yeterli çalışma bulunmamaktadır. Genotoksisiteye yönelik sadece üç araştırma ile karşılaşılmıştır (Cote ve Papadakou-Lagoyanni, 1979; Silva, Manzato ve Varella-Garcia, 1992; Al-Sweedan, Khabour ve Isam, 2012). BT minör olan bireylerin ele alındığı bu çalışmalarda, popülasyon seçimi ile ilgili sınırlılıklar görülmektedir. Örneğin, üç çalışmanın toplamında ele alınan BT minör bireylerin sayısı 15'dir. Yaş aralıkları homojen değildir, aynı çalışma içinde yetişkinlerin de çocukların da bir arada incelendiği göze çarpmaktadır. Dolayısıyla, sınırlı sayı ve koşullardaki bu çalışmalar ile BT minör bireylerdeki olası genotoksisite riskine ilişkin sonuca ulaşmak mümkün görünmemektedir.

Ülkemizde çok sayıda BT minör bireyin olduğu düşünüldüğünde, dünya literatürüne konu ile ilgili katkı verebilecek doğru tasarlanmış bir çalışmanın önemi kuşkusuzdur. Amacımız, BT minör tanısı konulmuş çocuklar ile mümkün olduğunca onlarla aynı sosyoekonomik çevreyi paylaşan sağlıklı kardeşlerinde ya da benzer sosyoekonomik ve demografik koşulları olduğu belirlenen sağlıklı çocuklarda genotoksisite riskini sitokinezin

durdurulduğu mikroçekirdek yöntemi (SD-MÇ) ile araştırmaktır. Yöntemde incelenen parametrelerin çeşitliliği 'sitom' yöntemi olarak da adlandırılmasına neden olmaktadır (Fenech ve Thomas, 2011).

Çalışma dünya literatüründe de, BT minör olan çocuklarda sitogenetik etkileri aydınlatmaya katkı sağlamak yönünde bir ilk olarak klinikte yeni düzenlemeler ve bireylerin gelecekteki yaşamları için koruyucu önlemler önerilebilmesi amacıyla yararlı olacaktır.





2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalıtsal Hemoglobin Hastalıkları

Kalıtsal hemoglobin bozuklukları tek gen hasarına atfedilebilen yaygın, hematolojik bir hastalıktır. En sık tropikal bölgelerde görülmelerine rağmen, göçler nedeniyle artık pek çok ülkede bu bozukluklar ile karşılaşılmaktadır (Weatherall, Akinyanju, Fucharoen, Olivieri ve Musgrove, 2006: 663-680).

229 ülkenin %71'inde önemli bir sağlık sorunu olarak görülmesiyle birlikte, kalıtsal hemoglobin bozuklukları görülen bu ülkelerdeki doğumlar ise tüm dünyadaki doğumların %89'unu içermektedir (Modell ve Darlison, 2008).

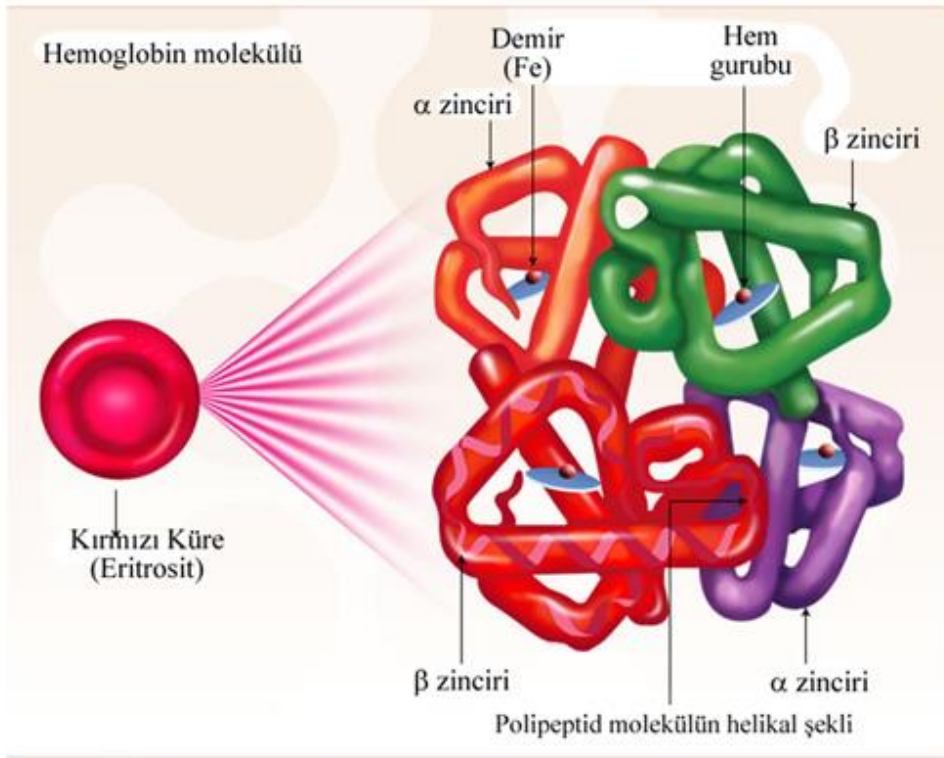
Her yıl tahmini 300 000 bebek ciddi kalıtsal hemoglobin bozukluğu ile doğmaktadır ve bu doğumların %80'i düşük veya orta gelirli ülkelerde meydana gelmektedir (Weatherall, 2011). Eğer tedavi edilmezse, bu hastalıkların birçoğu yaşamın ilk birkaç yılı içerisinde ölümlü sonuçlanabilmektedir (Weatherall ve diğerleri, 2006).

Hemoglobin molekülünün polipeptid zincirindeki yapısal değişikliklerden veya polipeptid zincirinin sentezindeki bozukluklardan kaynaklanan kalıtsal hemoglobin bozuklukları (hemoglobinopatiler), yapısal hemoglobin varyantları ve talasemiler olarak iki ana gruba ayrılırlar (Weatherall ve diğerleri, 2006).

2.1.1. Hemoglobin ve globin zincirinin yapısı

2.1.1.1. Hemoglobin yapısı

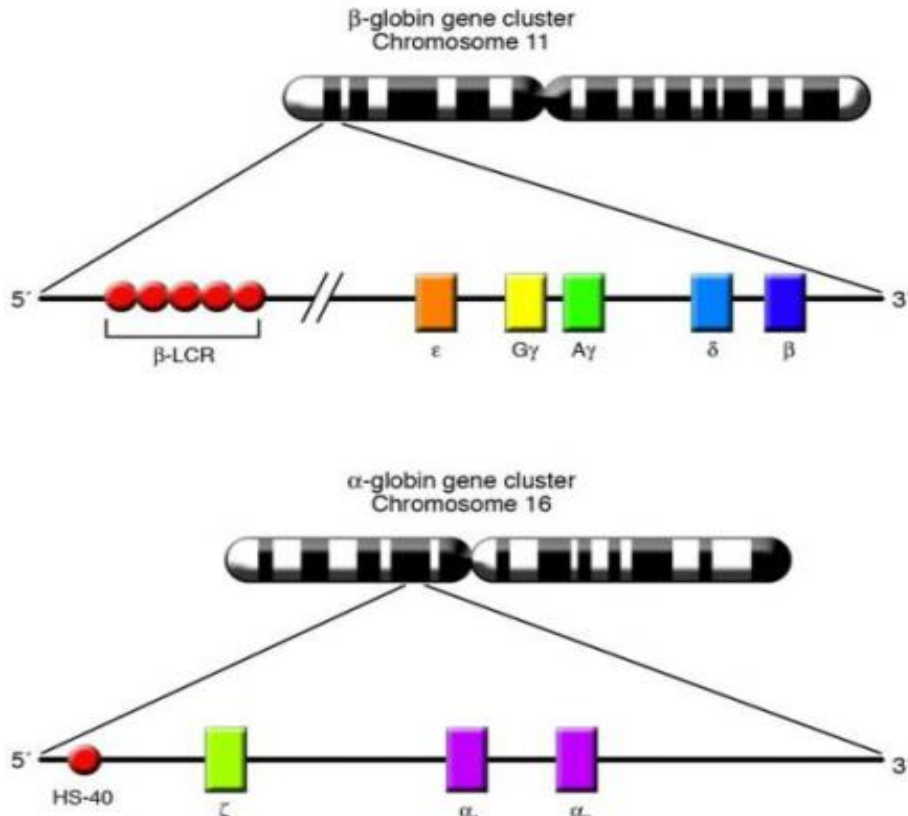
Hemoglobin dört altüniteden oluşan ve dokulara oksijen taşınmasında rol alan globüler bir proteindir. Her altünite +2 değerlikli demir içeren bir "hem" prostetik grubu ve bu gruba bağlanmış globin adı verilen bir polipeptid zincirinden oluşmaktadır (Marengo-Rowe, 2006: 239-245) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Hemoglobin molekülünün yapısı (Menderes, 2016)

2.1.1.2. Globin yapısı

Globin kısmı birbirine bağlı iki alfa ve iki alfa olmayan polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Alfa, beta, gamma, delta, epsilon, zeta olmak üzere 6 farklı çeşit polipeptid zinciri bulunmaktadır. Alfa ve zeta globin zincirlerinin sentezi 16. kromozomda, beta, gamma, delta ve epsilon globin zincirlerinin sentezi ise 11. kromozomda yer alan genler tarafından kontrol edilmektedir (Şekil 2.2). Globin zincirlerinin bileşimi hemoglobin tipini belirlemektedir ve zincirin sentezlenmesinden hangi gen sorumlu ise zincir o genin adı ile adlandırılmaktadır. Erişkin hemoglobininin yaklaşık %96'sını oluşturan HbA iki alfa iki beta ($\alpha_2\beta_2$) zincirinden, minör erişkin hemoglobini olan HbA2 iki alfa iki delta ($\alpha_2\delta_2$) zincirinden, fetal hemoglobin olan HbF ise iki alfa iki gamma ($\alpha_2\gamma_2$) zincirinden oluşmaktadır (Herbert, Muncie ve Campbell, 2009). Burada en sık görülen başlıca Hb varyantlarından bahsedilmiştir. Bunların dışında çok sayıda Hb varyantından bahsetmek mümkündür.



Şekil 2.2. Globin genlerinin kromozomal organizasyonu
(www.jci.org/cgi/content/full/117/4/850/F2 erişim tarihi: 24.05.2016)

2.2. Talasemi

2.2.1. Talaseminin tanımı

Talasemi, bir ya da daha fazla globin zincirinin yetersiz yapılması ya da yapılamaması ile karakterize, otozomal resesif geçişli, kalıtsal hemoglobin bozukluğudur (Tuzmen ve Schechter, 2001; Perisano ve diğerleri, 2012). Talasemi, ilk kez 1925 yılında Thomas Cooley ve Pearl Lee isimli pediyatristler tarafından, İtalyan kökenli dört çocukta, splenomegali ve karakteristik kemik değişiklikleri ile ilişkilendirilmiş şiddetli bir anemi şekli olarak tanımlanmış ve bu hastalık uzun yıllar Cooley Anemisi adıyla anılmıştır (Cooley ve Lee, 1925). 1936 yılında ise Whipple ve Bradford inceledikleri vakaların Akdeniz civarı ülkelerden gelmesi dolayısıyla bu hastalığa, Yunanca deniz anlamına gelen *-thalasso-* ve kan anlamına gelen *-hemia-* kelimelerinden türetilen talasemi adını vermişlerdir. Bu nedenle talasemi, deniz anemisi olarak da anılmıştır (Whipple ve Bradford, 1936).

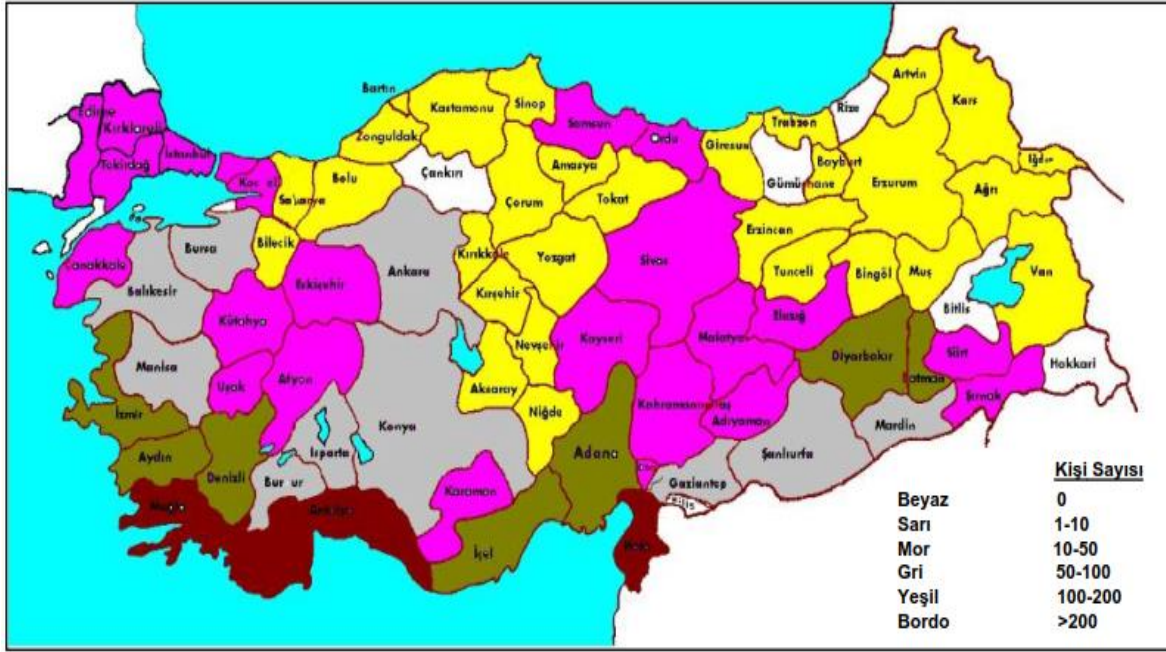
2.2.2. Talaseminin epidemiyolojisi

Talasemiler, dünya genelinde en yaygın görülen ve önemli bir halk sağlığı sorununa neden olan tek gen hastalıklarıdır (Tuzmen ve Schechter, 2001). Dünya nüfusunun yaklaşık %5'i globin varyantına sahip olmakla birlikte bunların %1,7'si alfa ya da beta talasemi taşıyıcısıdır. Talasemi, kadın ve erkekleri eşit oranda etkilemektedir ve her 10 000 canlı doğumun yaklaşık 4,4'ünde oluşmaktadır. Alfa talasemi en sık Afrika ve Güneydoğu Asya toplumlarında görülmektedir (Herbert ve diğerleri, 2009). En sık görülen talasemi türü olan beta talasemi ise Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz ülkeleri, Ortadoğu, Orta Asya, Hindistan, Çin'in güney bölgesi ve Uzak Doğu ülkelerinin yanı sıra Afrika'nın kuzey kıyıları ve Güney Amerika'da yaygınlık göstermektedir. En yüksek beta talasemi taşıyıcı sıklığı %14 oranı ile Kıbrıs'ta, %10,3 oranı ile Sardunya'da ve Güneydoğu Asya'da raporlanmıştır (Galanello ve Origa, 2010).

Türkiye'de talasemi taşıyıcılığı sıklığı ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. 1971 yılında Çavdar ve Arcasoy tarafından yapılan bir çalışmada Türk toplumundaki beta talasemi taşıyıcılığı sıklığının %2.1 olduğu bildirilmiştir (Çavdar ve Arcasoy, 1971). 1995-2000 yılları arasında ise Sağlık Bakanlığı ve Türk Ulusal Hemoglobinopati Konseyi tarafından yürütülen ortak bir çalışmada Akdeniz, Ege ve Marmara bölgelerinin 16 farklı şehrinde yapılan tarama sonuçları toplanmıştır. Yapılan bu çalışmada, toplamda 380 000 sağlıklı birey taranmış olup beta talasemi taşıyıcılığı sıklığı ortalama %4,3 olarak bulunmuştur (Canatan, Kose, Ustundag, Haznedaroglu ve Özbaş, 2006). En yüksek beta talasemi taşıyıcılığı sıklığı ise %13,1 oranı ile Antalya bölgesinde saptanmıştır (Canatan, Kose, Ustundag, Haznedaroglu ve Özbaş, 2006). Türkiye'de yaklaşık 1 500 000 beta talasemi taşıyıcısı ve 5 500 civarında beta talasemi hastası bulunmaktadır. Özellikle Çukurova, Akdeniz kıyı şeridi, Ege ve Marmara bölgelerinde talasemi taşıyıcılığı çok sık görülmektedir (Canatan, 2014). Türkiye'de beta talasemili bireylerin dağılımı Şekil 2.3'te gösterilmiştir.

2000 yılından bu yana Türkiye'de talaseminin önlenmesi ve farkındalığın artırılması amacıyla Sağlık Bakanlığı, Türk Ulusal Hemoglobinopati Konseyi ve Türkiye Talasemi Federasyonu tarafından yazılı düzenlemeler, eğitim ve önleme kampanyaları gibi adımlar atılmıştır. Bu kapsamda, 2003 yılında Sağlık Bakanlığı'nın belirlediği, Trakya, Marmara, Akdeniz, Ege ve Güneydoğu bölgelerinde bulunan ve talasemi taşıyıcılığı sıklığı yüksek

olan 33 ilde Ulusal Hemoglobinopati Önleme Programı başlatılmıştır (Canatan ve diğerleri, 2006). Tüm bu eğitim ve önleme çalışmalarının bir sonucu olarak, talasemi ve diğer hemoglobinopatilerden etkilenen yenidoğanlarda %90'lık bir azalma olduğu görülmüştür (Canatan, 2014).



Şekil 2.3. Türkiye’de beta talasemili bireylerin dağılımı (Canatan ve Aydınok, 2007)

2.2.3. Talasemi tipleri

Talasemiler sentezi bozulmuş olan globin zincirine göre α , β , γ , δ , $\delta\beta$, $\gamma\delta\beta$ ve $\epsilon\gamma\delta\beta$ talasemi olarak sınıflandırılırlar (Tuzmen ve Schechter, 2001). Bu bozukluğun en önemli iki formu, sırasıyla α ve β globin zincirinin hatalı sentezlenmesi sonucu oluşan alfa ve beta talasemiler insanlarda en sık görülen talasemi tipleri olarak kabul edilmiştir (Weatherall, 2011; Olivieri, 1999).

2.2.3.1. Alfa talasemi

Alfa talasemi, alfa globin zincirlerinin eksik sentezlenmesi ya da hiç sentezlenmemesi sonucu oluşmaktadır. Bu durum, beta zincirlerinin fazla miktarda birikmesine neden olmaktadır (Piel ve Weatherall, 2014). Beta talasemi klinik olarak daha yaygın görülse de alfa talasemi de tropik iklim kuşağındaki birçok toplumu etkilemesi bakımından önemlidir.

Daha sık Asya'da görülmekte olan alfa talaseminin dünya genelinde görülme sıklığı %5 olarak saptanmıştır (Türk Hematoloji Derneği [THD], 2014: 117-133).

