

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TENOFOVİR'İN MİKRONÜKLEUS
SIKLIĞINA ETKİLERİ VE *APE1*, *XRCC1* VE
XPD DNA TAMİR GENLERİNDEKİ
POLİMORFİZM İLE İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEL LİSANS TEZİ

Selcen KORKMAZ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Şengül YÜKSEL

MALATYA - 2014

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TENOFOVİR'İN MİKRONÜKLEUS
SIKLIĞINA ETKİLERİ VE *APE1*, *XRCC1* VE
XPD DNA TAMİR GENLERİNDEKİ
POLİMORFİZM İLE İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

SELÇEN KORKMAZ

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Şengül YÜKSEL

Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2012/81 proje numarası ile desteklenmiştir.

MALATYA - 2014

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Elif YEŞİLADA

Üye

Prof. Dr. Yasemin ERSOY

Üye, Danışman

Doç. Dr. Şengül YÜKSEL

ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu...../...../2014 tarih ve 2014/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ

Enstitü Müdürü V.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam müddetince pek çok kişinin yardımını aldım. Tezin çalışma verilerinin toplanmasından başlayacak olursak; hastalara ulaşmamızda büyük yardımlarını aldığımız Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Yasemin ERSOY'a, deney sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Saim YOLOĞLU ve Prof. Dr. Taner TATAR'a, bilimsel katkılarından dolayı Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Elif YEŞİLADA'ya ve tez çalışmalarım süresince yardımlarıyla bana destek olan tez danışman hocam Sayın Doç. Dr. Şengül YÜKSEL'e teşekkür ederim.

Tezim boyunca bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen Ayten KILINÇLI, Emine YAŞAR ve Gonca GÜLBAY'a yardımları için teşekkür ederim.

ÖZET

Tenofovir, HBC ve HIV gibi viral enfeksiyonlarda nükleotid ters transkriptaz inhibitörü olarak çalışan adenzin monofosfat analogu bir ilaştır.

Çalışmaya; sağlıklı kişiler (15), ila kullanmamış HBV hastaları (10), 0-6 ay tenofovir kullanmış HBV hastaları (10) ve 12+ ay tenofovir kullanmış HBV hastaları (10) dâhil edildi. Çalışmaya katılan kişilerden sitogenetik analizler için mikronükleus (MN) ve mitotik indeks (MI) frekansları saptandı. Ayrıca DNA tamir genlerinden *APE1* Asp148Glu, *XRCC1* Arg194Trp, *XRCC1* Arg399Gln ve *XPB* Lys751Gln gen polimorfizmleri ile MN ilişkisini belirlemek üzere moleküler analizler yapıldı.

Günlük 245 mg dozda tenofovir kullanımının MI ve MN frekanslarını etkilemediği ancak tüm HBV hasta gruplarında kontrole göre MN ve MI frekansları daha yüksek değerde saptandı. MN'deki bu artış ile *APE1* Asp148Glu, *XRCC1* Arg194Trp, *XRCC1* Arg399Gln ve *XPB* Lys751Gln tamir gen polimorfizmi arasında anlamlı ilişki bulunamadı. HBV ve tenofovirin genotoksitesine ilişkin benzer bir çalışmaya rastlanamamıştır.

Sonuç olarak, çalışma gruplarının küçük olmasına rağmen 245 mg dozda kronik kullanılan tenofovirin genotoksik etkisi olmadığı ancak HBV'nin genotoksite potansiyelinin yüksek olduğunu söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Tenofovir, mitotik indeks (MI), mikronükleus (MN), gen polimorfizmi, genotoksite, HBV.

ABSTRACT

A STUDY OF THE RELATIONSHIP BETWEEN THE EFFECTS OF TENOFOVIR ON THE FREQUENCY OF MICRONUCLEUS AND THE POLYMORPHISMS IN *APE1*, *XRCC1* AND *XPB* DNA REPAIR GENES

The tenofovir is a drug on the order of a nucleotide revers transcriptase inhibitor in viral infections such as HBV and HIV.