2.2.3.1.1. Fizyopatoloji

Alfa zincirlerinin eksik sentezlenmesinin nedeni 16. kromozomda bulunan bir ya da daha fazla gendeki delesyondur. Homolog kromozomların her birinde ikişer tane olmak üzere toplam dört tane alfa globin geni vardır ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$). Aynı kromozom üzerindeki alfa genlerine 5'-3' doğrultusunda, $\alpha 2$ ve $\alpha 1$ isimleri verilir. Bu genler yapısal olarak birbirinin kopyasıdır (duplikasyon). Bu genler üzerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu alfa globin zincirinin sentezi azalmakta veya tamamen yok olmaktadır. Bugüne kadar 500'den fazla α globin geni mutasyonu bildirilmiştir. Bu mutasyonlar 3 ana grupta toplanır (THD, 2014: 117-133);

1. Delesyonlar: Alfa talasemide en sık rastlanılan hastalık sebebidir. Delesyonların genişliği önemlidir ve klinik fenotipi etkilemektedir.
2. Nokta mutasyonları: Beta talasemide siktir, alfa talasemide nadirdir.
3. Düzenleyici elementlerde nadir delesyonlar

2.2.3.1.2. Alfa talasemi tipleri ve teşhisi

Her bir haploid gen üzerinde 2 alfa globin gen kopyası vardır (alfa1 ve alfa2). Alfa 2 geni alfa 1 geninden 2-3 kat fazla alfa globin zinciri oluşturur. Alfa talasemi sendromlarında etkilenen alfa globin genine ve miktarına göre alfa zincir yapımı azalır ve bu azalmanın miktarına göre de klinik tablo değişir (THD, 2014: 117-133). Tek bir genin delesyonu sonucunda, normal hematolojik bulgular ile asemptomatik olarak seyreden sessiz alfa talasemi taşıyıcılığı oluşmaktadır. İki gen delesyonu genellikle anemi görülmeyen ve mikrositoz ile seyreden alfa talasemi taşıyıcılığı (minör) ile sonuçlanmaktadır. Üç gen delesyonu, dört beta zinciri (beta4) içeren belirgin bir Hemoglobin H (HbH) üretimine neden olmaktadır. Mikrositik anemi, hemoliz ve splenomegali ile seyreden bu bozukluk alfa talasemi intermedia ya da HbH hastalığı olarak adlandırılır. Dört gen delesyonu ise dört gamma zinciri (gamma4) içeren belirgin bir Hemoglobin Bart's üretimine neden olmaktadır. Alfa talasemi majör ya da Hb Bart's hastalığı olarak adlandırılan bu bozukluk ise genellikle hidrops fetalis ile sonuçlanmaktadır (Herbert ve diğerleri, 2009).

Alfa talasemi taşıyıcılığı klinik ve hematolojik olarak normal olduklarından moleküler çalışma olmaksızın tanınmazlar. Demir eksikliği tanısı; serum demiri, demir bağlama kapasitesi ve ferritin değerlerine bakılarak saptanmaktadır. Demir eksikliği anemisi, kronik hastalıktan kaynaklanan anemi ve beta talasemi taşıyıcılığı dışlanmışsa Hb elektroforezi ve kapiler elektroforez gibi moleküler testler kullanılarak alfa talaseminin ayırıcı tanısı yapılabilmektedir. Ayrıca strip testi veya GAP-PCR ile genetik analiz yapılarak da teşhis konulmaktadır (THD, 2014: 117-133).

2.2.3.2. Beta talasemi

Beta talasemi, beta globin zincirlerinin eksik sentezlenmesi ya da hiç sentezlenmemesi sonucu oluşmaktadır. Bu durum alfa zincirlerinin fazla miktarda birikmesine neden olmaktadır (Herbert ve diğerleri, 2009).

2.2.3.2.1. Fiziopatoloji

Beta globin zincirinin sentezi 11. kromozomda bulunan genlerin kontrolündedir (Herbert ve diğerleri, 2009). Günümüze dek, bu genlerde beta talasemiye neden olan 200'den fazla mutasyon tanımlanmıştır. Bu mutasyonların büyük bir çoğunluğu nokta mutasyonu olup delesyonlar veya nükleotit ilavesi şeklinde de görülebilmektedir (Tuzmen ve Schechter, 2001). Bu mutasyonlar sonucunda beta globin zincirinin eksik sentezlenmesi (ortalama % 10 civarı) β^+ talasemi, beta globin zinciri hiç sentezlenmemesi β^0 talasemi, beta globin zincirinin az-orta seviyeli eksik sentezi ise β^{++} talasemi olarak adlandırılmaktadır (Cappellini ve diğerleri, 2008: 14-27).

2.2.3.2.2. Beta talasemi tipleri ve teşhisi

Klinik ve hematolojik şiddetine göre beta talasemi majör, beta talasemi intermedia ve beta talasemi taşıyıcılığı (beta talasemi minör) olmak üzere 3 farklı tipte beta talasemi tanımlanmıştır (Cao ve Galanello, 2010).

2.2.3.2.2.1. Beta talasemi majör

Cooley anemisi olarak da bilinen beta talasemi majör, şiddetli beta globin zinciri mutasyonları bakımından homozigot ya da birleşik heterozigot (örneğin, şiddetli β^{+}/β^{+} mutasyonları, β^{+}/β^0 , β^0/β^0) olan hastalarda oluşmaktadır. Bu mutasyonlar beta globin zincirinin sentezlenmesinden sorumlu olan her iki geni de etkilemektedir. Beta talasemi majörde beta zinciri sentezi ciddi olarak azalmıştır veya sentez tamamen durmuştur (Herbert ve diğerleri, 2009; R. Jha ve S. Jha, 2014). Talasemi majörden etkilenen yenidoğanlarda gelişme geriliği ile birlikte beslenme bozuklukları, diyare, iritabilite, tekrarlayan ateş nöbetleri, splenomegaliye bağlı abdomen genişlemesi gibi şiddetli klinik fenotip görülmektedir. Bu hastalarda yaşamın ilk iki yılında tıbbi gözetim ve sağ kalım için düzenli kan transfüzyonu gerekmektedir. Daha sonraki evrelerde transfüzyon ihtiyacı ortadan kalkabilir ve tanı değiştirilerek bu hastalara beta talasemi intermedia teşhisi konulabilmektedir (R. Jha ve S. Jha, 2014).

2.2.3.2.2.2. Beta talasemi intermedia

Beta talasemi intermedia, beta zinciri sentezinin devam ettiği heterojen genetik mutasyonlar (örneğin, β^{+}/β^0 , β^{+}/β^{+}) sonucu oluşmaktadır. Bu mutasyonlar, beta talasemi majörde olduğu gibi beta globin zincirinin sentezlenmesinden sorumlu olan her iki geni de etkilemektedir. Beta talasemi intermediada beta zinciri sentezinde hafif-orta derecede azalma görülmektedir. Hastalarda görülen semptomlar beta talasemi majöre kıyasla daha az şiddetlidir. Hafif anemi görülmekle birlikte kan transfüzyonu yalnızca ihtiyaç duyulduğu hallerde gerekmektedir ya da hiç gerekmemektedir (Herbert ve diğerleri, 2009; R. Jha ve S. Jha, 2014).

Beta talasemi intermedia hastası olan bireylerde orta dereceli anemi bulgusuna rastlanmaktadır. Kan transfüzyon ihtiyacı genellikle bulunmaz ya da ihtiyaca göre transfüzyon uygulanır. Klinik bulguların en şiddetli olduğu yaşlar 2 ila 6 yaş arasındadır. Bu sürede düzenli kan transfüzyonuna ihtiyaç duyulmayabilir ancak büyüme ve gelişme geç olur. Genel semptomlar arasında solgunluk, sarılık, kolelitiazis, karaciğer ve dalak büyümesi, orta-şiddetli iskelet değişiklikleri, bacak ülseri, ekstremiteler hiperplastik eritroid ilik büyümesi, osteopeni ve osteoporoza yatkınlık ve trombotik komplikasyonlar sayılabilir (R. Jha ve S. Jha, 2014).

2.2.3.2.2.3 Beta talasemi minör

Beta talasemi minör bir normal beta gen kopyasının bulunduğu (örneğin, β/β^0 , β/β^+), orta dereceli klinik fenotipin görüldüğü durumdur. Klinik olarak genellikle asemptomatiktir. Mikrositoz, hipokromi ve artmış HbA2 seviyesi karakterisitik hematolojik bulgulardır (R. Jha ve S. Jha, 2014).

Beta talasemi taşıyıcılığı tanısı için demir eksikliği anemisi, alfa talasemi taşıyıcılığı ve kronik hastalık anemisi hastalıklarından ayırıcı tanısının yapılması gerekmektedir. Eritrositozun olması (eritrosit sayısı (RBC, Red Blood Cell) >5 milyon/ mm^3), eritrosit dağılım genişliği (RDW, Red Cell Distribution Widht)'nin normal saptanması ayırıcı tanıda önemlidir (THD, 2011: 81-97). Ortalama eritrosit hacmi (MCV, Mean Corpuscular Volume) ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC, Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) düşüktür. Hemoglobin elektroforezinde HbA2, HbF veya her ikisi birden artmıştır. HbA2 $> 3,5$ 'dir; HbF ise %50 olguda yüksek bulunur. Hafif anemi (Hb: 9-11 g/dl) görülür. Kemik iliğinde hafif-orta derecede eritroid hiperplazi mevcuttur (Cao ve Galanello, 2010; Menderes, 2016). Herhangi bir tedaviye gerek yoktur. Ancak mutlaka genetik danışmanlık verilmeli; hastanın anne, baba ve kardeşleri taşıyıcılık yönünden taranmalıdır. (THD, 2011: 81-97).

2.3. Oksidatif Stres, Talasemi ve Genotoksisitedeki Yerleri

2.3.1. Oksidatif stres

Serbest radikal, atomik ya da moleküler yapılarda çiftlenmemiş tek elektron bölümlerine verilen isimdir. Başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere "oksidan moleküller" ya da "reaktif oksijen türleri (ROT)" de denmektedir (Halliwell, 1991). Enzimatik reaksiyonlar, mikrozomal hidroksilasyon, mitokondriyal elektron taşıma zinciri, otooksidasyon reaksiyonları, fagositoz gibi endojen reaksiyonlar ve ağır egzersiz, aşırı alkol kullanımı, aşırı beslenme, hava kirliliği, radyasyon, pestisitler, sigara dumanı, UV ışını, radyoaktif ışın gibi eksojen reaksiyonlar sonucunda organizmada çok miktarda serbest radikal oluşmaktadır (Valko ve diğerleri, 2007).

Serbest radikaller çeşitli makromoleküllere de saldırıda bulunarak birçok hastalığın patolojisinde rol oynamaktadır. Aerobik organizmalarda serbest radikal oluşumunu kontrol altında tutmak ve bu moleküllerin zararlı etkilerine engel olmak üzere antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Antioksidan savunma yetersiz olduğunda oksidatif stres olarak adlandırılan durum ortaya çıkmaktadır. Oksidatif streste in vivo üretilen reaktif oksijen türleri özellikle lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve DNA gibi hücre bileşenlerinde hasara neden olmaktadır (Halliwell, 1991). Serbest radikallere örnek olarak süperoksit radikal (O_2^-), hidroksil radikal (OH^\cdot), alkoksil radikal (RO^\cdot), peroksil radikal (RO_2^\cdot), karbonat radikali (HCO_3^-), sülfür radikali (RS^\cdot) ve nitrik oksit (NO^\cdot) radikalleri verilebilir (Halliwell ve Gutteridge, 2015).

Oksidatif stresin, serbest oksijen radikallerinin neden olduğu hücre hasarıyla birçok kronik hastalığın komplikasyonlarına da katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Aterogenez, amfizem/bronşit, Parkinson hastalığı, Duchenne tipi musküler distrofi, gebelik preeklampsis, serviks kanseri, alkolik karaciğer hastalığı, hemodiyaliz hastaları, diyabet, akut renal yetmezlik, Down sendromu, Alzheimer, yaşlanma, retrolental fibroplazi, serebrovasküler bozukluklar, iskemi/reperfüzyon injürisi gibi durumların patogeneğinde oksidatif stresin rolünden söz edilmektedir (Lieberman ve Marks, 2009: 439-457).

Oksidatif stresin hemolitik anemi, hemoglobinopatiler (orak hücreli anemi ve talasemi), herediter sferositoz ve konjenital diseritropoetik anemi gibi hastalıklarda etkili olduğu bulunmuştur. Oksidatif stres bu hastalıkların primer etiyolojisi değildir, ancak dolaşımdaki eritrositlerin yaşam sürelerini kısaltmasına ve kemik iliğindeki eritropoezin bozulmasına neden olan oksidatif hasar, eritroid hücrelerdeki hemolizin oluşmasında kritik rol oynamaktadır (Fibach ve Rachmilewitz, 2008).

2.3.2. Oksidatif Stresin Talasemi ile İlişkisi

Talasemililerde, eritrosit hemolizinin etyopatogeneziindeki en önemli faktör oksidatif strese artmış duyarlılıktır. Globin zincirlerinin yapımındaki dengesizlikler sonucunda oluşan serbest radikaller, eritrosit transfüzyonlarına bağlı demir yüklemesi ve lipid peroksidasyonu nedeniyle oksidatif stres oluşmaktadır. Ek olarak, globin zincirlerinin otooksidasyonu, non-hemoglobin demiri ve hücre içinde yetişkin hemoglobininin (HbA)

düşük düzeyde oluşu da oksidatif hasarı artıran faktörlerdendir (Dhawan, Kumar, Marwaha ve Ganguly, 2005; Waseem, Khemomal ve Sajid, 2011).

Beta talasemide artmış alfa globin zinciri nedeniyle şiddetli oksidatif hasar gözlenmektedir. Eşleşmemiş alfa globin zincirlerinin doğrudan ilişkisi ve yarattığı oksidatif hasar nedeniyle eritrosit membranının yapısında değişiklik olmaktadır. Özellikle, serbest, instabil alfa globin altüniteleri serbest radikallerin oluşmasına neden olmakta ve bunlar da oksidatif olaylar zincirini başlatmaktadır. Oluşan radikaller membran iskeletinde bozulma ile deformabilitede azalma, rijiditede artma, membran lipidlerinde peroksidasyon, antijenik değişme ile eritrositlerde erken yaşlanma, katyon değişiminde bozulma ile hücre içi K^+ kaybı gibi olaylara neden olmaktadır (Comporti, Signorini, Buonocore ve Ciccoli, 2001; Voskou, Aslan, Fanis, Phylactides ve Kleanthous, 2015).

Beta talasemide oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı çalışması gereken antioksidan savunma mekanizmalarında da yetersizlik bulunmaktadır. Özellikle Vitamin A, Vitamin C (Dhawan ve diğerleri 2005; Dissayabutra, Tosukhowong ve Seksan, 2005), Vitamin E ve çinko (Kassab-Chekir ve diğerleri, 2003) düzeylerinde belirgin bir azalma saptanmıştır (Ghone, Kumbar, Suryakar, Katkam ve Joshi, 2008; Livrea ve diğerleri 1996). Ayrıca, beta talasemililerde folat eksikliği de saptanmış olup buna bağlı olarak DNA onarım mekanizmalarının bozulduğu bildirilmiştir (Castaldi ve diğerleri 1983).

2.3.3. Genotoksisite

Genetik bilginin nesilden nesile sağlıklı bir şekilde aktarılabilmesi için DNA yapısının korunması son derece önemlidir. DNA'nın fonksiyonu bazlar üzerindeki polar gruplara bağlıdır. Bu gruplar arasında spesifik olarak oluşan hidrojen bağları çift sarmal DNA'yı oluştururlar. DNA bazlarının polar gruplarında oluşan kimyasal değişiklikler replikasyon sırasında yanlış eşleşmeye, replikasyonun bloke olmasına, mutasyonlara ve hücre ölümüne neden olmaktadır (Elmore, 2007; Lindahl, 1990). DNA hasarı düşük seviyede ise DNA onarım mekanizmaları tarafından verimli bir şekilde onarılır. Ağır hasarlar apoptotik mekanizmaları uyararak hücre ölümüne sebep olmakta, orta dereceli hasarlar ise çoğunlukla mutasyonla sonuçlanmaktadır (Roos ve Kaina, 2006). Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde ekzojen (aflotoksin, benzopiren, kemoterapi ilaçları, hardal gazları vb. gibi kimyasal ajanlar veya UV, iyonize radyasyon gibi fiziksel ajanlar) veya

endojen (replikasyon hataları, yanlış eşleşmeler, baz kayıpları, deaminasyon, metilasyon gibi kimyasal değişiklikler ve oksidatif hasar) faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler 'DNA hasarı' olarak adlandırılmaktadır (Onur, Tuğrul ve Bozyiğit, 2009; Collins, Dusinska, Gedik ve Stetina, 1996).

Genotoksisite ya da genetik toksisite; çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen DNA kırıkları, DNA eklentileri, gen mutasyonları, kromozom anormallikleri, klastojenite ve anöploidi gibi hasarları kapsayan bir terimdir. DNA veya genomun kopyasının çıkarılmasını sağlayan enzimlerle etkileşime giren ve mutasyona neden olan genotoksik maddelerin DNA'da hasar meydana getirmesi veya bazı değişimlere yol açması genotoksik etki olarak tanımlanmaktadır (Şekeroğlu ve Atlı Şekeroğlu, 2011; Choy, 2001).

2.3.3.1. Genotoksisite testleri ve kullanım alanları

Genetik hasarın tespit edilmesi için kullanılan genetik toksisite ya da genotoksisite testleri 1970'li yıllarda tasarlanmış olup günümüzde de mutajenik ve genotoksik maddelerin karsinojenik potansiyellerini ölçebilmek için kullanılmaya devam etmektedir (Jena, Kaul ve Ramarao, 2002). Genotoksisite testlerinden, popülasyonların hastalık ve çevresel maruziyetler açısından izlenmesi, mesleki maruziyetlerin etkilerinin belirlenmesi, mesleki ve çevresel kimyasallar (Dusinska ve Collins, 2008) açısından moleküler epidemiyoloji araştırmaları kapsamındaki risk değerlendirmesinde tehlikenin tanımlanması, kimyasalların toksisite profillerinin belirlenmesi, genomu etkileyebilecek UV ve irradyasyon gibi fiziksel etkenlerin, parazit enfeksiyonlarının, sigara, pestisitler (Bolognesi, 2003), ilaçlar, gıda katkı maddeleri (Brendler-Schwaab, 2005). ve nanomateryaller (Gonzalez, 2008) gibi kimyasal ajanların genotoksik ve karsinojenik etkilerinin altında yatan moleküler mekanizmaların ortaya çıkarılması gibi araştırmalarda yararlanılmaktadır.

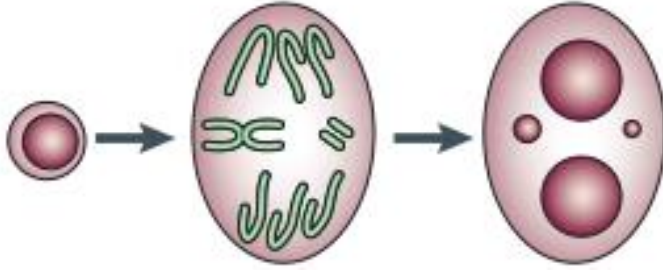
Kimyasal maddelerin mutajenik etkileri ile karsinojenik potansiyelleri arasında kuvvetli bir ilişkinin olduğunun gösterilmesi ile genotoksisite testlerinin endüstri kuruluşları tarafından kimyasal maddelerin karsinojenik risklerinin araştırılmasında tarama testleri olarak kullanılması sonucunu doğurmuştur (Fenech, 1993; Mavournin, Blakey, Cimino, Salamone ve Heddle, 1990; Choy, 2001; Jena ve diğerleri, 2002).

Ayrıca, ulusal ve uluslararası kılavuzlar doğrultusunda medikal, kozmetik ve endüstriyel kimyasallara ilişkin yasal düzenlemelerin geliştirilmesinde de genotoksisite testlerinden yararlanılmaktadır. Genotoksisite testlerinin periferik kan hücreleri (lenfositler), eksfoliyeye hücreler (yanak, burun, serviks epiteli gibi) ve hücre kültürü için kullanılan hücre dizileri gibi pek çok hücre tipinde in vitro ve in vivo kullanım olanağı, uygulama, değerlendirme kolaylığı ve en önemlisi kanseri öngörme yeteneği toksisite testleri arasındaki yerini güçlendirmektedir (Cakmak Demircigil ve diğerleri, 2009).

Genotoksik kimyasallara maruz kalmış popülasyonlardaki kromozomal hasarın tespiti için en sık kullanılan genotoksisite yöntemleri mikroçekirdek yöntemi, comet yöntemi, kromozomal aberasyon testi ve kardeş kromatit değişimi testidir (Kassie, 2000; McKelvey-Martin, 1993; Bonassi ve diğerleri, 2006; Singh, 1988; Wilson, 2007). Tezimizde Sitokinezin Durdurulduğu Mikroçekirdek Yöntemi kullanıldığı için kısaca yöntemin tarihçesi ve amacından söz edilmiştir.

2.3.3.1.1. Mikroçekirdek yöntemi

Mikroçekirdek adı verilen küçük çekirdekçik ilk olarak William Howell ve Justin Jolly adlı hematologlar tarafından eritrositlerde tanımlanmış ve bu nedenle hematolojide Howell-Jolly cisimcikleri olarak da anılmıştır (Fenech ve diğerleri, 2011). Mikroçekirdekler (MÇ), hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır (Fenech, 2007). Kromozomların hücre kutuplarına düzgün olarak dağılmasını sağlayan mekanizmalardaki bozukluk, sentromer eksikliği ya da sentromer bozukluğu gibi nedenlerle kromozomların anafazda geri kalmasıyla ortaya çıkan mikroçekirdekler, telofazdaki nükleusların dışında kalan küçük nükleuslar olarak görülmektedir (Şekil 2.4) (Fenech, 2000, 2003).



Şekil 2.4. MÇ oluşumu (Fenech, 2007)

MÇ sayısındaki artış, iyonizan radyasyon ya da kimyasal mutajenler tarafından indüklenen sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Demirel ve Zamani, 2002). Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iç iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MÇ oluşumunu tetiklemektedir (Fenech, 2000).

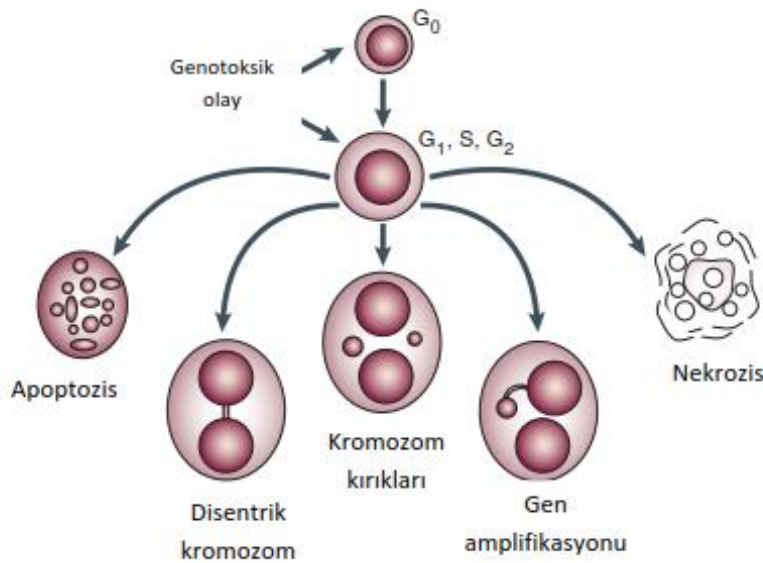
Mikroçekirdek yöntemi, 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde ve daha sonra Haddle ve arkadaşları tarafından kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kimyasalların neden olduğu karsinogenisiteyi belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bazı araştırmacılar geliştirdikleri modifiye metotlarla anöploidiye yol açan ajanlar ile klastojenleri birbirinden ayırmada MÇ farkından yararlanmışlar; klastojenlerce uyarılan MÇ'lerin asentrik kromozomal fragmanlar içeren küçük, anojenlerce uyarılan MÇ'lerin tam kromozomlar içeren daha büyük ebatlı olduğunu göstermişlerdir (Demirel ve Zamani, 2002).

Daha sonra Fenech ve Morley tarafından 1985 yılında küf mantarlarının metabolitlerinden elde edilen sitokalazin-B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanan ve bir hücre siklusunu tamamlayan hücrelerin binükleer görünümüleriyle ayırt edilmesine olanak sağlayan modifiye bir teknik geliştirilmiştir (Fenech ve Morley, 1985, 1986). Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B eklenmesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücrelerde MÇ bulduran hücrelerin oranı tespit edilmektedir. Geliştirilen bu Sitokinezin Durdurulduğu Mikroçekirdek Yöntemi (SD-MÇ) ile bazı kinetik problemler ortadan kalkmış ve tekniğin uygulanmasındaki güvenilirlik artmıştır (Aardema ve Kirsch-Volders, 2001).

Yönteme getirilen yenilik sayesinde SD-MÇ yöntemi, insan ve memeli hücrelerinde DNA hasarı, sitostazi ve sitotoksiteyi ölçmek için moleküler epidemiyoloji ve genetik toksikolojide en sık kullanılan sitogenetik testlerden biri olmuştur (Fenech ve Thomas, 2011).

Mikroçekirdek yöntemi ayrıca, Ekonomik Kalkınma ve İşbirliği Örgütü (OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development) kılavuzlarına dâhil edilmiş ve kimyasalların mutajenik etkilerinin belirlenmesinde kullanılan valide bir test yöntemi haline gelmiştir (OECD Test No: 474, 2014; Test No: 487, 2014).

Periferel kan lenfositlerinde MÇ sıklığının ölçüldüğü SD-MÇ yöntemi, kromozom kırıkları, kromozom kayıpları, DNA yanlış onarımları, nekroz ve apoptozun güvenilir bir şekilde belirlenmesine olanak sağlamaktadır. MÇ yöntemi ile ayrıca, DNA yanlış onarımları veya telomer son füzyonları sonucunda oluşan disentrik kromozomların bir biyogöstergesi olan nükleoplazmik köprülerin (NPK) ve gen amplifikasyonlarının bir biyogöstergesi olan nükleer tomurcukların (NT) değerlendirilmesi de yapılabilmektedir. Bu yöntemde, yalnızca MÇ'lerin sayılması kromozomların yeniden düzenlemelerini göstermesi bakımından yeterli bir ölçüt olmadığından, binükleer hücrelerde bunun bir biyogöstergesi olan NPK'lar da sayılmaktadır (Şekil 2.5) (Fenech, 2006, 2007).



Şekil 2.5. Sitotoksik/genotoksik bir ajana maruziyeti takiben hücrede SD-MÇ yöntemi ile belirlenebilen çeşitli oluşumlar (Fenech, 2007)

MÇ yöntemi kromozomal aberasyon yöntemine kıyasla daha kolay uygulanabilmekte ve çok sayıda hücre sayılabilmektedir. Sayım özellikle bir kez bölünmüş hücreler ile sınırlandırılmıştır. Sayımın binükleer hücreler ile sınırlandırılması, deneydeki majör değişken olan uygunsuz hücre bölünme kinetiğinin sebep olduğu karıştırıcı etkileri önlemektedir (Fenech, 2006). Kromozom hasarları hücre döngüsünün herhangi bir aşamasında oluşabilirken MÇ'ler, hücre bölünmesi sırasında oluşurlar (Fenech, 2003). Tüm bunlara ek olarak, MÇ yönteminin farklı hücre tiplerinde kullanılabilmesi, düşük maliyetli olması ve yöntemde istatistiksel olarak daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi, *in vivo* ve *in vitro* genomik hasar çalışmalarında bu biyogöstergenin benimsenmesine katkıda bulunmuştur (Bonassi ve diğerleri, 2007; Kirsch-Volders, Elhajouji, Cundari ve Van Hummelen, 1997).

2.3.3.1.2. Mikroçekirdek yönteminin biyoizleme çalışmalarındaki kullanım alanları

Çeşitli karsinogenlerin, anöjenlerin, pestisitlerin ve diğer toksik bileşiklerin genotoksik etkilerini saptamak; epitelyal lezyonların benign ya da malign olmalarına göre ayırt edilmesi; tümörlerin derecesinin belirlenmesi; in-situ ya da invazif kanserlerin ayırt edilmesi, servikal, meme, ürotelyal, oral kavite, akciğer, üst sindirim boşluğu ve kolon kanserlerinin taraması ve pre-neoplastik durumların tanımlanması; hastalıkların izlenmesi, terapi protokollerinin değerlendirilmesi, primer ve sekonder hastalık önleme gibi amaçlarla MÇ biyogösterge olarak kullanılmaktadır (Samanta ve Dey, 2012).

Mikroçekirdek indüksiyonu ile kanser gelişimi arasındaki ilişkinin varlığı çok sayıda çalışmayla kanıtlanmış olup MÇ sıklığının kanser riskinin öngörücü bir biyogöstergesi olduğu saptanmıştır. Bundan dolayı, MÇ yönteminin yaygın olarak uygulanması, bu yöntemin kanser gözetim ve önleme programlarının planlanmasında ve doğrulanmasında kullanılması önemli bir fırsat sağlamaktadır (Bonassi ve diğerleri, 2007).

Meme kanseri geni olan BRCA1 ile genotoksisite ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada MÇ yöntemi kullanılmıştır. (Rothfuss ve diğerleri, 2000). Akciğer kanseri hakkında yapılan başka bir çalışmada, SD-MÇ yöntemi kullanılmış, tütün ile genotoksisite ilişkisi araştırılmıştır (Bonassi, El-Zein, Bolognesi ve Fenech, 2011). Kronik böbrek hastalığı olan çocuklarda periferik kan lenfositlerinde SD-MÇ yöntemi kullanılarak tedavinin olası sitogenetik etkileri araştırılmıştır (Cakmak Demircigil ve diğerleri, 2011). Baş ve boyun

kanseri olan hastalarda periferik kan lenfositlerinde ve bukkal epitel hücrelerde genetik hasarın araştırıldığı diğeri bir çalışma da MÇ yönteminin klinikteki kullanımına örnek verilebilir (Burgaz ve diğeri, 2011). Ayrıca, Alzhemier ve Parkinson hastalığı olan bireylerde nörodejenerasyon ile olası genetik hasar periferik kan lenfositlerinde MÇ yöntemi kullanılarak saptanmıştır (Migliore, Coppede, Fenech ve Thomas, 2011).

İnsan lenfositlerinde yapılan çeşitli araştırmalarda ilaç etkileri de incelenmiştir. Örneğin, radyoaktif iyot tedavisinin uzun dönemli takip çalışmasında hastaların lenfositleri MÇ yöntemi kullanılarak değerlendirilmiş, tedavinin etkileri bu yöntemle araştırılmıştır (Livingston ve diğeri, 2016).

Tüm bunların yanı sıra, çevresel etmenlerin ve mesleki maruziyetin sitogenetik etkilerinin araştırılmasında da MÇ yöntemi genotoksisite testi olarak kullanılmaktadır (DeMarini, 2013; Zhang ve diğeri, 2016).

2.3.3.2. Talasemi ve Genotoksisite

Talasemi hastalarında meydana gelen şiddetli anemi, işaretili hemokatez, hepatosplenomegali ve etkisiz eritropoez komplikasyonlarından birisi de hipoksidir (Galanello ve Origa, 2010; Tyan, Radwan, Eid, Haddad, Wehbe ve Taher, 2014). Hipoksi demir homeostazını regüle eden hepsidinin ekspresyonunu azaltır. Hepsidinin diğeri bir etkisi de bağırsaklardan demir emilimini arttırmasıdır (Haidar, Mhaidli ve Taher, 2014; Semenza, 2009).

Talasemi intermedia yol açtığı komplikasyonlar bakımından heterojendir ve genellikle orta düzeyli hastalıkta transfüzyona ihtiyaç olmaz. Ancak talasemi majörlülerin düzenli kan transfüzyonu almaları gerekmektedir. Kan transfüzyonu neticesinde hastalarda transferrine bağlı olmayan demir miktarı artar (Esposito ve diğeri, 2003).

Dokulardaki hipoksi, kan transfüzyonu ve enterik demir absorpsiyonundaki artış sonucunda yükselen demir konsantrasyonu reaktif oksijen türlerinin üretiminde artışa yol açar (Ferro ve diğeri, 2012). Fe^{+2} , Fenton reaksiyonu ile hidroksil radikallerinin üretimini katalizleme yeteneğindedir, bunun sonucunda demir serbest radikal üretimine katkıda bulunmuş olur. Sonuçta oluşan redoks dengesizliği membran fosfolipidlerinin

oksidasyonu, glikozidasyon, apoptoz ve karsinogenezi tetikleyen DNA hasarına neden olur (Gutteridge, Rowley ve Halliwell, 1982).

Talasemili hastalarda genotoksisite biyogöstergesi olan kromozomal aberasyonların ve MÇ sıklıklarının artışı ile ilgili çalışmalar vardır (Cote ve Papadaku-Lagoyanni, 1979; Offer ve diğerleri, 2005; Ferro ve diğerleri, 2012). Vücuttaki yüksek demir miktarının hepatik demir yüklemesine neden olduğu ve bu durumun da reaktif oksijen türlerinin artışına bağlı olarak hepatoselüler karsinom gelişimine neden olabileceği bildirilmiştir (Kew, 2009). Talasemi hastalarında da demir miktarının çeşitli nedenlerle yüksek olmasına bağlı olarak artan vücut demir düzeyleri hepatoselüler karsinom riskinde artışa yol açmaktadır (Borgna-Pignatti ve diğerleri, 2004). Bu nedenle hepatoselüler karsinomun talasemililerde sıkça gözlemlendiği saptanmıştır (Ferro ve diğerleri, 2012).

Cote ve Papadaku-Lagoyanni'nin yaptığı çalışmada (1979), 6 ay-18 yaş aralığındaki 6 talasemi majör, 20-30 yaş aralığındaki 3 talasemi minör ve 6 ay-31 yaş aralığındaki 8 sağlıklı gönüllüden oluşan popülasyonda kromozomal aberasyon (KA) yöntemi ile gönüllülerdeki kromozomal hasar araştırılmıştır. Gönüllüler yaş, kan transfüzyonu, splenektomi ve folik asit alımına göre değerlendirilmiş ve bu koşulların anomali insidansını etkilemediği saptanmıştır. Talasemi majör hastalarda kontrol ve talasemi minör grubuna göre yüksek oranda kromozomal hasar bulunmuştur. Folik asit eksikliğinin DNA kırıklarına doğrudan neden olmadığı, ancak DNA onarım mekanizmalarında yetersizliğe yol açarak kromozomal hasara neden olduğu ileri sürülmüştür (Cote ve Papadaku-Lagoyanni, 1979).

Cote ve diğerleri'nin araştırmasında ise (1982) 10 ay-34 yaş aralığındaki 33 talasemi majör ve 2-48 yaş aralığındaki 17 sağlıklı gönüllü ile yapılan bir çalışmada kardeş kromatid değişimi (SCE) yöntemi ile kromozomal hasar araştırılmış; kan transfüzyonu ve folat alımının hasarı nasıl etkilediği saptanmaya çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre transfüzyonun uygulanmadığı hastalarda SCE oranlarında folat düzeylerinden bağımsız olarak anlamlı olmayan küçük bir artış gözlemlenmiştir (Cote ve diğerleri, 1982).

Talasemi majör hastalarında folat eksikliğinin kardeş kromatid değişimi (SCE) üzerine etkilerini incelemek amacıyla tasarlanan iki basamaklı bir çalışmada ise 2-27 yaş aralığındaki 5 talasemi majör hastası, 16-26 yaş aralığındaki 5 talasemi minör hastası, 18-

28 yaş aralığındaki 5 sağlıklı gönüllü yer almıştır. SCE oranları bakımından değerlendirme yapıldığında, kontrol grubu ve talasemi taşıyıcılarında benzer oranlar görülmüştür. Folat eksikliği olan talasemi majör hastalarında SCE oranları daha yüksek bulunmuştur. Folatın etkisinin incelendiği in vitro çalışmalarda, folat eksikliğinin SCE sıklığında hiç bir grupta değişime neden olmadığı görülmüştür (Silva, Manzato ve Varella-Garcia, 1992).

Genotoksik hasarı tespit etmek için 29 alfa ve beta talasemili birey ve 12 sağlıklı gönüllüde yapılan mikroçekirdek yönteminin kullanıldığı bir çalışmada bireylerin kırmızı kan hücreleri incelenmiştir. Talasemi hastalarındaki mikroçekirdek sıklığında sağlıklı gönüllülere göre anlamlı bir artış saptanmıştır (Offer ve diğerleri, 2005).

Al-Sweedan ve diğerleri'nin (2012) çalışmasında, 18 talasemi minör, 7 talasemi majör ve kontrol grubu olarak 18 sağlıklı gönüllü yetişkin erkek bireyde yapılan kromozom aberasyon ve SCE testlerinin kullanıldığı bir çalışmada, talaseminin genotoksik etkileri lenfositler değerlendirilerek saptanmaya çalışılmıştır. İdrarda 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) ölçümü yapılarak oksidatif DNA hasarının seviyesi araştırılmıştır. Talasemi majör hastalarında kromozomal aberasyon ve kardeş kromatid değişim oranı diğer gruplara göre anlamlı olarak fazla bulunmuştur, bu sonuçlara göre talasemi majör hastalarında kromozom hasarı daha yüksektir. Talasemi minör hastalarında yalnızca SCE oranında küçük ama anlamlı bir artış gözlenmiş olup kontrole göre 8-OHdG seviyelerinde anlamlı bir artış bulunmamıştır (Al-Sweedan, Khabour ve Isam, 2012).

Ortalama yaşları $33,8 \pm 9,7$ olan ve toplam 123 bireyden oluşan bir çalışmada SD-MÇ testi ve Comet testi ile genotoksisite değerlendirilmiştir. Çalışmaya katılan bireyler kan transfüzyonu uygulanmakta olan ve geçmişte transfüzyon uygulanmış 113 yetişkin talasemi hastası ve 10 yetişkin sağlıklı gönüllüden oluşmaktadır. Çalışmada hücrel oksidatif hasarın belirlenmesi amacı ile ROT oluşumu, lipid peroksidasyonu, 8-OHdG ve mitokondriyal transmembran potansiyeli araştırılmıştır. Ayrıca biyokimyasal ve hematolojik parametreler ölçülmüştür. Comet testi ile talasemili hastaların kontrol grubuna göre oldukça yüksek DNA hasarına sahip olduğu saptanmış, ayrıca transfüzyon uygulanmaya devam eden hastalarda uygulanmayanlara göre DNA hasarı daha yüksek bulunmuştur. Yapılan çalışmada transfüzyon uygulanan bireylerin lenfositleri incelenmiş, mikroçekirdek sıklığında anlamlı bir artış gözlenmiştir. Mikroçekirdek sıklığının yanı sıra nükleoplazmik köprü (NPK) ve nükleer tomurcuk (NT) değerlendirmesi de yapılmıştır.