This study were carried out the following groups healty volunteers (15), untreated chronic hepatitis B patients (10), the hepatitis B patients who have been treated for 0-6 months and the hepatitis B patients who have been treated for 12+ months.

In this study, mitotic index (MI) and micronucleus (MN) tests were used in every volunteers to determine the possible genotoxic effects of the tenofovir and the relationship with the gene polymorphisms from DNA repair such *APE1* Asp148Glu, *XRCC1* Arg194Trp, *XRCC1* Arg399Gln and *XPB* Lys751Gln were examined.

It has been determined that the tenofovir doesn't have a significant effect on MI and frequency of MN. But it has been observed that MI and MN values in the HBV patient groups were higher than those of healthy group. However there was not any significant relationship between the frequency of MN and genetic polymorphisms such as *APE1* Asp148Glu, *XRCC1* Arg194Trp, *XRCC1* Arg399Gln and *XPB* Lys751Gln. To the best of knowledge, there is not any study on regarding the genotoxicity due to the tenofovir treatment in HBV patients in the literature.

In the final analysis, we suggest that chronic tenofovir administration does not have any genotoxic effect on routin doses. On the other hand, HBV has higher genotoxicity potential itself.

Key Words: Tenofovir, mitotic index (MI), micronucleus (MN), gene polymorpisms, genotoxicity, HBV.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Hepatit B'nin Tarihçesi	4
2.2. Hepatit B Virüsünün Moleküler Biyolojisi	4
2.3. Hepatit B Virüsünün Replikasyonu	6
2.4. Hepatit B Virüsünün Epidemiyolojisi.....	7
2.5. Kronik Hepatit B Tedavisi	9
2.5.1. Nükleozid Analogları	11
2.5.2. Nükleotid Analogları.....	11
2.5.3. Nükleozid ve Nükleotid Analogu İlaçların Yan Etkileri.....	12
2.6. Tenofovir Disoproksil Fumarat	12
2.6.1. Tenofovirin Yan Etkileri	13
2.7. Genetik Toksikite Testlerinin Kullanım Alanları	14
2.7.1. Genetik Toksikite Testleri	14
2.7.1.1. Mitotik İndeks (MI).....	15
2.7.1.2. Mikronükleus (MN)	15
2.7.1.2.1. Mikronükleus Tekniğinin Gelişimi	16
2.7.1.2.2. Mikronükleus Oluşumu	17
2.8. DNA Tamiri ve MN İlişkisi	18
2.9. DNA Tamir Mekanizmaları	19
2.9.1. Doğrudan Onarım Mekanizmaları	19
2.9.1.1. Fotoreaktivasyon Onarımı	19
2.9.1.2. Metil Gruplarının Yok Edilmesi	20

2.9.2. Kesip-Çıkarma ile DNA Onarımı	20
2.9.2.1. Baz Kesip-Çıkarma Onarımı (BER)	21
2.9.2.2. Nükleotid Kesip Çıkartma Onarımı	22
2.9.2.2.1. Global Genom Onarımı	24
2.9.2.2.2. Transkripsiyona Bağlı Onarım (TCR).....	24
2.9.2.3. Yanlış Eşleşme Tamiri (Mismatch Repair, MMR)	24
2.9.3. Rekombinasyonel Onarım (Replikasyon Sonrası Onarım)	25
2.9.3.1. Çift Zincir Kırık Onarımı (DSBR, Double Strand Break Repair)	25
2.9.3.1.1. Homolog Uç Birleşmesi	26
2.9.3.1.2. Homolog Olmayan Uç Birleşmesi	26
2.9.4. SOS Onarımı.....	27
2.10. DNA Onarım Genleri.....	27
2.10.1. <i>APE1</i> (Apürinik/Apiriminik endonükleaz I)	27
2.10.2. <i>XPD</i> (Xeroderma pigmentosum grup D)	28
2.10.3. <i>XRCC1</i> (X-ray repair cross-complementing protein grup 1).....	28
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	30
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları	30
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	30
3.1.1.1. Tenofovir disproksil fumarat	30
3.1.1.2. Kromozom Medyumu	31
3.1.1.3. Hipotonik.....	31
3.1.1.4. Fiksatif.....	31
3.1.1.5. Giemsa.....	32
3.1.1.6. Entellan.....	32
3.1.1.7. DNA İzolasyon Kiti	32
3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları	32
3.1.2.1. Hassas Terazî.....	32
3.1.2.2. Santrifüj	32
3.1.2.3. Mikroskop.....	33
3.1.2.4. İnkübatör.....	33
3.1.2.5. Flow Kabin (Steril Kabin)	33
3.1.2.6. Su Banyosu	33