Buna göre transfüzyon uygulaması devam eden hastalarda kontrole göre total DNA hasarı anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Kontrol ile geçmişte transfüzyon uygulanmış hastalar karşılaştırıldığında, hasta grubundaki DNA hasarı daha yüksek bulunmuş olsa da fark anlamlı bulunmamıştır (Ferro ve diğerleri, 2012).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. BT Minör Çocuklar (Çalışma Grubu) ve Sağlıklı Çocuklar (Kontrol Grubu) ile Çalışma Popülasyonunun Belirlenmesi

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Hematolojisi Bilim Dalı Polikliniğinde BT minör tanısı verilen çocuklar incelenmiştir. BT minör tanısı tam kan sayımı (CBC, Complete Blood Count) ve hemoglobin elektroforezi ile konmuştur. Tam kan sayımında, vücut demir göstergeleri normalken; mikrositöz (MCV, Mean Corpuscular Volume: ≤ 80 fl), hipokromi (MCH, Mean Corpuscular Hemoglobin: ≤ 25) ve eritrositöz (RBC, Red Blood Cell: > 5) bulunması ve eş zamanlı olarak hemoglobin elektroforezinde HbA2'nin $\geq 3,5$ olmasıyla tanı verilmiştir. Bazı hastaların tam kan sayımında BT minör ile uyumlu eritrosit indeksleri bulunmasına rağmen, vücut demir göstergeleri düşük olmadığı halde HbA2'nin yüksek bulunmadığı durumda, ebeveyn ile ilgili çalışma ve beta globin geninde moleküler değerlendirme yapılmıştır. En az bir ebeveynde hastayla benzer laboratuvar bulguları olması durumunda ve beta globin geninde mutasyon saptanması durumunda tanı verilmiştir. Bu kriterlere uyan çocuklar çalışmaya BT minör grubunu oluşturmak üzere alınmıştır. Kontrol grubunun bir kısmını bu çocukların BT minör olmayan kardeşleri, geri kalanını da aynı hastaneye klinik kontrol amaçlı başvurusu olan yaş ve cinsiyet açısından benzer sağlıklı çocuklar oluşturmuştur. Bu çocukların ise BT minör çocukların geniş aile çevresinden seçilmesine öncelik verilmiştir.

Araştırma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 24/03/2014 tarih ve 162 sayı ile onaylanmıştır (Ek 1) ve Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir (02/2014-03). Çalışma ve kontrol grubunun ebeveynlerinden çocuklarının çalışmada gönüllü olarak yer aldığına ve kan örneklerinin bu projedeki çalışmalarda kullanılmasını kabul ettiklerine dair gönüllü beyan formu ile onayları alınmıştır. Her çocuğun anne ya da babasına çocukla ilgili yaş, cinsiyet, kilo, boy, öğrenim durumu, son 1 yılda olduğu aşular, son 3 ayda X-ışını maruziyeti, doktor tavsiyesi dışında kullandığı ilaç ve vitaminler, çay içme alışkanlığı, beslenme alışkanlığı, anne ve babanın sigara içme alışkanlığı, yaptığı spor aktiviteleri ve aile bireylerindeki kalıtsal hastalıklar gibi bilgileri içeren anket formu yüz yüze uygulanmıştır. Anket formunun hekim tarafından doldurulacak bölümünde ise çocuğun kullandığı başka ilaçları, vitaminleri ve geçirdiği viral enfeksiyonları sorgulayan sorular yer almıştır. Anket uygulaması ile çalışmaya katılan

çocukların çevresel ve klinik durumlarını anlamak, kullanılacak yöntemlerde karıştırıcı olabilecek durumların saptanması amaçlanmıştır. Uygulanan gönüllü beyan formu ve anket formu örnekleri Ek 2 ve Ek 3’de yer almaktadır.

3.2. Çalışma ve Kontrol Grubundan Biyolojik Örneklerin Toplanması

Çalışmaya dahil olan çocuklardan biyolojik materyal olarak alınan kan örnekleri 01/07/2014-31/12/2015 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Hematolojisi Bilim Dalı Polikliniği tarafından toplanmıştır. Periferal kan lenfositlerinde (PKL) genotoksisite yöntem uygulamaları Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalında gerçekleştirilmiştir. Kan örneklerinde biyokimyasal analizler ise Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi rutin biyokimya laboratuvarında yapılmıştır.

Çalışma süresince genotoksisite yönteminde kullanılacak kan örnekleri, heparinli, vakumlu tüplere en az 2 ml olacak şekilde sadece bir kere alınmıştır. Örnekler, Sitokinezi Durdurulmuş Mikroçekirdek Yönteminin (SD-MÇ) uygulanması için Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Ana Bilim Dalı’na +4°C’de aynı gün içerisinde çalışılmak üzere ulaştırılmıştır. Aynı örneklerde Comet yöntemi de uygulanmıştır (Menderes, 2016).

3.3. Sitokinezin Durdurulduğu Mikroçekirdek (SD-MÇ) Yöntemi

3.3.1. Kullanılan kimyasallar

Besi yeri	(Chromosome Medium B F5023): 100 ml
Sitokalazin B	(Alfa Aesar (USA) J65342)
Dimetil sülfoksit (DMSO)	(Amresco -67685)
KCl	(Merck)
Asetik asit %100	(Merck)
Metanol	(Merck)
Formaldehit	(Merck)
%4 Giemsa	(Merck)
%4 May Grünwald	(Merck)

3.3.2. Kullanılan Aletler

37°C'lik inkübatör	(Nuare Model No NU-5100E)
1000 rpm'lık santrifüj	(Nüve CN180)
Vorteks	(FIRLABO-sa)
Hassas Terazi	(Shimadzu AW320)
Pipetler	(Eppendorf)
Traşlı lam ve lamel	(Menzel-Glaser)
Işık mikroskopu	(Zeiss Primo Star)
Sayaç	(Marienfeld Superior Counter 2001)
Beher	
Balon joje	
Cam şale	
Mezür	
Tartım kaşığı	
Su trompu	
Özel boyama kabı	

3.3.3. Deneyin Yapılışı

3.3.3.1. Gerekli çözeltilerin hazırlanması

Besi yeri

SD-MÇ yöntemi için fötal buzağı serumu ve fitohemaglutinin içeren hazır besi yeri steril koşullarda kullanılmıştır. Besi yeri, steril 15 ml'lik kapaklı konik tüplerin her birine 4,5 ml olacak şekilde aktarılmıştır. Tüpler daha sonra kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırılmıştır.

Sitokalazin B çözeltisinin hazırlanması

Sitokalazin B, DMSO içinde 6 µg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde steril koşullarda çözülmüştür. Steril küçük ependorflara dağıtılarak -80 °C'ye kaldırılmıştır.

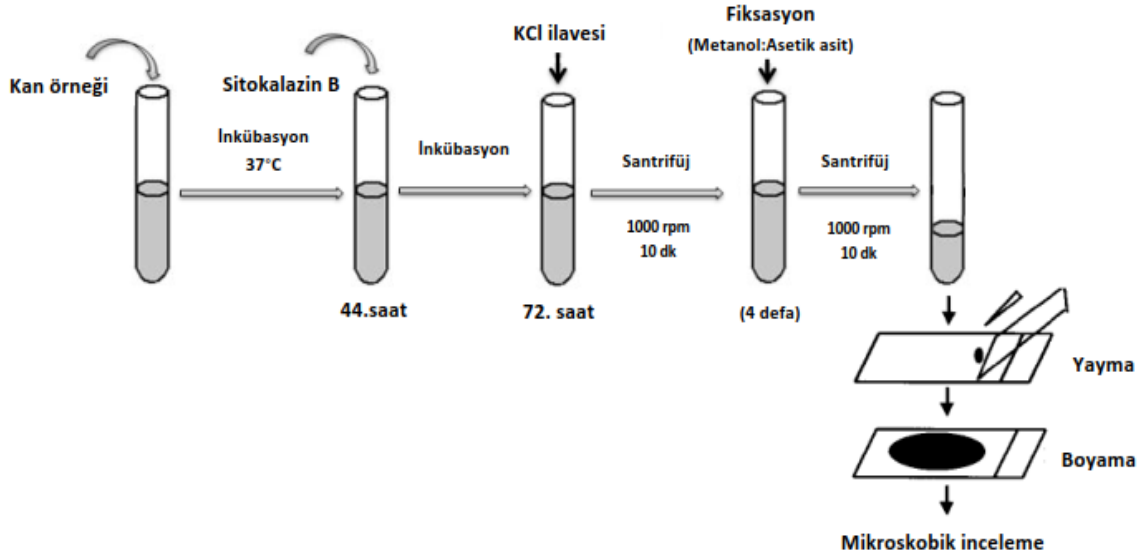
Potasyum klorür (KCl) çözeltisinin hazırlanması

0,075 M potasyum klorür çözeltisi hazırlanarak deneyde kullanılmak üzere buzdolabına kaldırılmıştır.

3.3.3.2. SD-MÇ Yöntemi

0,5 ml venöz kan örneği, hazırlanan 4,5 ml'lik besi yerine steril koşullarda eklendi. Her bir örnek için 1 adet tüp kodlandı. Tüpler 72 saat bekletilmek üzere 37°C'lik inkübatöre kaldırıldı. 44. saatte sitokinezin durdurulması amacıyla son konsantrasyonu 6 µg/ml olacak şekilde sitokolazin B çözeltisi steril koşullarda örnekler eklendi ve tekrar inkübatöre kaldırıldı. 72. saatin sonunda örnekler inkübatörden alınarak 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant su trompu ile çekildi ve atıldı. Örnekler vorteks üzerindeyken çökelti üzerine pastör pipeti ile 5 ml taze hazırlanmış 0,075 M KCl hücrelerin şişirilmesi amacıyla damla damla eklendi ve sonra buzdolabına koyularak 3 dakika bekletildi. Buzdolabından alınan örnekler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant su trompu ile atılarak çökelti üzerine 5 ml taze hazırlanmış metanol:asetik asit çözeltisi (3:1 oranında), örnekler vorteks üzerindeyken eklendi. 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu temizleme ve fiksasyon işlemi dipteki çökelti şeffaf hale gelene kadar 4 kere tekrarlandı. Üstteki süpernatant atıldı ve alttaki çökeltiye cam pipetle pipetaj yapıldı. Son hücre pelleti soğuk distile suda bekletilen aynı şekilde kodlanmış 2 lam üzerine yayıldı. Lamalar oda ısısında kurumaya bırakıldı.

100 ml'lik mezüre 4 ml Giemsa ve 4 ml May Grünwald boyası koyularak distile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Lamalar bir cam şaleye yerleştirildi. Üzerine hazırlanan boyama çözeltisi ilave edilerek 10 dakika beklendi. Bu sürenin sonunda lamalar distile suyla 2 kere çalkalandı ve oda ısısında kurumaya bırakıldı. Boyanan preparatlarda her birey için 1000 binükleer hücre ışık mikroskopunda x40 objektif kullanılarak değerlendirildi. İlk 250 hücrede mono-, bi-, tri-, tetra- nükleer hücrelerin sayısı belirlenerek nükleer bölünme indeksi (NBİ) hesaplandı. 1000 binükleer hücrede MÇ'li binükleer hücre sayısı, binükleer hücrelerdeki MÇ sayısı, nükleer tomurcuk (NT) ve nükleoplazmik köprü (NPK) sayıları belirlendi.



Şekil 3.1. SD-MÇ yöntem protokolü

Sitokinezin durdurulduğu binükleer hücrelerin teşhisi için kriterler (Fenech, 2007):

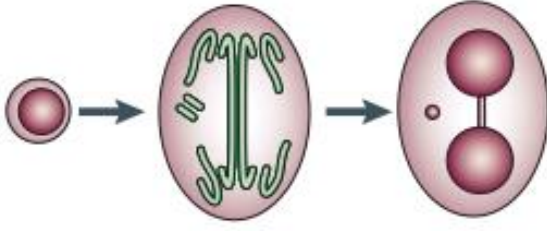
- Hücreler iki çekirdeğe sahip olmalıdır.
- Binükleer hücredeki iki çekirdeğin çekirdek zarları tam olmalı ve aynı sitoplazmik sınır içerisinde yer almalıdır.
- Binükleer hücredeki iki çekirdek yaklaşık aynı boyutta, aynı boyanma özelliklerinde ve yoğunlukta olmalıdır.
- Binükleer hücredeki iki ana çekirdek temas edebilir ancak birbirisiyle üst üste gelmemeli, örtüşmemelidir. Birbiriyle örtüşen iki çekirdeğe sahip bir hücre, yalnızca, her bir çekirdeğin çekirdek sınırları ayırt edilebiliyorsa sayılabilir.
- Binükleer hücrenin sitoplazmik sınırı ya da zarı bozulmamış olmalı ve komşu hücrelerin sitoplazmik sınırlarından açıkça ayırt edilebilir olmalıdır.
- Binükleer hücredeki iki çekirdek birbirine çekirdek çapının 1/4'ünden daha geniş olmayan bir köprü ile bağlı olabilir.
- Ana çekirdekleri nekroza ya da apoptozise uğramış hücreler sayılmamalıdır.

Mikroçekirdek sayımı için kriterler (Fenech, 2007):

- Yalnızca sitokinezi durdurulmuş binükleer hücrelerdeki mikroçekirdekler sayılmalıdır. Üç, dört veya daha fazla çekirdekli hücrelerde görülen MÇ'ler değerlendirme dışı bırakılmalıdır.
- Mikroçekirdek çapı, ana çekirdek çapının 1/16'i ile 1/3'i arasında olmalıdır. Bu büyüklük, sırasıyla, binükleer hücredeki ana çekirdeklerden birinin alanının 1/256'i ile 1/9'ine tekabül etmektedir.
- Mikroçekirdek yuvarlak veya oval şekillerde olmalı ve hücre sitoplazması içinde kalmalıdır.
- Mikroçekirdek ışığı kırmaz, bu nedenle boyama partikülleri gibi artifaktlardan kolayca ayırt edilebilmektedir.
- Mikroçekirdek ana çekirdeğe bağlı olmamalıdır.
- Mikroçekirdek ana çekirdekle benzer morfolojik yapıya ve aynı boyanma yoğunluğuna sahip olmalıdır. Bazen, boyanma daha yoğun olabilmektedir.
- Mikroçekirdek ana çekirdekle üst üste çakışmamalı ve ana çekirdekten açık bir şekilde ayırt edilebilmelidir.
- Mikroçekirdek ana çekirdekle aynı düzlemde olmalıdır.
- Şüphe duyulan mikroçekirdek değerlendirilmemelidir.

Nükleoplazmik köprülerin (NPK) özellikleri (Fenech, 2007):

- NPK, binükleer bir hücredeki çekirdeklerle bağlantılı DNA içeren devamlı bir yapıdır.
- NPK'nin genişliği değişebilir ancak genellikle hücre içindeki çekirdeğin çapının 1/4'inden fazla olmamalıdır.
- NPK, ana çekirdekle aynı boyanma yoğunluğuna sahip olmalıdır.
- Nadir durumlarda, bir binükleer hücrede birden fazla NPK görülebilir.
- NPK bulunan bir binükleer hücrede bir ya da daha fazla MÇ görülebilir veya hiç görülmeyebilir.
- Çekirdekleri birbiriyle temas eden hücrelerde NPK görülmesi zordur. Bu nedenle NPK, çekirdekleri açıkça ayırt edilebilen hücrelerde değerlendirilir.



Şekil 3.2. NPK oluşumu (Fenech, 2007)

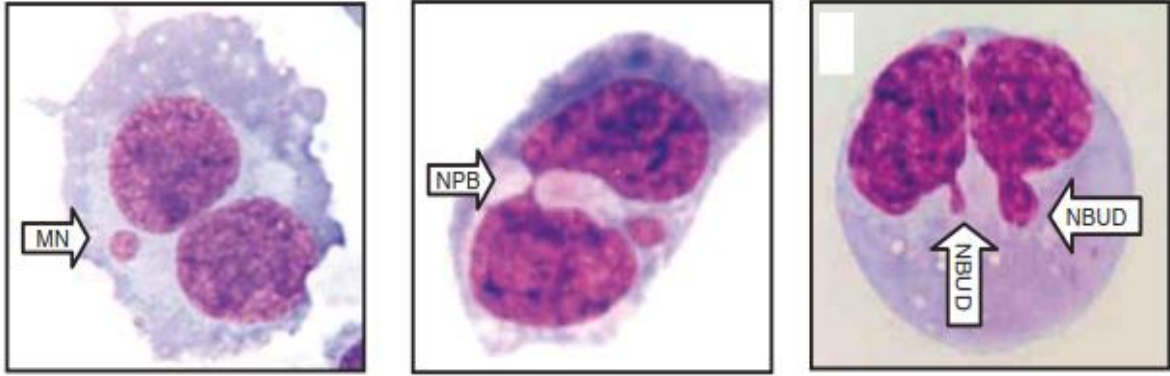
Nükleer tomurcukların (NT) özellikleri (Fenech, 2007):

- NT, görünüş olarak mikroçekirdeğe benzer olmakla birlikte, çapı kendi çapından daha dar veya daha da ince olabilen bir köprü ile çekirdeğe bağlıdır.
- NT, MÇ ile genellikle aynı boyanma yoğunluğuna sahiptir.
- NT bazen çekirdeğe bitişik bir vakuol şeklinde görülebilir.
- Eğer görülen nükleer anomalinin çekirdeğe dokunan bir mikroçekirdek ya da nükleer tomurcuk olup olmadığını ayırt etmek zor ise, bunu nükleer tomurcuk olarak değerlendirmek kabul edilebilirdir.

Nükleer bölünme indeksi (NBİ) canlı hücre fraksiyonunun proliferatif durumunun belirlenmesinde kullanılan bir ölçüttür. Bundan dolayı, sitostatik etkilerin bir göstergesidir ve aynı zamanda immün fonksiyonunun önemli bir biyogöstergesi olan lenfosit mitojenik yanıtın ölçümünde kullanılan yararlı bir parametredir. NDI aşağıdaki formüle göre hesaplanmaktadır:

$$NBİ = \frac{\text{mononükleer hücre} \times a + \text{binükleer hücre} \times b + \text{trinükleer hücre} \times c + \text{tetranükleer hücre} \times d}{a+b+c+d}$$

$$(a+b+c+d=250)$$



Şekil 3.3. Mikroskopta Mikroçekirdek (MÇ), Nükleoplazmik Köprü (NPK) ve Nükleer Tomurcuk (NT) görünümleri (Fenech, 2007)

3.4. İstatistiksel Analiz

3.4.1. Popülasyon büyüklüğünün belirlenmesi için yapılan pilot çalışma

Örneklem büyüklüğünün hesaplanması

Örneklem büyüklüğünün belirlenmesi amacı ile pilot çalışma yapılmıştır. Yapılan bu pilot çalışmada 10 BT minör çocuk ve 10 sağlıklı çocuğun kan örneklerinde mikroçekirdek sıklığı değerlendirilmiştir. Mikroçekirdek sıklıkları ortalaması ve standart sapması, kontrol grubunda 4,0 (SS: 2,0), talasemi taşıyıcısı grupta ise 5,4 (SS: 2,9) olarak bulunmuştur. NCSS PASS (2005) programı kullanılarak %95 güven düzeyinde %80 güç ile 5 birimlik farkın belirlenebilmesi için, iki ortalama arasındaki farkın anlamlılık testine göre örneklem büyüklüğü her bir grupta en az 51 gözlem olarak bulunmuştur.