3.1.2.7. Vorteks	33
3.1.2.8. Isı Bloğu	33
3.2. Çalışma Planı.....	33
3.3. Sitogenetik Analizler	35
3.3.1.Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....	35
3.3.2.Preparatların Boyanması	36
3.3.3.Mikroskopik İnceleme	36
3.3.3.1. MN Sayısının Saptanması	36
3.3.3.2. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması.....	36
3.4. Moleküler Analizler	37
3.4.1.DNA İzolasyonu	37
3.4.2.Gerçek Zamanlı PZR (PCR).....	38
3.5. İstatistiksel Analiz.....	38
4. BULGULAR	40
4.1. Sitogenetik Analizlerden Elde Edilen Bulgular.....	40
4.1.1.Tenofovir Disoproksil Fumarat'ın Mikronükleus Oluşumu Üzerine Etkileri.....	40
4.1.2.Tenofovir Disoproksil Fumarat'ın Mitotik İndeks (MI) Üzerine Etkileri	43
4.2. Moleküler Analizlerden Elde Edilen Bulgular	44
4.2.1.XPD Lys751Gln Gen Polimorfizmi.....	44
4.2.2.XRCCI Arg194Trp Gen Polimorfizmi	46
4.2.3.XRCCI Arg399Gln Gen Polimorfizmi	48
4.2.4.APEI Asp148Glu Gen Polimorfizmi.....	50
4.2.5. Hasta ve Kontrol Gruplarında XPD Lys751Gln, XRCCI Arg194Trp, XRCCI Arg399Gln ve APEI Asp149Gln Gen Polimorfizmleri ile MN İlişkisi.....	52
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	61
KAYNAKLAR.....	62
EKLER.....	73
Ek 1 : Etik Kurul Kararı.....	73
ÖZGEÇMİŞ.....	76

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AGT	: Alikilgunanın Transferaz
AIDS	: Edinsel İmmün Yetmezlik Sendromu
ALT	: Alanin aminotransferaz
AP	: Apürinik ya da Aprimidinik
APE1	: Apürinik/Apiriminik Endonükleaz I
BER	: Base Excision Repair
CBS	: Sistationin Beta Sentaz
cccDNA	: Halkasal DNA
ddN	: 2' ,3' -dideoksinükleozid
dk	: Dakika
FDA	: Food and Drug Administration
GGR	: Global Genom Repair (Global Genom Onarımı)
HBsAg	: Hepatitis B Surface Antigen (Hepatit B Yüzey Antijeni)
HBV	: Hepatit B Virüsü
HCC	: Hepatoselüler Karsinoma
HCV	: Hepatit C Virüsü
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
IU	: İnternasyonal Ünite
KA	: Kromozom Anomalileri
KCL	: Potasyum Klorür
KHB	: Kronik Hepatit B
KKD	: Kardeş Kromatid Değişimi
MI	: Mitotik İndeks
MMR	: Missmatch Repair
MN	: Mikronükleus
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
NaCl	: Sodyum Klorür
NDP	: Nükleozit Difosfat
NER	: Nucleotide Excision Repair
NtRTİ	: Nükleotid Reverse Transkriptaz İnhibitörü