3.4.2. Çalışma ve kontrol grubunun istatistiksel analizi

İstatistiksel analizler SPSS 22.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Çalışma ve kontrol gruplarında sayısal değişkenler açısından karşılaştırma yapmak için, normal dağılım gösteren değişkenler iki ortalama arasındaki farkın anlamlılık testi ile normal dağılım göstermeyen değişkenler Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmiştir. Nitelik değişkenler açısından gruplar arasındaki farklılık Pearson ki-kare testi kullanılarak bulunmuştur. Sayısal değişkenler arasındaki ilişki Spearman's rho korelasyon katsayısı ile incelenmiştir. Yaş değişkeninin grupları ayırt edebilmek için en iyi kesim noktası ROC analizi yapılarak

elde edilmiştir. Yaş değişkeni iki sınıfta incelenmiştir. Mikroçekirdek sıklığı değişkeni için, BT minör olan çocuklar ile sağlıklı çocukları ayırt edebilecek en iyi kesim noktası ROC analizi kullanılarak elde edilmiştir. En iyi kesim noktasının duyarlılık ve seçicilik değerleri verilmiştir. BT minöre etki eden değişkenleri belirlemek için lojistik regresyon analizi kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistik olarak nitelik değişkenler için sayı ve yüzde; normal dağılım gösteren sayısal değişkenler için aritmetik ortalama, standart sapma, normal dağılım göstermeyen değişkenler için ortanca, minimum, maksimum değerler verilmiştir. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.





4. BULGULAR

4.1. Çocuklara ait demografik özellikler

Çalışmaya yaş ortalaması $6,09 \pm 2,51$ (min-maks=2-11) arasında değişen 79 BT minör çocuk ile yaş ortalaması $7,08 \pm 2,55$ (min-maks=2-11) arasında değişen anemik olmayan 74 sağlıklı çocuk alınmıştır. BT minörlü çocukların 39'u erkek (%49,4), 40'ı kız (%50,6), sağlıklı çocukların ise 33'ü erkek (%44,6), 41'i kızdır (%55,4). BT minör çocuklar ve sağlıklı çocukların genel özellikleri Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.



Çizelge 4.1. BT minör çocuklar ve sağlıklı çocukların genel özellikleri

	BT minör çocuklar (n=79)		Sağlıklı çocuklar (n=74)		P değeri
	Ort±SS	Ortanca (min-maks)	Ort±SS	Ortanca (min-maks)	
Yaş (yıl)	6,09±2,51	6 (2-11)	7,08±2,55	8 (2-11)	0,012
BKİ	16,79 ± 3,78	15,35 (12,01-27,58)	16,95 ± 3,35	15,97 (13-26)	0,626
	n (%)		n (%)		
Cinsiyet					
Erkek	39 (%49,4)		33 (%44,6)		0,628
Kız	40 (%50,6)		41 (%55,4)		
X-Işını					
Alan	20 (%25,3)		17 (%23,0)		0,851
Almayan	59 (%74,7)		57 (%77,0)		
Pasif sigara içiciliği					
Var	16 (%20,3)		15 (%20,3)		1
Yok	63 (%79,7)		59 (%79,7)		
Viral enfeksiyon					
Geçiren	5 (%6,4)		4 (%5,4)		1
Geçirmeyen	73 (%93,6)		70 (%94,6)		
Aşı					
Olan	22 (%27,8)		20 (%27,0)		1
Olmayan	57 (%72,2)		54 (%73,0)		
Vitamin					
Alan	8 (%10,1)		4 (%5,4)		0,371
Almayan	71 (%89,9)		70 (%94,6)		
Aktivite					
Az	38 (%48,1)		37 (%50,0)		0,963
Orta	35 (%44,3)		32 (%43,2)		
Çok	6 (%7,6)		5 (%6,8)		

BT minör çocuklar ve sağlıklı çocuklar arasında cinsiyet, beden kitle indeksi (BKİ) açısından uyumludur ($p>0,05$). X-ışını maruziyeti, pasif sigara içiciliği, viral enfeksiyonlar, vitamin kullanımı, aşı uygulaması ve aktivite süresi açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$). BT minör çocuklar ve sağlıklı çocuklar arasında yaş açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$).

4.2. Çocuklara ait tam kan sayımı parametreleri, biyokimyasal parametreler ve hemoglobin elektroforez sonuçları

BT minör çocuklar ve sağlıklı çocukların tam kan sayımı parametreleri, biyokimyasal parametreler ve hemoglobin elektroforez sonuçları Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.



Çizelge 4.2. Tam kan sayımı parametreleri, biyokimyasal parametreler ve hemogloblin elektroforez sonuçları

Parametre	BT minör çocuklar (n=79)		Sağlıklı çocuklar (n=74)		p değeri
	Ort±SS	Ortanca (min-maks)	Ort±SS	Ortanca (min-maks)	
RBC (10.e6/µl)	5,44±0,49	5,56 (4,37-6,57)	4,72±0,31	4,67 (3,96-6,20)	<0,001
Hb (g/dl)	11,60±1,02	11,56 (9,45-13,89)	12,76±1,57	12,97 (1,34-15,90)	<0,001
HCT (%)*	36,13±2,52	36,20 (29,45-41,20)	38,40±2,40	38,20 (33,67-47,50)	<0,001
MCV (fl)	66,90±8,23	64,45 (54,09-79,81)	82,61±3,81	82,88 (57,89-89,70)	<0,001
MCH (pg)	21,53±3,21	20,08 (16,20-27,19)	27,81±1,40	27,88 (18,37-30,13)	<0,001
MCHC (g/dl)*	32,11±1,07	32,10 (29,20-34,51)	33,67±0,71	33,66 (31,72-36,17)	<0,001
RDW (%)	15,56±1,83	15,84 (12,60-22,14)	13,28±0,75	13,20 (12,04-16,37)	<0,001
HbA0 (%)	84,02±4,42	84,65 (62-92)	85,72±2,43	85,80 (71-95)	0,001
HbA2 (%)	4,03±1,44	3,40 (2,10-8,50)	3,08±0,52	3,00 (2-6)	0,001
HbF (%)	1,43±1,38	1,00 (0,10-6,90)	0,97±1,57	0,60 (0,10-13)	<0,001
PLT (10.e3/µl)	322,34±70,41	314 (194-569,20)	308,77±67,23	300,75 (181-509,80)	0,260
BK (10.e3/µl)	8,14±1,88	7,83 (4,46-14,40)	10,78±29,06	7,30 (4,70-257,10)	0,110
Demir (µg/dl)*	79,65±29,06	75 (16-179)	81,49±31,10	76,30 (24-170)	0,707
UIBC (µg/dl)*	286,40±46,08	287 (158-370)	285,68±46,62	278,70 (180-378)	0,923
TSI (%)	29,99±16,81	26,28 (4,50-104,20)	30,23±14,93	26,81 (6,80-66,70)	0,742
Ferritin (ng/ml)	37,56±23,15	31,37 (8,86-144,70)	38,08±17,92	32,96 (10,40-85,18)	0,415
B12 (pg/ml)	461,96±177,52	417,90 (186-1022)	429,29±186,95	382,10 (166,20-1240)	0,177
Folat (ng/ml)	11,89±4,24	10,75 (5,48-31)	12,10±4,63	11,40 (6,61-40,70)	0,683
CRP (mg/l)	4,62±14,68	1,93 (1-127)	2,85±2,89	2 (1-16,60)	0,711
Vit C (ng/ml)	110,95±88,65	70 (9,77-313,88)	90,14±67,70	69,28 (9,69-303,23)	0,605
Vit E (µM)	51,05±36,56	31,46 (10,32-130,25)	45,72±30,36	35,13 (10,42-122,20)	0,782
TAS (mmol/l)	2,12±0,79	2,10 (0,44-4)	2,15±0,85	2,33 (0,15-3,81)	0,676
TOS (µmol/l)	7,15±4,65	5,91 (1,26-30,14)	8,55±6,63	6,33 (0,28-34,93)	0,365

* Ortalama±SS; Diğer veriler Ortanca (min-maks) değerleri üzerinden yorumlanmıştır.

SS: Standart sapma, **RBC:** Eritrosit sayısı, **Hb:** Hemoglobin, **HCT:** Hematokrit, **MCV:** Ortalama eritrosit hacmi, **MCH:** Ortalama eritrosit hemoglobini, **MCHC:** Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu, **RDW:** Eritrosit dağılım genişliği, **PLT:** Trombosit sayısı, **BK:** Lökosit sayısı, **CRP:** Seroreaktif protein **UIBC:** Doymamış demir bağlama kapasitesi **TSI:** Transferrin saturasyon indeksi = (Serum demir düzeyi/ Demir bağlama kapasitesi) x 100, **Vit C:** Vitamin C, **Vit E:** Vitamin E, **TAS:** Total antioksidan seviye, **TOS:** Total oksidan seviye

BT minör çocuklar ve sağlıklı çocukların eritrosit parametreleri (RBC, MCV, MCH, MCHC, RDW) değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,05$). BT minör çocuklar ve sağlıklı çocuklarda hemoglobin elektroforez sonuçları (HbA0, HbA2, HbF) açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,05$). Vücut demir göstergeleri (demir, demir bağlama kapasitesi, TSI, ferritin), lökosit ve trombosit değerleri açısından iki grup arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). İki grup arasındaki CRP, folat, B12, Vitamin C ve Vitamin E değerlerinde de istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktur ($p>0,05$).

4.3. SD-MÇ yöntemine ait sonuçlar

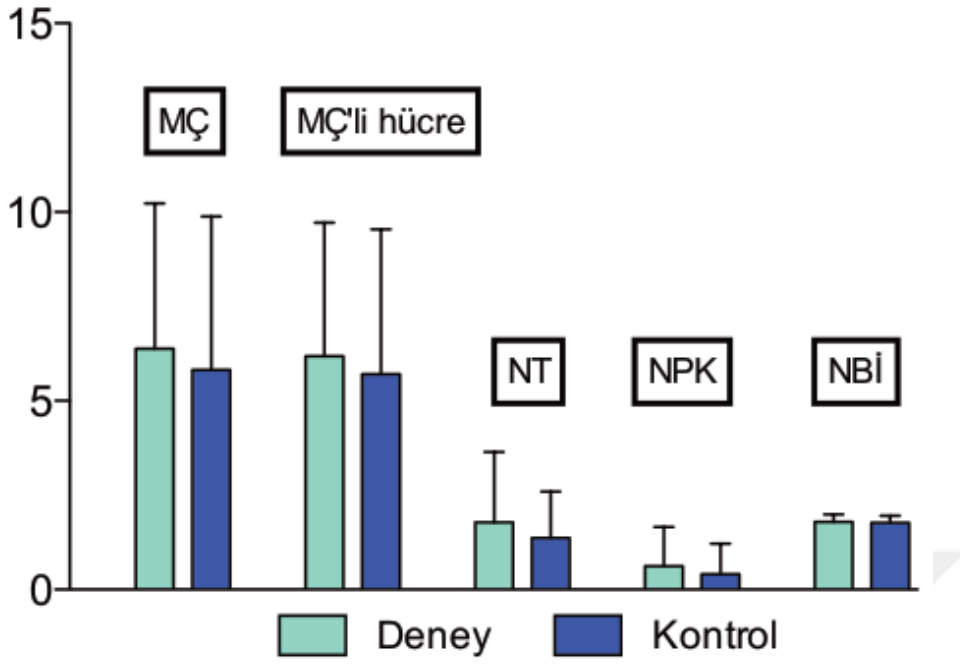
BT minör çocuklar ve sağlıklı çocuklar SD-MÇ yöntemi ile genotoksisite ve sitotoksisite parametreleri açısından karşılaştırılmıştır. İki grubun PKL’de MÇ, MÇ’li hücre, NT, NPK sıklıkları ve NBİ karşılaştırılmasına ilişkin sonuçlar Çizelge 4.3’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Grupların genotoksisite ve sitotoksisite parametreleri ile karşılaştırılması

Parametre (Sıklık; %)	BT minör çocuklar (n=79)		Sağlıklı çocuklar (n=74)		p değeri
	Ort±SS	Ortanca (min-maks)	Ort±SS	Ortanca (min-maks)	
MÇ	6,38±3,85	5 (0-24)	5,82±4,05	5 (0-24)	0,274
MÇ’li hücre	6,18±3,54	5 (0-19)	5,70±3,84	5 (1-23)	0,303
NT	1,78±1,86	1 (0-12)	1,36±1,22	1 (0-5)	0,217
NPK	0,62±1,04	0 (0-5)	0,41±0,81	0 (0-3)	0,121
NBİ	1,79±0,18	1,80 (1,36-2,49)	1,77±0,18	1,78 (1,32-2,20)	0,328

MÇ: Mikroçekirdek, **MÇ’li hücre:** Mikroçekirdekli hücre, **NT:** Nükleer tomurcuk, **NPK:** Nükleoplazmik köprü, **NBİ:** Nükleer bölünme indeksi

BT minör çocuklarda MÇ, MÇ’li hücre, NT, NPK sıklıkları ve NBİ sağlıklı çocuklara göre yükseklik gösterse de fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 4.1. BT minör çocuklar ve sağlıklı çocuklarda MÇ, MÇ'li hücre, NT, NPK sıklıkları ve NBI'nin karşılaştırılması

BT minör çocuklar ve sağlıklı çocuklar arasında yaşın istatistiksel olarak anlamlı fark göstermesi nedeniyle yaş için kesim noktası araştırılmış ve 7 olarak bulunmuştur. Gruplar 7 yaş ve altı ve 7 yaş üstü olarak yeniden düzenlenmiştir.

7 yaş ve altı BT minör çocuklar ($4,75 \pm 1,61$) ile sağlıklı çocuklar ($4,86 \pm 1,85$) yaş açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$). 7 yaş üstü BT minör çocuklar ($9,17 \pm 1,09$) ile sağlıklı çocuklar ($9,08 \pm 0,90$) yaş açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

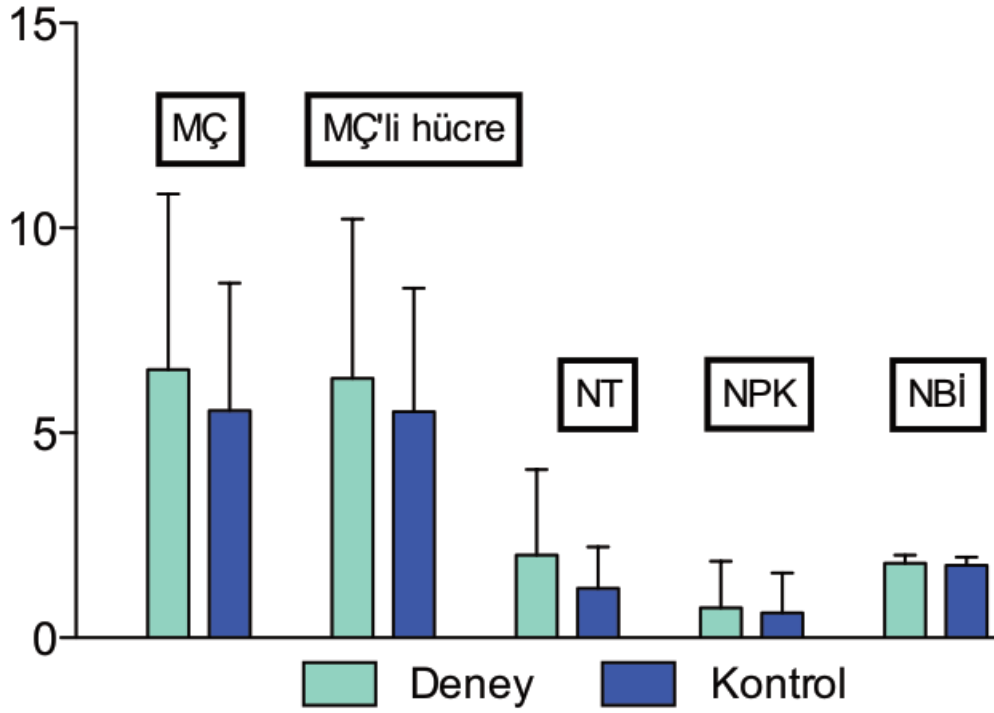
7 yaş ve altı grupların genotoksisite ve sitotoksisite parametreleri açısından karşılaştırılmasına ilişkin sonuçlar Çizelge 4.4'de; 7 yaş üstü grupların genotoksisite ve sitotoksisite parametreleri açısından karşılaştırılmasına ilişkin sonuçlar ise Çizelge 4.5'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. ≤ 7 yaş grupların genotoksisite ve sitotoksisite parametreleri ile karşılaştırılması

Parametre (Sıklık; %)	BT minör çocuklar (n=55)		Sağlıklı çocuklar (n=35)		p değeri
	Ort±SS	Ortanca (min-maks)	Ort±SS	Ortanca (min-maks)	
MÇ	6,55±4,29	5 (0-24)	5,54±3,10	5 (0-16)	0,466
MÇ'li hücre	6,33±3,89	5 (0-19)	5,51±3,01	5 (1-16)	0,516
NT	2,02±2,08	2 (0-12)	1,20±1,02	1 (0-4)	0,054
NPK	0,73±1,14	0 (0-5)	0,60±0,97	0 (0-3)	0,566
NBİ	1,82±0,20	1,80 (1,36-2,49)	1,76±0,20	1,78 (1,32-2,20)	0,234

MÇ: Mikroçekirdek, **MÇ'li hücre:** Mikroçekirdekli hücre, **NT:** Nükleer tomurcuk, **NPK:** Nükleoplazmik köprü, **NBİ:** Nükleer bölünme indeksi

7 yaş ve altı için, BT minör çocuklar ve sağlıklı çocuklar arasında genotoksisite ve sitotoksisite parametreleri değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). Bununla birlikte, NT parametresi değerinde sınırda bir anlamlılık bulunmuştur ($p=0,054$).