PARP	: poli ADP Riboz Polimeraz
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RT	: Reverse Transcriptase (Ters Transkriptaz)
SNP	: Single Nücleotid Polymorphisms (Tek Nükleotid Polimorfizmi)
SSB	: Single Strand Breaks (Tek Zincir Kırıkları)
TCR	: Transcription-coupled Repair
TDF	: Tenofovir Disoproksil Fumarat
Tm	: Melting Temperature
UV	: Ultraviyole
Uvr	: Ultraviole Onarımı
<i>XPD</i>	: <i>Xeroderma pigmentosum</i> grup D
<i>XRCCI</i>	: X-ray repair cross-complementing protein grup 1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. HBV'nin genel yapısı.....	5
Şekil 2.2. HBV genomu.....	6
Şekil 2.3. Viral giriş ve HBV'nin replikasyon döngüsü.....	7
Şekil 2.4. HBsAg prevalansı.....	8
Şekil 2.5. FDA'nın kabul ettiği antivirallerin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2.6. Mikronükleus içeren hücre oluşumu.....	16
Şekil 2.7. Klastrojen ve anojenlerce oluşturulan MN'ler.....	17
Şekil 2.8. Baz eksizyon onarımı.....	22
Şekil 2.9. Nükleotid eksizyon onarımı.....	23
Şekil 4.1. MN içeren hücre ile mitoz bölünme geçiren hücre.....	41
Şekil 4.2. İki MN' li hücre.....	42
Şekil 4.3. MN içeren hücre.....	42

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Kullanılan tedavi yöntemleri.	10
Tablo 2.2. FDA'nın kabul ettiği beş antiviral	12
Tablo 3.1. Deney grupları.	34
Tablo 4.1. Kontrol grubu ve hasta gruplarından elde edilen periferik lenfositlerinde MN'li hücre yüzdesi.	40
Tablo 4.2. Hasta gruplarının MN'li hücre yüzdesi.	41
Tablo 4.3. Kontrol grubu ve hasta gruplarından elde edilen periferik lenfositlerinde MI'lı hücre yüzdesi.	43
Tablo 4.4. Uygulama gruplarının MI'lı hücre yüzdesi.	44
Tablo 4.5. Hasta ve kontrol gruplarında <i>XPD</i> Lys751Gln polimorfizmi bakımından genotip dağılımı.	45
Tablo 4.6. Hasta ve kontrol gruplarında <i>XPD</i> Lys751Gln polimorfizmi bakımından allel dağılımı.	46
Tablo 4.7. Hasta ve kontrol gruplarında <i>XRCCI</i> Arg194Trp polimorfizmi bakımından genotip dağılımı.	47
Tablo 4.8. Hasta ve kontrol gruplarında <i>XRCCI</i> Arg194Trp polimorfizmi bakımından allel dağılımı.	48
Tablo 4.9. Hasta ve Kontrol Gruplarında <i>XRCCI</i> Arg399Gln polimorfizmi bakımından genotip dağılımı.	49
Tablo 4.10. Hasta ve Kontrol Gruplarında <i>XRCCI</i> Arg399Gln polimorfizmi bakımından allel dağılımı.	50
Tablo 4.11. <i>APEI</i> Asp148Glu polimorfizmi bakımından genotip dağılımı.	51
Tablo 4.12. <i>APEI</i> Asp148Glu polimorfizmi bakımından allel dağılımı.	52
Tablo 4.13. Kontrol grupları ile hasta gruplarında, <i>XPD</i> Lys751Gln, <i>XRCCI</i> Arg194Trp, <i>XRCCI</i> Arg399Gln ve <i>APEI</i> Asp149Gln genotipleri ve MN frekansının ilişkisi.	54

1. GİRİŞ

Hepatit B hastalığı dünya genelinde ciddi bir sağlık problemidir. Tüm dünyada yaklaşık 400 milyonu aşkın insan Hepatit B virüsü ile enfekte olmaktadır. Her yıl görülen 530.000 hepatoselüler karsinomun 316.000'i HBV ile ilişkili olarak bildirilmiştir. Yine her yıl yaklaşık 100.000 kişi HBV enfeksiyonu komplikasyonlarından kaybedilmektedir (1).

HBV, *Hepadnaviridae* familyasındandır. Bilinen en küçük DNA virüsü olan HBV, 3200 nükleotidden oluşur ve genomu kısmen çift ipliklidir. Replikasyonunu primer olarak karaciğerde gösterir (2).