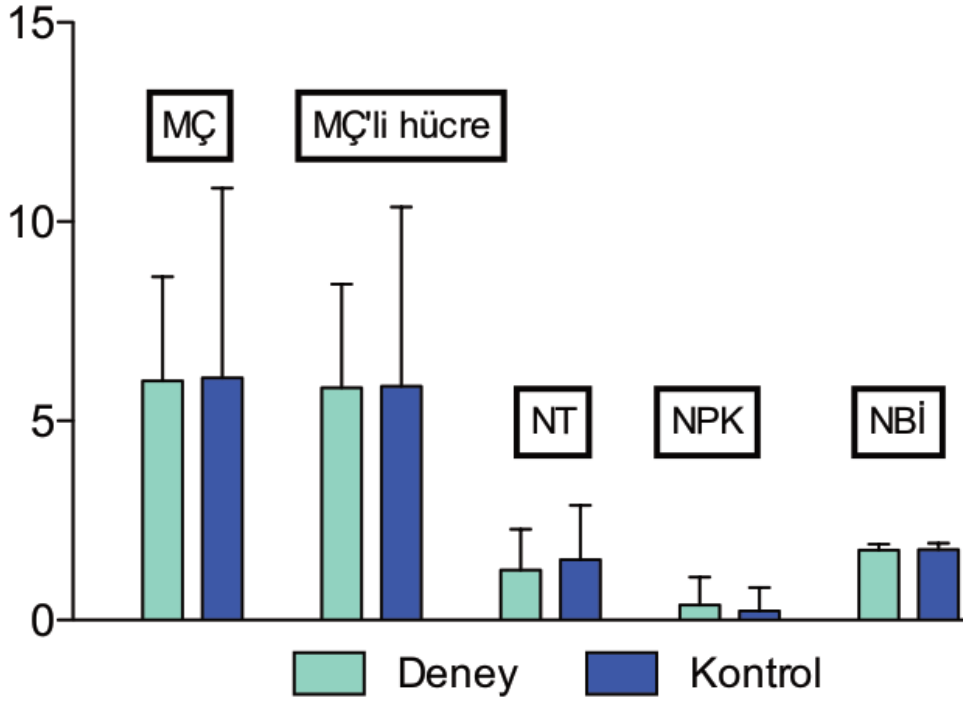
Şekil 4.2. ≤ 7 yaş BT minör çocuklar ve sağlıklı çocuklarda MÇ, MÇ'li hücre, NT, NPK sıklıkları ve NBİ'nin karşılaştırılması

Çizelge 4.5. >7 yaş grupların genotoksisite ve sitotoksisite parametreleri ile karşılaştırılması

Parametre (Sıklık; %)	BT minör çocuklar (n=24)		Sağlıklı çocuklar (n=39)		p değeri
	Ort±SS	Ortanca (min-maks)	Ort±SS	Ortanca (min-maks)	
MÇ	6,00±2,62	5 (2-11)	6,08±4,77	5 (1-24)	0,417
MÇ'li hücre	5,83±2,59	5 (2-11)	5,87±4,49	5 (1-23)	0,459
NT	1,25±1,03	1 (0-3)	1,51±1,37	1 (0-5)	0,589
NPK	0,38±0,71	0 (0-2)	0,23±0,58	0 (0-2)	0,352
NBİ	1,75±0,14	1,75 (1,49-2,06)	1,77±0,16	1,78 (1,41-2,13)	0,623

MÇ: Mikroçekirdek, MÇ'li hücre: Mikroçekirdekli hücre, NT: Nükleer tomurcuk, NPK: Nükleoplazmik köprü, NBİ: Nükleer bölünme indeksi

7 yaş üstü için, BT minör çocuklar ve sağlıklı çocuklar arasında genotoksisite ve sitotoksisite parametreleri değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).



Şekil 4.3. >7 yaş BT minör çocuklar ve sağlıklı çocuklarda MÇ, MÇ'li hücre, NT, NPK sıklıkları ve NBİ'nin karşılaştırılması

Çalışmaya dâhil edilen ve kardeşi olan BT minör çocuklar ile bu çocukların sağlıklı kardeşleri de ayrıca genotoksisite ve sitotoksisite parametreleri açısından karşılaştırılmıştır. Grupların genotoksisite ve sitotoksisite parametreleri açısından karşılaştırılmasına ilişkin sonuçlar Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Kardeşi olan BT minör çocuklar ile bu çocukların sağlıklı kardeşleri arasındaki genotoksisite ve sitotoksisite parametreleri karşılaştırması

Parametre (Sıklık; %)	Sağlıklı kardeşi olan BT minör çocuklar (n=15)		BT minör çocukların sağlıklı kardeşleri (n=22)		p değeri
	Ort±SS	Ortanca (min-maks)	Ort±SS	Ortanca (min-maks)	
MÇ	5,53±3,42	5 (1-13)	6,36±2,79	6 (3-16)	0,254
MÇ'li hücre	5,47±3,48	5 (1-13)	6,27±2,82	6 (3-16)	0,268
NT	1,67±1,23	2 (0-4)	1,59±1,30	1 (0-4)	0,824
NPK	0,33±0,48	0 (0-1)	0,91±1,07	0,50 (0-3)	0,124
NBİ	1,81±0,22	1,80 (1,36-2,22)	1,77±0,16	1,80 (1,48-2,11)	0,550

MÇ: Mikroçekirdek, **MÇ'li hücre:** Mikroçekirdekli hücre, **NT:** Nükleer tomurcuk, **NPK:** Nükleoplazmik köprü, **NBİ:** Nükleer bölünme indeksi

Sağlıklı kardeşi olan BT minör çocuklar ile bu çocukların sağlıklı kardeşleri arasında genotoksisite ve sitotoksisite parametreleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

Sağlıklı kardeşi olan BT minör çocuklar (yaş ort: $5,73 \pm 2,69$) ile bu çocukların sağlıklı kardeşleri (yaş ort: $7,31 \pm 2,53$) yaş açısından karşılaştırıldığında anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

MÇ sıklığı değişkeni için, BT minör olan çocuklar ile sağlıklı çocukları ayırt edebilecek en iyi kesim noktası ROC analizi kullanılarak 7,5 olarak bulunmuştur. Buna göre MÇ sıklığı 7,5 ve altı, 7,5 üzeri olarak sınıflandırılmıştır. BT minör olan çocuklar ile sağlıklı çocuklar arasında MÇ sıklığının 7,5'in üzerinde olması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p=0,018$). Buna göre BT minör çocuklarda MÇ sıklığı 7,5'in üzerinde olanların oranı %39,2 iken sağlıklı çocuklarda %21,6'dır. Bütün çocuklarda BT minör çocukların MÇ sıklığı 7,5'in üzerinde olanların oranı ise %66'dır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. MÇ sıklığı kesim noktasına göre BT minör ve sağlıklı çocukların çapraz tablosu

			Çocuklar		Toplam
			BT minör	Sağlıklı	
MÇ sıklığı	≤7,5	Sayı	48	58	106
		Gruplar içinde (%)	45,3	54,7	100,0
		Kendi grubu içinde (%)	60,8	78,4	69,3
	>7,5	Sayı	31	16	47
		Gruplar içinde (%)	66,0	34,0	100,0
		Kendi grubu içinde (%)	39,2	21,6	30,7
Toplam		Sayı	79	74	153

BT minör olmaya etki eden değişkenleri belirlemek için lojistik regresyon analizi kullanılmıştır. Bağımsız değişkenler TAS, TOS, BKİ, pasif içicilik, ferritin, yaş, B12, X-ışını maruziyeti ve MÇ sıklığının kesim noktasına göre gruplandırılmış verisi kullanılmıştır. BT minör çocuklarda MÇ sıklığının 7,5 ve üzerinde olması, sağlıklı çocuklara göre 3 kat daha fazladır ($p=0,028$; Çizelge 4.8). BT minör çocuk olmak üzerine TOS verisinin negatif yönde 0,9 kat etkisi görülmektedir ($p=0,18$; Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Lojistik regresyon analizi ile BT minör grupta olmayı etkileyen parametrelerin irdelenmesi

Bağımlı değişken tüm popülasyon	B	Odds oranı	Odds oranı için %95 güven aralığı		p değeri
			alt	üst	
TOS ($\mu\text{mol/l}$)	- 0,106	0,899	0,823	0,982	0,018
MÇ sıklığı	1,101	3,007	1,128	8,020	0,028
Constant	1,348	3,849	-		0,071

TOS: Total oksidan seviye, **MÇ:** Mikroçekerdek, **Odds oranı:** Tahmini relatif risk, **B:** Regresyon katsayısı

4.4. Genotoksisite ve sitoksisite parametreleri ile biyokimyasal parametreler arasındaki ilişki analizi

MÇ'li hücre sıklığı ile MÇ sıklığı ($r=0,990$, $p<0,001$), NT sıklığı ($r=0,476$, $p<0,001$) ve NPK sıklığı ($r=0,179$, $p=0,027$) arasında anlamlı pozitif ilişki vardır. MÇ sıklığı ile NT sıklığı ($r=0,477$, $p<0,001$) ve NPK sıklığı ($r=0,163$, $p=0,044$) arasında anlamlı pozitif ilişki vardır. NT sıklığı ile NPK sıklığı ($r=0,165$, $p=0,042$) arasında anlamlı pozitif ilişki vardır. MÇ sıklığı ile HCT arasında ($r=-0,178$, $p=0,027$) anlamlı negatif ilişki vardır. NT sıklığı ile Hb ($r=-0,204$, $p<0,011$), HCT ($r=-0,171$, $p<0,034$) ve MCHC ($r=-0,195$, $p=0,016$) arasında anlamlı negatif ilişki vardır. NPK sıklığı ile RBC ($r=0,163$, $p=0,044$), RDW ($r=0,201$, $p=0,013$), HbA0 ($r=0,173$, $p=0,36$) ve HbA2 ($r=0,225$, $p=0,005$) arasında anlamlı pozitif; Hb ($r=-0,222$, $p=0,006$), HCT ($r=-0,230$, $p=0,004$), MCV ($r=-0,172$, $p=0,033$), MCH ($r=-0,179$, $p=0,027$), MCHC ($r=-0,207$, $p=0,010$) arasında anlamlı negatif ilişki vardır. Nİ ile HbA0 ($r=0,227$, $p=0,006$) arasında anlamlı pozitif; PLT ($r=-0,214$, $p=0,008$) ve CRP ($r=-0,217$, $p=0,007$) arasında anlamlı negatif ilişki vardır.

5. TARTIŞMA

Kalıtsal hemoglobin bozukluklarından biri olan talasemi, günümüzde ülkemizin de içinde bulunduğu Akdeniz ülkeleri başta olmak üzere dünya genelinde yaygın görülen önemli bir halk sağlığı sorunudur (Tuzmen ve Schechter, 2001). Beta globin zinciri sentezindeki bozukluklara bağlı olarak oluşan beta talasemi en sık görülen talasemi türüdür (Galanello ve Origa, 2010) . Beta talaseminin en hafif klinik formu olan ve genel olarak semptomsuz olduğu kabul edilen beta talasemi taşıyıcılığının sıklığı ülkemiz genelinde %4,3 olarak saptanmıştır. Bu oranın bazı bölgelerde %13,1'e çıktığı görülmüştür (Canatan, 2014; Canatan ve diğerleri, 2006).

Talasemi ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda, mekanizmasında oksidatif stresin rol oynadığı düşünülen genotoksisite ile hastalık ilişkisi incelenmiştir (Çizelge 5.1) (Cote ve Papadakou-Lagoyanni, 1979; Cote ve diğerleri, 1982; Silva, Manzato ve Varella-Garcia, 1992; Offer ve diğerleri, 2005; Al-Sweedan, Khabour ve Isam, 2012; Ferro ve diğerleri, 2012). Adı geçen çalışmalara topluca bakıldığında, araştırmalara konu olan çalışma popülasyonları talasemi tipleri bakımından heterojen olup, gruplarda beta talasemi majör, beta talasemi minör, beta talasemi intermedia ve alfa talasemili bireyler yer almıştır. Çalışmaların hepsinde talasemi majör bireylere yer verilirken, sadece üç çalışmada BT minör bireyler de yer almıştır (Cote ve Papadakou-Lagoyanni, 1979; Silva, Manzato ve Varella-Garcia, 1992; Al-Sweedan, Khabour ve Isam, 2012).

Çizelge 5.1. Tarihsel dizilime göre günümüze dek talasemili bireylerde yapılan tüm genotoksisite çalışmalarının özeti

Referans	Çalışma Grubu	Kişi sayısı (n)	Yaş aralığı	Yöntem	Sonuç
Cote ve Papadakou-Lagoyanni, 1979	Beta talasemi majör Beta talasemi minör Kontrol	6 3 8	6 ay - 18 yaş 20 - 30 yaş 6 ay-31 yaş (Çocuk ve yetişkin)	Lenfositlerde Kromozomal aberasyon (KA) yöntemi	Talasemi majör KA ↑
Cote ve diğerleri, 1982	Beta talasemi majör Kontrol	33 17	10 ay-34 yaş 2 - 48 yaş (Çocuk ve yetişkin)	Lenfositlerde Kardeş kromatid değişimi (SCE) yöntemi	Beta talasemi majör (transfüzyon uygulanmayan) SCE ↑ (p>0,05)
Silva, Manzato ve Varella-Garcia, 1992	Beta talasemi majör Beta talasemi minör Kontrol	5 5 5	2 - 27 yaş 16 - 26 yaş 18 - 28 yaş (Çocuk ve yetişkin)	Lenfositlerde Kardeş kromatid değişimi (SCE) yöntemi	Beta talasemi majör (folat eksikliği olan) SCE ↑
Offer ve diğerleri, 2005	Alfa ve beta talasemi Kontrol	29 12	-	Eritrositlerde Mikroçekirdek (MÇ) yöntemi	MÇ ↑
Al-Sweedan, Khabour ve Isam, 2012	Beta talasemi majör Beta talasemi minör Kontrol	7 18 18	Erkek yetişkin bireyler	Lenfositlerde Kardeş kromatid değişimi (SCE) ve Kromozomal aberasyon (KA) yöntemi	Beta talasemi majör SCE ↑ KA ↑ Beta talasemi minör SCE ↑
Ferro ve diğerleri, 2012	Beta talasemi majör Beta talasemi intermedia Kontrol	92 21 10	Ortalama 33,8 ± 9,7 yaş (Yetişkin)	Lenfositlerde Sitokinezin Durdurulduğu Mikroçekirdek (SD-MÇ) yöntemi ve Comet testi	MÇ ↑ NPK ↑, NT ↑ Kuyruk uzunluğu ↑
Bizim çalışmamız 2016	Beta talasemi minör Kontrol	79 74	2 - 11 yaş Çocuklar	Lenfositlerde Sitokinezin Durdurulduğu Mikroçekirdek (SD-MÇ) yöntemi	MÇ ↑ NT ↑ NPK ↑ NBİ ↑ (p>0,05)

Ülkemizde 1 500 000 beta talasemi minör, 5 500 talasemi majör bireyin bulunduğu (Canatan, 2014) göz önünde bulundurulduğunda, sıklığın bu kadar fazla olmasına rağmen adı geçen genotoksisite araştırmalarından hiçbiri ülkemizde gerçekleştirilmemiştir.

Çalışmamızda, BT minör tanısı konulmuş çocuklarda olası genotoksisite riskini araştırdık. BT minör çocukların sağlıklı kardeşleri ve benzer sosyoekonomik çevreden diğer sağlıklı çocuklar ile kontrol grubu oluşturularak yaşam koşullarına ilişkin karıştırıcı faktörler ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır. Popülasyon büyüklüğü doğru bir karşılaştırma yapılabilmesini sağlayacak şekilde düzenlenmiş her iki grupta da 70'in üzerinde çocuk yer almıştır. Seçtiğimiz genotoksisite yöntemi, sitokinezin durdurulduğu mikroçekirdek (SD-MÇ) yöntemidir. Mikroçekirdek sıklığı ile birlikte nükleer tomurcuk (NT) ve nükleoplazmik köprü (NPK) parametrelerinin de değerlendirilmesine olanak sağlaması nedeniyle yöntemimiz mikroçekirdek sitom yöntemi olarak da adlandırılmaktadır (Fenech ve Thomas, 2011). Bu yöntem insan ve memeli hücrelerinde genotoksisite ve sitotoksisiteyi ölçmek için en sık kullanılan sitogenetik testlerden birisidir ve kanseri öngördüğü kanıtlanmıştır (Bonassi 2007). Dolayısıyla, geçerlenmiş, etkin bir genotoksisite yöntemi araştırmamızda kullanıldığı için elde ettiğimiz bulguların oldukça değerli olduğunu ve dünya literatürüne önemli bir katkı vereceğini söylemek mümkündür. Ayrıca, BT minör yetişkin veya çocuklarda SD-MÇ yönteminin kullanıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız BT minör bireylerde genotoksisitenin araştırıldığı ve SD-MÇ yönteminin kullanıldığı literatürdeki ilk çalışmadır. SD-MÇ yöntemine ait mikroskopik değerlendirmelerde toplam 153 000 hücre değerlendirilmiş, MÇ sayısının yanı sıra NT ve NPK sıklıkları belirlenerek, NBI hesaplanarak sitom analizi gerçekleştirilmiştir. Genel anlamda beta talasemi taşıyıcılığının çocukluk çağında genotoksisite riski ile ilişkilendirilemediğini söylemek mümkündür. Biyokimyasal parametreler de bu bulguyu destekler yöndedir.

Çalışmamızı az sayıdaki genotoksisite çalışması arasındaki yerini belirlemek, bilimsel literatüre katkısını ortaya koymak için popülasyon büyüklüğü, yaş, araştırma tasarımı, cinsiyet, değerlendirmede kullanılan yöntemler, alınan biyolojik örnekler, kullanılan destekleyici biyokimyasal parametreler, avantajlar ve dezavantajlar aşağıda değerlendirilmiştir.

Araştırmamızda toplumun en duyarlı kesimlerinden olan **çocuklar** ele alınmıştır. Çocuklardan elde edilecek veriler, olası genotoksik etkinin erken bulgulanmasını sağlayacak, bu bireylerin yaşam tarzlarında gerekli düzenlemelerin yapılmasına, klinikte yeni düzenlemeler ile koruyucu önlemler alınmasına ve kanser gelişme riskinin en alt düzeyde tutulabilmesine olanak sağlayabilecektir. Ayrıca çalışmamızda **popülasyon büyüklüğü** doğru istatistiksel analizi sağlayabilecek büyüklükte belirlenmiştir. Toplam 153 çocukta değerlendirme yapılmıştır. BT minörlü bireyleri içeren çalışmaların hepsinde yetişkinler yer almıştır (Çizelge 5.1) (Cote ve Papadakou-Lagoyanni, 1979; Silva, Manzato ve Varella-Garcia, 1992; Al-Sweedan, Khabour ve Isam, 2012). BT minör popülasyonlarının ele alındığı bu üç çalışmanın hiçbirinde yalnızca BT minör bireyler ele alınmamıştır. Değerlendirilen BT minör bireylerin üç çalışmadaki toplam sayısı 26'dır ve çalışma başına 3 ile 18 arasında birey dahil edilmiştir. Kontrol grupları da 5 ile 18 arası birey içermektedir (Çizelge 5.1). Ayrıca, çalışmalardaki bireyler yaş dağılımı bakımından kendi içinde dahi homojenlik göstermemekte, aynı çalışma içinde yetişkinlerin de çocukların da bir arada incelendiği görülmektedir. Cote ve Papadakou-Lagoyanni (1979)'nin çalışmasında 3 talasemi minör, 8 sağlıklı birey değerlendirilmiştir. Çalışmaya dâhil edilen bireylerin yaşları 6 ay ile 31 yaş arasındadır; yaş dağılımlarının çok geniş aralık gösterdiği görülmektedir. Silva ve diğerlerinin (1992) araştırmasında, 5 talasemi minör birey ve 5 sağlıklı birey ile çalışma yapılmıştır. Minör gruptaki bireylerin yaş aralığı 16-26, kontrol grubundaki bireylerin yaş aralığı ise 18-28'dir. Al-Sweedan ve diğerleri (2012) tarafından yapılan çalışmaya ise 18 talasemi minör, 18 sağlıklı birey dâhil edilmiştir. Çalışmaya katılan tüm bireylerin yetişkin erkekler olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda 79 talasemi minör çocuk ve 74 sağlıklı çocuk araştırmaya dahil edilmiştir. Bu katılımcılar, 2-11 yaş aralığında olup yaş ortalaması BT minör çocuklarda 6, sağlıklı çocuklarda 7'dir. Yaş ortalamaları birbirine çok yakın olmasına rağmen istatistiksel anlamlı farklılık bulunması, sonuçların yaşın etkisini ortadan kaldıracak şekilde istatistiksel işlemler yapılması ile yeniden değerlendirilmesine neden olmuştur. Görülmüştür ki, yaş için bulunan kesim noktasının (7 yaş) üstünde ve altında da gruplar karşılaştırıldığında genotoksisite ve sitotoksisite ile ilgili elde edilen veriler değişmemiştir. Ancak, 7 yaş ve altı gruplarda, MÇ parametresi gibi genotoksisite göstergesi olarak önerilen NT parametresinin BT minör çocuklarda sağlıklı çocuklara göre sınırda bir istatistiksel anlamlılık göstermiş olması önemlidir. NT parametresinin daha sonraki çalışmalarda önerilmesi açısından da bu bulgu göz önünde bulundurulmalıdır. Seçtiğimiz çocuk popülasyonu için cinsiyet karıştırıcı bir faktör değildir. Çocuklar, hormonal

farklılıkların henüz ortaya çıkmadığı yaşlardadır. Aynı zamanda kız erkek dağılımı gruplarda benzerdir. Popülasyon büyüklüğü, yaş ve cinsiyet açısından çalışmamızın doğru tasarlandığı gözlenmektedir.