Hepatoselüler karsinoma geliştirme riski ve siroza ilerleyişin azaltılabilmesi için antiviral ilaç direnci geliştirmeden maksimum viral baskılamının gerçekleştirilmesi, kronik HBV tedavisinin en temel hedefidir (3). Bu amaçla uygulanan tedavi yöntemlerinden birisi de viral polimeraz inhibitörleridir. Nükleotid revers transkriptaz inhibitörleri olarak da adlandırılan nükleotid analogları, virüsün revers transkriptaz enziminin katalitik bölgesi ile etkileşirler (4). Yeni yapılmakta olan DNA'ya bağlanarak DNA sentezini durdurup, replikasyonu bloke eden bileşiklerdir (5). Bu sınıf ilaçların prototipi tenofovirdir. Oral prodrug formu tenofovir disoproksil fumarattır (TDF). İki binsekiz yılı itibariyle kronik hepatit B tedavisi için onaylanmıştır (6).

TDF, etkisini HBV'nin polimeraz enzimini inhibe ederek gösterir. Bu etkisini gösterirken, doğal nükleotidlere analog gibi davranır ve mitokondrial DNA polimerazı da içerecek şekilde memeli DNA polimerazını da inhibe edebileceği ve oksidatif stresi uyurabileceği bildirilmiştir (7).

Tenofovir etkin bir anti-retroviral ilaç olmasına karşın kronik kullanıma bağlı olarak ciddi yan etkiler göstermektedir. Karaciğer, böbrek, kemik iliği ve kas dokusu üzerinde toksik etki oluşturabilmektedir (8). Tenofovirin konakçı hücre içerisinde hedef moleküllerinin başında mitokondriyal DNA (mtDNA) gelmektedir (9). Ayrıca konakçı hücrelerinde oksidatif stresi artırarak apoptozis ve kanser dâhil birçok hücre toksisitesine neden olabildiği bazı çalışmalarda gösterilmiştir (10). Tenofovir konakçı hücrelerde DNA zincirine bağlanarak delesyonlar, nokta mutasyonları gibi genomik hasarlara yol açabilmektedir (11). Ayrıca mikronükleus oluşumu, kromozomal aberrasyonlar, kardeş kromatid değişimleri ve kısa telomer oluşumu

gibi genotoksik etkileri bulunmaktadır (12). Bu etkiler, bireysel farklılıklar gösterebilir çünkü DNA tamir genlerindeki polimorfizmler doğrultusunda DNA onarım kapasitesi farklı kalıtılmış olabilir (13). Bu şekilde DNA tamirini içeren çeşitli genlerdeki polimorfizmlere bağlı olarak oluşan MN duyarlılık çalışmaları literatürde bildirilmiştir (14).

Kültüre edilmiş lenfositlerdeki mikronükleus sıklığı, dolaşımdaki lenfositlerde biriken genetik hasarın bir göstergesidir. Mikronükleus sayısının fazla olduğu bireylerde DNA zincir kırıklarının da yüksek olduğu bilinmektedir. Bu durum ise DNA onarımı ile ilişkili genleri gündeme getirmektedir. Son yıllarda çeşitli tamir genlerindeki bazı yaygın polimorfizmlerin DNA tamir kapasitesi ile bir kişinin karsinojenlere karşı hassasiyetini belirlediği öne sürülmüştür. Çeşitli toplumlarda yapılan çalışmalarda riskli alleller, toplum ve hastalık tiplerine göre farklılık göstermektedir (3, 6). DNA hasarının tamiri beş farklı tamir sistemi tarafından onarılabilmektedir. Bunlar doğrudan tamir, yanlış eşleşme tamiri, çift iplikçik kırılma tamiri, baz kesip çıkarma tamiri ve nükleotid kesip çıkarma tamiridir. *APE1* ve *XRCC1* baz kesip çıkarma tamirindeki anahtar genlerdendir (15). Bunlardan *XRCC1* geni; DNA onarım genlerinden biri olup genom bütünlüğünün devamlılığında; kanser ve kalıtsal genetik hastalıkları oluşturan mutasyonlardan korunmada önemli rolü olan bir genidir. Apürinik ya da aprimidinik (AP) bölgeler özellikle ROS tarafından oluşturulan en yaygın DNA bozuklukları arasındadır. Baz kesip çıkarma tamirinde ilk adım bir AP endonükleaz tarafından (*APE*) AP bölgenin yanında yapılacak olan kesmedir. *APE1* (veya *APEX1*) bu anlamda çok önemli bir işlevi gerçekleştirerek tamiri başlatır (7). *XPD* geni ise nükleotid kesip çıkarma tamiri ve zararlı DNA lezyonunun olduğu bölgede DNA'nın çözülmesine katılan ve büyük bir DNA tamir proteini olan bir helikazı kodlar. Bu gendeki polimorfizmlerden en yaygınlarından biri *XPD* Lys751Gln polimorfizmidir.