Genotoksisitenin araştırıldığı moleküler epidemiyoloji çalışmalarında, yaş, cinsiyet gibi demografik özelliklerin yanı sıra yaşam koşulları ile ilgili olan sosyoekonomik durum, meslek, sigara içimi, alkol kullanımı karıştırıcı faktörler arasında sayılmaktadır (Kamangar, 2012). Araştırmamızdaki çocuklar beden kitle indeksi, X-ışını maruziyeti, viral enfeksiyonlar, vitamin kullanımı, aşı uygulaması, aktivite süresi bakımından karşılaştırıldığında BT minör çocuklar ile sağlıklı çocuklar uyumlu bulunmuştur.

Yaşam koşullarına gelince; mesleksel maruziyetlerin, alkol kullanımının, sigara içiminin olmaması çocuklarla çalışmanın avantajıdır. Araştırmamızda, pasif sigara içiciliği sorgulanmış, BT minör çocuklar ile sağlıklı çocuklar arasında fark bulunmamıştır.

Karıştırıcı faktör olabileceği düşünülen parametreler bizim çalışmamızda değerlendirmeye alınmıştır; talasemi minör bireyler ile yapılan mevcut genotoksisite çalışmalarında bu parametrelerin bazıları değerlendirmeye alınmış, bazıları alınmamıştır. Cote ve Papadaku-Lagoyanni (1979)'nin çalışmasında bireyler son altı ay içindeki X-ışını, aşı ve viral enfeksiyon maruziyeti açısından değerlendirilmiş; maruziyeti olmayan bireyler çalışmaya dahil edilmiştir. Al-Sweedan ve diğerleri (2012) tarafından yapılan çalışmaya dâhil edilen bireyler sigara içme ve alkol alışkanlıkları, vitamin ve demir desteği alma durumları, diğer tıbbi tedaviler ve hastalıklar bakımından değerlendirilmiş ve bu ölçütler bakımından birbirleriyle uyumlu bireyler çalışmaya dâhil edilmiştir. Silva ve diğerlerinin (1992) araştırmasında ise çalışmaya dâhil edilenlerin demografik özelliklerinden ve dışlama ölçütlerinden bahsedilmemiştir.

Karıştırıcı faktörlerin devre dışı bırakıldığı ve doğru tasarlandığı gösterilen çalışmamızın kullanılan genotoksisite yöntemi ve sonuçları ile ilgili değerlendirmeye geçtiğimizde, kullandığımız SD-MÇ Yöntemi'ne ait genotoksisite ve sitotoksisite parametrelerinin (MÇ sıklığı, MÇ'li hücre sıklığı, NT sıklığı, NPK sıklığı, NBİ) sıklıklarının BT minör çocuklarda daha yüksek olmasına karşın, BT minör çocuklar ile sağlıklı çocuklar arasında istatistiksel fark göstermediği ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla, özellikle çocukluk çağında BT minör olmak genotoksisite için bir risk faktörü olarak gözlenmemektedir. Çalışmamızda

bütün grup için mikroçekirdek sıklığına yönelik ayırıcı bir kesim noktası araştırılmış ve bulunan değerin (7,5) üzerindeki mikroçekirdek sıklıklarına sahip BT minör çocukların anlamlı olarak sağlıklı çocuklardan fazla olduğu saptanmıştır. Bu bulgu önemlidir. Böyle bir bulguya erişebilmek, çalışma popülasyonunun yeterliliği, doğu istatistiksel yaklaşımların kullanılmasının sonucunda elde edilmiştir. Her ne kadar gruplar arası farklılık belirgin değilse de, SD-MÇ yönteminin en önemli parametresi olan MÇ sıklığının bireysel düzeylerinden elde edilen kesim noktası ile ilgili sonuç yol gösterici olacaktır. Ayrıca BT minör olmanın, kesim noktası üzerinde MÇ sıklığına sahip olmada anlamlı etkiye sahip olduğu ortaya konulmuştur.

BT minör bireylere ait genotoksisite yöntemleri ve elde edilen sonuçları aşağıdaki gibi özetleyebiliriz:

Cote ve Papadakou-Lagoyanni (1979)'nin yaptığı çalışmada, 6 talasemi majör, 3 talasemi minör ve 8 sağlıklı bireyden oluşan popülasyonda kromozomal aberasyon (KA) yöntemi ile kromozomal hasar araştırılmıştır. Talasemi majör hastalarda talasemi minör ve kontrol grubuna göre kromozomal hasarda anlamlı artış saptanmıştır. Talasemi minör bireylerde kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir artış tespit edilmiştir. Bireyler folik asit alımı bakımından değerlendirilmiş, folik asit alımının kromozom hasar insidansını etkilemediği saptanmıştır (Cote ve Papadakou-Lagoyanni, 1979). Talasemi majör hastalardaki folat eksikliğinin SCE üzerine etkisinin incelendiği, Silva ve diğerleri (1992) tarafından yapılan çalışmada, 5 talasemi majör hasta, 5 talasemi minör birey ve 5 sağlıklı birey ile çalışma yapılmıştır. Folat eksikliği tespit edilen talasemi majör hastalardaki SCE oranlarında anlamlı artış bulunmuştur (Silva, Manzato ve Varella-Garcia, 1992). Al-Sweedan ve diğerleri'nin çalışmasında (2012) 18 talasemi minör, 7 talasemi majör ve 18 sağlıklı yetişkin erkekte çalışılmış; yapılan çalışmada kromozom hasarı ve SCE oranının majör hastalarda, kontrol ve BT minör bireylere göre anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuş; BT minör bireylerde kontrol grubuna göre SCE oranında anlamlı artış tespit edilmiştir, talasemi minör ile kan lenfosit hücrelerinde genotoksisitenin ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Al-Sweedan ve diğerleri, 2012). Talasemi minör ve majör bireylerde yapılan tüm bu çalışmalarda farklı yaş grupları farklı yöntemlerle genotoksisite bakımından değerlendirilmiş; genotoksisitenin talasemililerde daha yüksek olduğu, anlamlı artışın büyük ölçüde talasemi majör hastalarında olmakla birlikte minör bireylerde de genotoksisiteye işaret eden bulguların varlığı saptanmıştır.

Araştırmamızda, tam kan sayımı, vücut demir göstergeleri (demir düzeyi, demir bağlama kapasitesi ve ferritin düzeyi), B12, folat, CRP ve antioksidan savunma mekanizmasının göstergelerinden Vitamin C ve Vitamin E düzeyleri de incelenmiştir.

Güçlü antioksidan etkinliği olan ve talasemili bireylerde sağlıklı bireylere göre daha düşük seviyelerde bulunduğu saptanan (Tesoriere ve diğerleri 1998; Livrea ve diğerleri, 1996) Vitamin E ve C düzeylerinin BT minör çocuklarda sağlıklı çocuklara göre farklı olmadığı tespit edilmiştir. Talasemi intermedia ve majör hastalarında genotoksisite riskindeki artıştan sorumlu olduğu öne sürülen demir ve demir ile ilgili diğer parametrelerin (Esposito ve diğerleri, 2003; Ferro ve diğerleri, 2012) araştırmamızda gruplar arasında anlamlı fark göstermediği saptanmıştır. Bu sonuçlar ile genotoksisite bulgularımız paralellik göstermektedir. Özellikle oksidatif stresle ilgili olabilecek vitamin düzeyleri ve demir ile ilgili demir, demir bağlama kapasitesi ve ferritin düzeylerinin sağlıklı çocuklarla benzer olması, oksidatif stres kaynaklı genotoksisite riskinin de benzer olmasını açıklar yöndedir.

Enfeksiyon ve inflamasyon göstergesi olan lökosit ve trombosit seviyelerinin talasemi minör bireylerde değişmediği araştırmamızda saptanmıştır. DNA hasarı oluşumunda etkili olduğu bilinen oksidatif stresin enfeksiyon ve inflamasyon ile arttığı bilinmektedir (Cooke, Evans, Dizdaroglu ve Lunec, 2003). Dolayısıyla enfeksiyon ve inflamasyonun neden olabileceği genotoksik etkinin söz konusu olmadığı söylenebilir.

Antioksidan olduğu bilinen (Ames, 1999) ve talasemili bireylerdeki düzeyi sağlıklı bireylere göre düşük olarak belirlenen folat düzeyinin çalışmamızda gruplar arasında anlamlı fark göstermediği bulunmuştur. BT minör bireylerle yapılan mevcut çalışmalarda da minör bireylerde folat düzeyleri bakımından anlamlı fark bulunamamıştır (Cote ve Papadakou-Lagoyanni, 1979); bizim bulgularımız da bu çalışmalarla paralellik göstermektedir.

Çalışma ve kontrol grupları arasında anlamlı farklılık eritrosit parametreleri (RBC, MCV, MCH, MCHC, RDW) ve hemoglobin elektroforez sonuçlarında (HbA0, HbA2, HbF) saptanmıştır. Bu parametreler BT minör tanısı için kullanıldığı için beklenen bir sonuçtur. Çalışmamız genotoksisite ve sitotoksisite değerlendirmesi beraberinde tam kan sayımı, vücut demir göstergeleri (demir düzeyi, demir bağlama kapasitesi ve ferritin düzeyi), hemoglobin elektroforezi ve çeşitli biyokimyasal parametrelerin (B12, folat, CRP) de araştırıldığı ilk çalışma olmuştur. Talasemi minör bireylerde yapılan mevcut çalışmalarda,

genotoksisite değerlendirmesi sırasında biyokimyasal parametreler araştırılmamıştır. SD-MÇ genotoksisite ve sitotoksisite parametreleri ile BT minör olanlarda sağlıklılaraya göre anlamlı farklılık gösteren hematolojik verilerin gösterdiği anlamlı ilişkiler ise ileriki çalışmalarda da incelenebilecek verilerdir.

Araştırmamız bir ilk niteliğindedir ve bilimsel literatür için de güçlü bir kaynak oluşturacaktır. Çalışma popülasyonumuzun da içinde bulunduğu daha geniş bir popülasyonda DNA hasarının COMET yöntemi ile araştırılması da içinde bulunduğumuz araştırma grubu tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada da gruplar arası fark bulunmamıştır (Menderes, 2016). Farklı iki genotoksisite yöntemi ile benzer sonuçlara ulaşılmış, BT minör çocuklar için değerli veriler üretilmiştir. Sonuç olarak, çalışmamızda aynı yaşlardaki ve benzer demografik özelliklerdeki BT minör çocuklar, genotoksisite riski ve biyokimyasal veriler açısından benzerdir. Popülasyon büyüklüğünün yeterli olduğu koşullarda yapılabilen ileri analizler ile önemli bir genotoksisite göstergesi olan MÇ sıklığının bireysel düzeyleri incelendiğinde MÇ sıklığının yüksek değerlerinin BT minör çocuklarda sağlıklı çocuklara oranla daha fazla olduğu saptanmıştır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Ülkemizde sıklığı yüksek olan beta talasemi taşıyıcılığı ile ilgili dünya bilimsel literatüründe genotoksisite verileri yeterince bilgi verici değildir. Araştırmamızda beta talasemi taşıyıcısı 70'in üzerinde çocuğu ele alarak bahsedilen boşluğu doğru tasarlanmış bir araştırma ile doldurmak yönünde çaba harcanmıştır. Seçilen popülasyon ve kullanılan yöntem açısından ilk çalışmadır.

BT minör tanısı konulmuş çocuklarda olası genotoksisite riskinin araştırıldığı çalışmamızın en önemli avantajları ve sonuçları aşağıdaki gibi özetlenebilir;

- Yalnızca BT minör çocuklarda uygun popülasyon büyüklüğü sağlanarak genotoksisite araştırılmıştır.
- Çocuklarla çalışmak yoluyla yetişkinlerin olası demografik ve yaşam koşullarından kaynaklanan karıştırıcı faktörler ortadan kaldırılmıştır.
- Olanak olduğu ölçüde sağlıklı kardeşlerin de kontrol grubunda bulundurulması ile beta talasemi taşıyıcılığı dışındaki demografik ve yaşam koşulu farklılıklarının olmadığı bir popülasyon elde edilmiştir.
- Kullanılan genotoksisite yöntemi kanseri öngördüğü kanıtlanmış SD-MÇ yöntemidir. Ayrıca sitotoksisiteye ait parametreler de incelenerek 'sitom' yöntemi niteliği kazanmıştır.
- 153 000 hücre incelenerek önemli bir veri kaynağı elde edilmiştir.
- Genotoksisite ve sitotoksisite parametreleri ve eşlik eden oksidatif stres ile ilişkilendirilebilecek biyokimyasal parametrelerin beta talasemi taşıyıcısı çocuklarda ve sağlıklı çocuklarda benzer olmasına dayanarak, beta talasemi taşıyıcılığının çocukluk çağında genotoksisite riski ile ilişkilendirilemediğini söylemek mümkündür.
- Beta talasemi taşıyıcısı olmanın, daha yüksek bireysel mikroçekirdek sıklığına sahip olmayı üç kat daha fazla etkilediği bulgusu da araştırmamızın önemli bulgusudur.

Araştırmamız yaşamın başındaki beta talasemi taşıyıcısı çocukların genotoksisite riskinin sağlıklı olan çocuklardan farklı olmadığı sonucunu bilimsel literatüre kazandıracak düzeyde ilk bilgileri üretmiştir. Yaşamın ilerleyen dönemlerinde risk faktörlerinin artması

ile olası riskin artıp artmayacağı konusu ise araştırmamızın önerdiği araştırma konusu olarak karşımızda durmaktadır.



KAYNAKLAR

- Aardema, M. J. and Kirsch-Volders, M. (2001). The in vitro micronucleus assay. *Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment*, 163-186.
- Al-Sweedan, S. A., Khabour, O. and Isam, R. (2012). Genotoxicity assessment in patients with thalassemia minor. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 744(2), 167-171.
- Ames, B. N. (1999). Micronutrient deficiencies: A major cause of DNA damage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 889(1), 87-106.
- Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 543(3), 251-272.
- Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C. and Fenech, M. (2011). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis*, 26(1), 93-100.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M. P., Bolognesi, C., Cebulka-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M. R., Zijno, A., Norppa, H. and Fenech, M. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28(3), 625-631.
- Borgna-Pignatti, C., Vergine, G., Lombardo, T., Cappellini, M. D., Cianciulli, P., Maggio, A., Renda, D., Lai, M. E., Mandas, A., Forni, G., Bisconte, M. G. and Piga, A. (2004). Hepatocellular carcinoma in the thalassaemia syndromes. *British Journal of Haematology*, 124(1), 114-117.
- Brendler-Schwaab, S., Hartmann, A., Pfuhler, S., & Speit, G. (2005). The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*, 20(4), 245-254.
- Burgaz, S., Coskun, E., Demircigil, G. C., Kocabas, N. A., Cetindag, F., Sunter, O. and Edinsel, H. (2011). Micronucleus frequencies in lymphocytes and buccal epithelial cells from patients having head and neck cancer and their first-degree relatives. *Mutagenesis*, 26(2), 351-356.
- Canatan, D. (2014). Thalassemiyas and Hemoglobinopatiler in Turkey. *Hemoglobin*, 38(5), 305-307.
- Canatan, D. ve Aydınok, Y. (2007). *Talasemi ve hemoglobinopatiler tanı ve tedavi kitabı*. Talasemi Federasyonu, Antalya.
- Canatan, D., Kose M. R., Üstündağ, M., Haznedaroğlu, D. and Özbaş S. (2006). Hemoglobinopathy control program in Turkey. *Community genetics*. 9(2), 124-6.

- Cao, A. and Galanello, R. (2010). Beta-thalassemia. *Genetics in Medicine*, 12(2), 61-76.
- Cappellini, M. D., Cohen, A., Eleftheriou, A., Piga, A., Porter, J. and Taher, A. (2008). *Guidelines for the clinical management of thalassaemia*. Thalassaemia International Federation, Nicosia (CY): 14-27.
- Castaldi, G., Bagni, B., Trotta, F., Menegale, G., Cavallini, A. R. and Piffanelli, A. (1983). Folic Acid Deficiency in β -Thalassaemia Heterozygotes. *Scandinavian Journal of Haematology*, 30(2), 125-129.
- Çavdar, A. O. and Arcasoy, A. (1971). The incidence of β -thalassemia and abnormal hemoglobins in Turkey. *Acta Haematologica*, 45(5), 312-318.
- Choy, W. N. (2001). *Genetic toxicology and cancer risk assessment*. CRC Press, New York: 29-187.
- Collins, A. R., Dusinska, M., Gedik, C. M. and Stetina, R. (1996). Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker?. *Environmental Health Perspectives*, 104(3), 465.
- Comporti, M., Signorini, C., Buonocore, G. and Ciccoli, L. (2002). Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(7), 568-576.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu, M. and Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal*, 17(10), 1195-1214.
- Cooley T. B. and Lee, O. P., (1925). Series of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone changes. *Transactions of the American Pediatric Society*. 37, 29-30.
- Cote, G. B. and Papadakou-Lagoyanni, S. (1979). Beta-thalassaemia: increased chromosomal anomalies in lymphocyte cultures. *Journal of Medical Genetics*, 16(1), 52-55.
- Cote, G. B., Sarri, C., Papadakou-Lagoyanni, S., Mengreli, C., Karagiorga-Lagana, M. and Pantelakis, S. (1982). Increased rate of sister chromatid exchanges in β -thalassaemia. *Blut*, 44(6), 349-353.
- DeMarini, D. M. (2013). Genotoxicity biomarkers associated with exposure to traffic and near-road atmospheres: a review. *Mutagenesis*, 28(5), 485-505.
- Demircigil, G. C., Aykanat, B., Fidan, K., Gulleroglu, K., Bayrakci, U. S., Sepici, A., Buyukkaragoz, B., Karakayali, H., Haberal, M., Baskin, E., Buyan, N. and Burgaz, S. (2011). Micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes of children with chronic kidney disease. *Mutagenesis*, 26(5), 643-650.
- Demircigil, G. C., Emerce, E., & Ulutaş, O. K. (2009). Genotoxicity tests from biomarker studies to the regulations: national perspective. *FABAD Journal of Pharmaceutical Science*, 34(4), 193-198.