Literatür taramalarında tenofovir tedavisi alan hastalarda genetik hasar tepiti ve DNA onarım genlerinin polimorfizmleri arasındaki ilişkiye dair herhangi bir araştırma bulunamadı. Bu çalışmada kronik hepatit B hastalarında tedavi amacıyla uygulanan tenofovirin olası genotoksik etkileri, periferik kanda lenfosit hücrelerinde mitotik indeks oranları ve mikronükleus oluşum frekansları bakımından araştırıldı. Ayrıca genetik hasarla ilişkili olarak DNA tamirinde görev alan genlerden *APE1*

Asp148Glu, *XRCCI* Arg194Trp, *XRCCI* Arg399Gln ve *XPB* Lys751Gln genlerindeki polimorfizmlerin de çalışma kapsamında değerlendirilmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

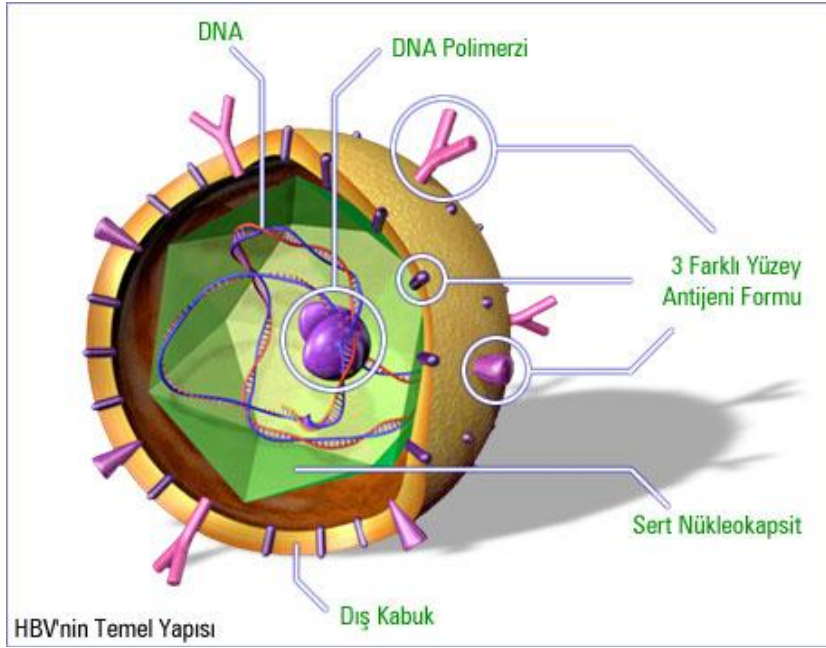
2.1. Hepatit B'nin Tarihçesi

İlk kez Hipokrat tarafından kaydedilen viral hepatit, M.Ö. 5.yüzyılda tanımlanmış bir hastalıktır. Bu hastalık, özellikle 19. ve 20. yüzyıllardaki savaşlar sırasında olmak üzere, birçok salgın ve kayıplara yol açmıştır. Bu tarz salgınların birçoğu hepatit A sebepli iken; kan içeren ürünlerin kullanımı ile hepatit B'nin bulaşması da gerçekleşmiştir. Kan ve kan ürünleriyle bulaşan hepatit formu ilk kez 1883 yılında, çiçek hastalığı aşılama kampanyası sırasında Lurman tarafından Bremen'de tanımlanmıştır (16).

HBV, dünya genelinde, akut ve kronik hepatitler, siroz ve hepatoselüler karsinomunun en önemli nedenidir (17).

2.2. Hepatit B Virüsünün Moleküler Biyolojisi

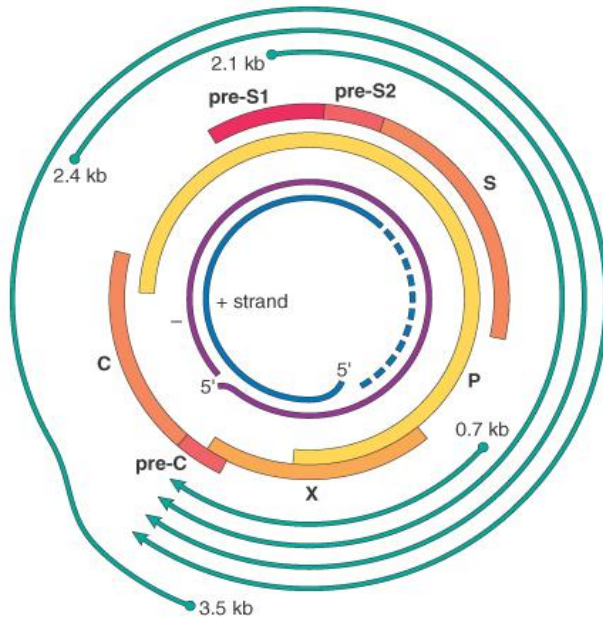
HBV hepatotropik bir virüstür. *Hepadnaviridae* ailesinden olan hepatit B Virüsü bilinen en küçük DNA virüsüdür (Şekil 2.1.). Sadece 3200 nükleotidden oluşan virüs, büyük oranda çift iplikli, dairesel DNA yapısındadır. RNA aracılı revers transkriptaz enzimi ile bölünür. Revers transkripsiyon sürecinin düşük uyumluluğuna bağlı olarak bu pregenomik RNA mutasyonlara açıktır (2).



Şekil 2.1. HBV'nin genel yapısı (18).

Viral DNA, 4 çakışan açık okuma çerçevesini kodlar; S (surface), C (core), P (polymerase) ve X genleri. **S geni**; virionu çevreleyen kılıf proteini kodlar. Pre S1, preS2, S bölgelerinden oluşur. **C geni**; kor veya nükleokapsid genidir. Hepatit B çekirdek (core) antijenini (HBcAg) kodlar. **P geni**; genomun $\frac{3}{4}$ ünü oluşturan bu gen, DNA bağımlı DNA polimeraz ve RNA bağımlı revers transkriptazı kodlar. Pol geninin ürünü olan bu proteinin immünojen özelliği vardır. **X geni**; transkripsiyon aktivatör proteinini kodlar (Şekil 2.2.) (19).