- Demirel, S. ve Zamani, A. G. (2002). Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi*, 12(3), 123-127.
- Dhawan, V., Kumar, K. R., Marwaha, R. K. and Ganguly, N. K. (2005). Antioxidant status in children with homozygous thalassemia. *Indian Pediatrics*, 42(11), 1141-45.
- Dissayabutra, T., Tosukhowong, P. and Seksan, P. (2005). The benefits of vitamin C and vitamin E in children with beta-thalassemia with high oxidative stress. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 88(4), 317-321.
- Dusinska, M. and Collins, A. R. (2008). The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis*, 23(3), 191-205.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.
- Esposito, B. P., Breuer, W., Sirankapracha, P., Pootrakul, P., Hershko, C. and Cabantchik, Z. I. (2003). Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. *Blood*, 102(7), 2670-2677.
- Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environmental Health Perspectives*, 101(3), 101.
- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1), 81-95.
- Fenech, M. (2002). Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discovery Today*, 7(22), 1128-1137.
- Fenech, M. (2006). Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 600(1), 58-66.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084-1104.
- Fenech, M. and Morley, A. A. (1985). Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 147(1-2), 29-36.
- Fenech, M. and Morley, A. A. (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 161(2), 193-198.

- Fenech, M., Bonassi, S., Turner, J., Lando, C., Ceppi, M., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cao, J., Luca, G., Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O. G., Hadjidekova, V. V., Hrelia, P., Jaworska, A., Joksic, G., Krishnaja, A.P., Tung-Kwang, L., Martelli, A., McKay, M. J., Migliore, L., Mirkova, E., Müller, W. U., Odagiri, Y., Orsiere, T., Scarf, M.R., Silva, M. J., Sofuni, T., Surralles, J., Trenta, G., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (2003). Intra-and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes: Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1), 45-64.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D. A., Tucker, J. D. and Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125-132.
- Ferro, E., Visalli, G., Civa, R., La Rosa, M. A., Papa, G. R., Baluce, B., D'Ascola, D. G., Piraino, B., Salpietro, C. and Di Pietro, A. (2012). Oxidative damage and genotoxicity biomarkers in transfused and untransfused thalassemic subjects. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(10), 1829-1837.
- Fibach, E. and Rachmilewitz, E. (2008). The role of oxidative stress in hemolytic anemia. *Current Molecular Medicine*, 8(7), 609-619.
- Galanello, R. and Origa R. (2010). Beta-thalassemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 5-11.
- Ghone, R. A., Kumbar, K. M., Suryakar, A. N., Katkam, R. V. and Joshi, N. G. (2008). Oxidative stress and disturbance in antioxidant balance in beta thalassemia major. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 23(4), 337-340.
- Gonzalez, L., Lison, D., & Kirsch-Volders, M. (2008). Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review. *Nanotoxicology*, 2(4), 252-273.
- Gutteridge, J. M., Rowley, D. A. and Halliwell, B. (1982). Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts. Detection of 'catalytic' iron and anti-oxidant activity in extracellular fluids. *Biochemical Journal*, 206(3), 605-609.
- Haidar, R., Mhaidli, H., and Taher, A. T. (2010). Paraspinal extramedullary hematopoiesis in patients with thalassemia intermedia. *European Spine Journal*, 19(6), 871-878.
- Halliwell, B. (1991). Drug antioxidant effects. *Drugs*, 42(4), 569-605.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine* (Fifth edition). Oxford University Press, USA: 30-76.
- Herbert, L. Muncie, J. R. and Campbell, J. S. (2009). Alpha and Beta Thalassemia. *American Academy of Family Physicians*. 80(4), 339-344, 371.

Internet. The Journal of Clinical Investigation. Web: <http://www.jci.org/articles/view/30920> adresinden 24 Mayıs 2016'da alınmıştır.

Internet. The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Guidelines for Testing of Chemicals Section 4: Health Effects, Test No:474, Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. (2014). Web: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9714541e.pdf?expires=1466249860&id=id&accname=guest&checksum=611AE8015B582403EC56050AA3E17A08> adresinden 10 Haziran 2016'da alınmıştır.

Internet. The Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) Guidelines for Testing of Chemicals Section 4: Health Effects, Test No:487, In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. (2014). Web: <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9714561e.pdf?expires=1466206437&id=id&accname=guest&checksum=872358BBCF53AB9EC30F5C2B54DB276B> adresinden 10 Haziran 2016'da alınmıştır.

Jena, G. B., Kaul, C. L. and Ramarao, P. (2002). Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ICH guidelines. *Indian Journal of Pharmacology*, 34(2), 86-99.

Jha, R. and Jha, S. (2014). Beta thalassemia - a review. *Journal of Pathology of Nepal*. 4, 663-671.

Kamangar, F. (2012). Confounding variables in epidemiologic studies: basics and beyond. *Archives of Iranian medicine*, 15(8), 508.

Karakaş, Z. (2014), Alfa talasemi. *Hematolog*, 4(1), 117-133.

Kassab-Chekir, A., Laradi, S., Ferchichi, S., Khelil, A. H., Feki, M., Amri, F., et al. (2003). Oxidant, antioxidant status and metabolic data in patients with beta-thalassemia. *Clinica Chimica Acta*, 338(1), 79-86.

Kassie, F., Parzefall, W. and Knasmüller, S. (2000). Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 463(1), 13-31.

Kew, M. C. (2009). Hepatic iron overload and hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*, 286(1), 38-43.

Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E. and Van Hummelen, P. (1997). The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 392(1), 19-30.

Lieberman, M. and Marks, A. D. (2009). *Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach*. Lippincott Williams & Wilkins, 439-457.

- Lindahl, T. (1990). Repair of intrinsic DNA lesions. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 238(3), 305-311.
- Livingston, G. K., Khvostunov, I. K., Gregoire, E., Barquinero, J. F., Shi, L. and Tashiro, S. (2016). Cytogenetic effects of radioiodine therapy: a 20-year follow-up study. *Radiation and Environmental Biophysics*, 55(2), 203-213.
- Livrea, M. A., Tesoriere, L., Pintaudi, A. M., Calabrese, A., Maggio, A., Freisleben, H. J., D'Arpa, D., D'Anna, R. ve Bongiorno, A. (1996). Oxidative stress and antioxidant status in beta-thalassemia major: iron overload and depletion of lipid-soluble antioxidants. *Blood*, 88(9), 3608-3614.
- Marengo-Rowe, A. J. (2006). Structure-function relations of human hemoglobins. In *Baylor University Medical Center. Proceedings*. Baylor University Medical Center, 19(3), 239-245.
- Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F. and Heddle, J. A. (1990). The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 239(1), 29-80.
- McKelvey-Martin, V. J., Green, M. H. L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B. L., De Meo, M. P. and Collins, A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 288(1), 47-63.
- Menderes, D. (2016). *Talasemi Taşıyıcısı Çocuklarda Periferik Kandaki Lenfositlerde Comet Yöntemiyle Genotoksisitenin Araştırılması*, Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, 6-13.
- Migliore, L., Coppede, F., Fenech, M. and Thomas, P. (2011). Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases. *Mutagenesis*, 26(1), 85-92.
- Modell, B. and Darlison, M. (2008). Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bulletin of the World Health Organization*, 86(6), 480-487.
- Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I. L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Sram, R.J., Knudsen, L.E., Barale, R. and Fucic, A. (2006). Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 600(1), 37-45.
- Offer, T. A. L., Bhagat, A., Lal, A., Atamna, W., Singer, S. T., Vichinsky, E. P., Kuypers, F.A. and Ames, B. N. (2005). Measuring chromosome breaks in patients with thalassemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1054(1), 439-444.
- Olivieri, M. D. (1999). The beta-thalassemias. *Medical Progress*. 341(2), 99-109.

- Onur, E., Tuğrul, B. ve Bozyiğit, F. (2009). DNA Damage and Repair Mechanisms. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 7, 61-70.
- Perisano, C., Marzetti E., Spinelli, M. S., Calla M., Graci, C. A. and Maccauro, G. (2012). Physiopathology of Bone Modifications in β -Thalassemia. *Anemia*, 320737.
- Piel, F. B. and Weatherall, D. J. (2014). The α -thalassemias. *New England Journal of Medicine*, 371(20), 1908-1916.
- Roos, W. P. and Kaina, B. (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in Molecular Medicine*, 12(9), 440-450.
- Rothfuss, A., Schütz, P., Bochum, S., Volm, T., Eberhardt, E., Kreienberg, R., Walther V. and Speit, G. (2000). Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. *Cancer Research*, 60(2), 390-394.
- Samanta, S. and Dey, P. (2012). Micronucleus and its applications. *Diagnostic Cytopathology*, 40(1), 84-90.
- Şekeroğlu, Z. A. ve Şekeroğlu, V. (2011). Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 4(3), 221-229.
- Semenza, G. L. (2009). Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis. *Blood*, 114(10), 2015-2019.
- Silva, A. E., Manzato, A. J. and Varella-Garcia, M. (1992). Sister-chromatid exchanges in β -thalassaemic patients under conditions of in vivo and in vitro depletion of folic acid. *Mutation Research Letters*, 282(3), 213-217.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184-191.
- Tesoriere, L., D'Arpa, D., Maggio, A., Giaccone, V., Pedone, E. and Livrea, M. A. (1998). Oxidation resistance of LDL is correlated with vitamin E status in β -thalassemia intermedia. *Atherosclerosis*, 137(2), 429-435.
- Thomas, P. and Fenech, M. (2011). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay in lymphocytes. *DNA Damage Detection In Situ, Ex Vivo, and In Vivo: Methods and Protocols*, 217-234.
- Türk Hematoloji Derneği. (2011). *Eritrosit Hastalıkları ve Hemoglobin Bozuklukları Tanı ve Tedavi Kılavuzu*. Ankara: 81-97.
- Tüzmen S. And Schechter A.N. (2001). Genetic diseases of hemoglobin: diagnostic methods for elucidating b-thalassemia mutations. *Blood Reviews*, 15, 19-29.

- Tyan, P. I., Radwan, A. H., Eid, A., Haddad, A. G., Wehbe, D. and Taher, A. T. (2014). Novel approach to reactive oxygen species in nontransfusion-dependent thalassemia. *BioMed Research International*, 2014.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M. and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84.
- Voskou, S., Aslan, M., Fanis, P., Phylactides, M. and Kleanthous, M. (2015). Oxidative stress in β -thalassaemia and sickle cell disease. *Redox Biology*, 6, 226-239.
- Waseem, F., Khemomal, K. A. and Sajid, R. (2011). Antioxidant status in beta thalassemia major: a single-center study. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 54(4), 761.
- Weatherall, D. (2011). The inherited disorders of haemoglobin: an increasingly neglected global health burden. *Indian Journal of Medical Research*, 134(4), 493–497.
- Weatherall, D., Akinyanju, O., Fucharoen S., Olivieri, N. and Musgrove P. (2006). *Disease Control Priorities in Developing Countries* (Second edition). Ch. 34. Washington DC: World Bank, 663-680.
- Whipple, G. H. and Bradford, W. L. (1936). Mediterranean disease-thalassemia (erythroblastic anemia of Cooley): associated pigment abnormalities simulating hemochromatosis. *Journal of Pediatrics*, 9, 279-311.
- Wilson, D. M. and Thompson, L. H. (2007). Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 616(1), 11-23.
- Zhang, X., Xiao, X., Duan, H., Gao, F., Li, Y., Niu, Y., Gao, W., Wang, H., Yu, S. and Zheng, Y. (2016). Cytotoxicity of diesel engine exhaust among the Chinese occupational population: a complement of cytokinesis-block micronucleus cytome. *Inhalation Toxicology*, 28(6), 274-280.



EKLER

EK-1. Etik kurul onayı

GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara
	TELEFON	0312 202 69 58
	FAKS	0312 202 46 73
	E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Talasemi Taşıyıcılarında Periferik Kandaki Lenfositlerde Genotoksitenin Araştırılması			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Deniz ASLAN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI /UZMANLIK ALANI/ BULUNDUĞU MERKEZ	Çocuk Sağlığı ve Hast. AD. / G.Ü.T.F.			
	DESTEKLEYİCİ (Varsa)				
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Kan, idrar, doku, radyolojik görüntü gibi biyokimya,mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji kolleksiyon materyalleriyle veya rutin muayene tetkik tahlil ve tedavi işlemleri sırasında (önceden) elde edilmiş materyallerle yapılacak araştırmalar-Uzmanlık Tezi			
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Ver.No	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	28.02.2014	0.1	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU	28.02.2014	0.1	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı				Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>			
	BIYOLOJİK MATERYAL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>			
	DİĞER	<input type="checkbox"/>			

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 162	Toplantı tarihi: 24.03.2014
	<p>Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve "bütçesi dışında" uygun bulunmuş olup araştırmanın dosyasında belirtilen merkez/merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına G.Ü.Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.</p> <p>Etik Kurulun kararı, projenin bütçesi BAP tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, BAP kararının Kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.</p>	

GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU									
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik (13.04.2013), İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof.Dr.Canan ULUOĞLU							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Canan ULUOĞLU BAŞKAN	Tıbbi Farmakoloji A.D	G.Ü.T.F	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzm.Dr.Cemal GÜVERCİN BAŞKAN YARDI	Tıp Etiği	Y.mah. Prof.Dr. Yunus Muftu AÇS/AP Merk.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Gonca AKBULUT RAPORTÖR	Fizyoloji A.D	G.Ü.T.F	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Prof.Dr.Bülent BOYACI ÖYE	Kardiyoloji A.D	G.Ü.T.F	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

EK-1 (devam). Etik kurul onayı

Prof.Dr.Sefer AYCAN ÜYE	Halk Sağlığı A.D	G.Ü.T.F	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Mehmet Akif ÖZTÜRK ÜYE	İç Hastalıklar A.D	G.Ü.T.F	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Elvan İŞERİ ÜYE	Çocuk Psikiyatrisi A.D	G.Ü.T.F	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Arzu BAKIRTAŞ ÜYE	Çocuk Sağlığı ve Hast.A.D	G.Ü.T.F	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Prof.Dr.Nüfûr TURAN DURAL ÜYE	Farmakoloji A.D	G.Ü.E.F	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Doç.Dr.Hakan KAYIR ÜYE	Tıbbi Farmakoloji A.D	G.A.T.A	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Doç.Dr.Mustafa ARSLAN ÜYE	Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D	G.Ü.T.F	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Doç.Dr.Murat AKIN ÜYE	Genel Cerrahi A.D	G.Ü.T.F	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Doç.Dr.Sercan AKSOY ÜYE	İç Hastalıklar A.D.	H.Ü.T.F	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>
Av.Arzu BUZKIRAN KAYA ÜYE	Avukat	G.Ü.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Emine ŞEKER ÜYE	Sivil Temsilci	-	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	<i>[Signature]</i>

* :Araştırma ile İlişki

** :Toplantıda Bulunma

EK-2. Gönüllü beyan formu

GÖNÜLLÜ BEYAN FORMU

..... çocuk hastalarımızın hücrelerindeki hasarları araştırarak bunların ortaya çıkarılmasını amaçlayan çalışmada gönüllü olarak yer alıyorum. Kan örneğimin bu projedeki çalışmalarda kullanılmasını kabul ediyorum.

Ad:

Soyad :

Telefon no:

İmza:

Tarih:



EK-3. Anket formu

ANKET**A) HASTA TARAFINDAN DOLDURULACAK BÖLÜM**

1.Adı Soyadı:

2.Yaş: Kilo: Boy: Doğum yeri:

3.Öğrenim durumu; İlk Orta Lise Yüksekokul

4.Nerede yaşıyorsunuz?

Köy İlçe İl 5.Son bir yılda herhangi bir aşı oldunuz mu? Evet Hayır

Cevabınız evet ise ne aşısı oldunuz?

6.Son 3 ay içinde röntgen çektirdiniz mi?(Diş ve diğer) Hangisi?

7.Doktorunuz tavsiyesi dışında herhangi bir ilaç alıyor musunuz? Evet Hayır

Cevabınız evet ise adı nedir?

Ne kadar süredir?

8. Doktorunuz tavsiyesi dışında vitamin ve mineral takviyesi alıyor musunuz? Evet Hayır

Cevabınız evet ise adı nedir?

Hangi sıklıkta?

9.Sigara içme alışkanlığınız:

Hiç içmedim Eskiden içerdim Ay Yıl önce bıraktımİçiyorum Günde adet sigara içiyorum Ay Yıldır içiyorum10.Yaşadığım ortamda Sigara içiliyor Sigara içilmiyor

EK-3. (devam). Anket formu

11.Çay içme alışkanlığınız var mı? Evet Hayır

Cevabınız EVET ise aşağıdakilerden hangisi ?

Günde 1 bardak 2 bardak 3 ve daha fazla bardak

12.Yaptığınız spor ve aktivitelere ilişkin olarak;

- Az enerji gerektiren spor ya da diğer aktivitelerde bulunuyorum.
(yürüme, bahçe işleri, ev işleri gibi)
_____ saat/gün
- Orta derecede enerji gerektiren spor ya da diğer aktivitelerde bulunuyorum.
(ağır ev işleri ya da bahçe işleri, yüzme, bisiklet sürme gibi)
_____ saat/gün
- Fazla güç ve enerji gerektiren spor ve aktivitelerde bulunuyorum.
(koşu, hızlı yüzme ya da bisiklet sürme, futbol gibi)
_____ saat/gün

B) HEKİM TARAFINDAN DOLDURULACAK BÖLÜM

8.Hasta başka ilaç kullanıyor mu? Evet Hayır

Cevabınız EVET ise nedir?

9.Hasta vitamin ve mineral takviyesi alıyor mu? Evet Hayır

Cevabınız EVET ise aşağıdakilerden hangisi?

Multivitamin C vitamini E vitamini Beta karoten Çinko

Hangi sıklıkta?

10.Hasta son iki yılda herhangi bir viral enfeksiyon geçirdi mi ? (sarılık, kızamık, kızamıkçık, su çiçeği,

kabakulak, menenjit vb gibi)

Cevabınız EVET ise hangi viral enfeksiyonu geçirdi ?

Dr.
.....

Tarih

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ÖZEL BABACANOĞLU, Ezgi
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 03.09.1987 - Ankara
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 05396678650
 Faks : -
 e-mail : ezgiozel87@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji ABD	Devam ediyor
Lisans	Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	10.06.2010
Lise	Özel Arı Fen Lisesi	15.06.2004

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
10.2013-Devam ediyor	MERCK SHARP & DOHME İLAÇLARI LTD.ŞTİ.	Kıdemli Ruhsatlandırma Uzmanı & Resmi İlişkiler Uzmanı
10.2010-10.2013	KEYMEN İLAÇ SAN. VE TİC. A.Ş.	Ruhsatlandırma Uzmanı & Farmakovijilans Yetkilisi
08.2010-10.2010	ANKARA ECZACI ODASI	Danışman Eczacı

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

-

Hobiler

Seyahat etmek ve yüzmek



GAZİ GELECEKTİR..