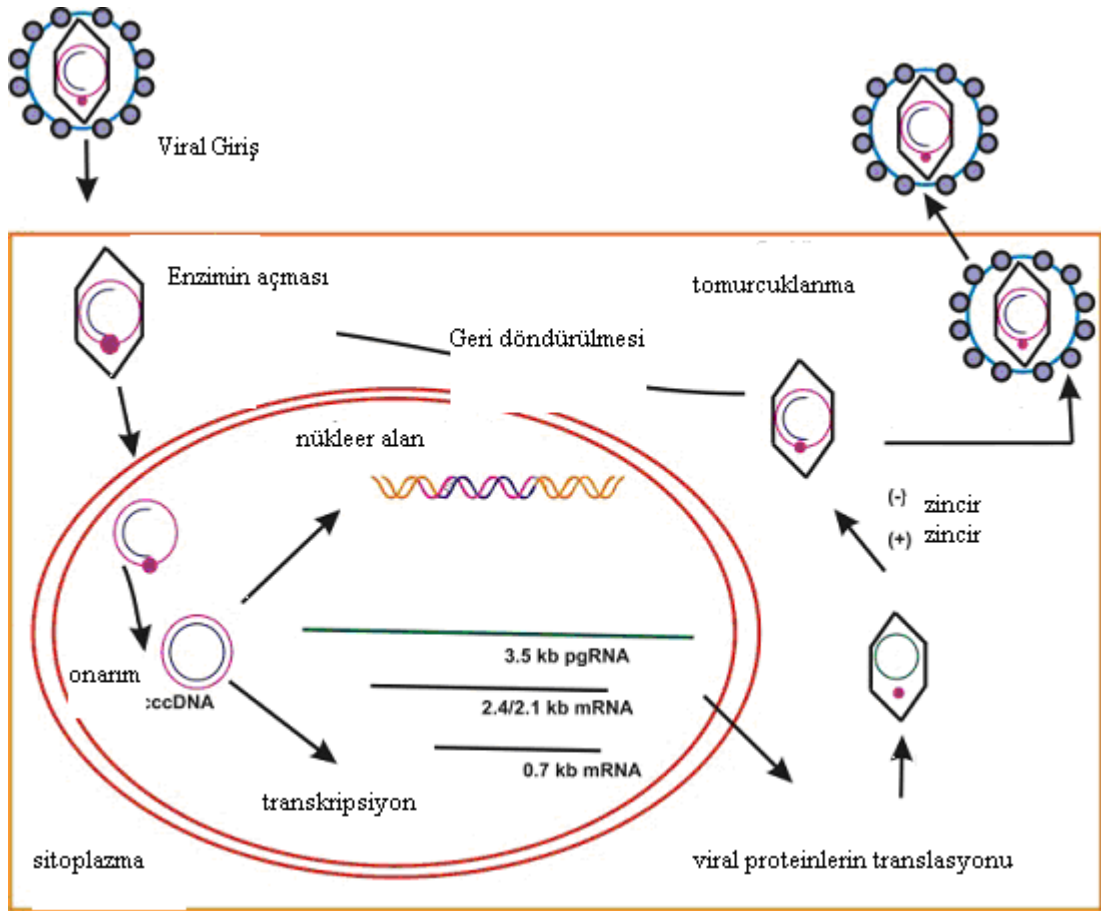
Genomu ikozahedral bir kapsid çevreler. Kapsidin dışında da üç farklı yüzey antijenini taşıyan lipid yapıları zarf yer alır. Virüs muhtemelen bazı moleküler motifler aracılığı ile hepatositlerin yüzeyindeki reseptör benzeri bölgelere bağlanarak endositoz ile hücre içerisine alınır. Hücre içine giren HBV, sitoplazmada zarf ve kapsidini kaybederek genomik yapısı çekirdek içine girer ve burada replike olur (20).



Şekil 2.2. HBV genomu (21).

2.3. Hepatit B Virüsünün Replikasyonu

Hepatit B Virüsünün hepatositi enfekte etmesi ile HBV genomu nükleus içerisine aktarılır. Viral genom kovalent olarak halkasal DNA (cccDNA)'ya çevrilir. Bu viral DNA, pregenomik mRNA, pre-core mRNA ve tüm diğer subviral mRNA'ların oluşumu için transkripsiyonel bir kalıp gibi davranır. Sonuçta, HBV'nin intrahepatik bir rezervuarı olarak hizmet eden ve kronik olarak enfekte olmuş ev sahibinin yaşamı boyunca içine yerleşen cccDNA, viral minikromozoma doğru kromatinize edilir. Virion, çekirdek partikülü tarafından pregenomik RNA kapsüle edilir ve viral polimeraz tarafından, tek zincirli DNA formu (negatif zincir) olarak, tersine transkribe edilir. Ardından pregenom degrade edilmiştir ve negatif DNA zinciri, farklı uzunluktaki pozitif DNA zincirinin sentezi için kalıp olarak kullanılır. Sonunda HBV genomu kapsüllenmiştir ve virionları dışarı salgılamak üzere üretilir veya cccDNA havuzunu devam ettirmek üzere nükleusa geri gönderilir. Sonuçta enfekte hepatositte cccDNA'nın 5-50 kopyası oluşturulmuş olur (Şekil 2.3.) (2).



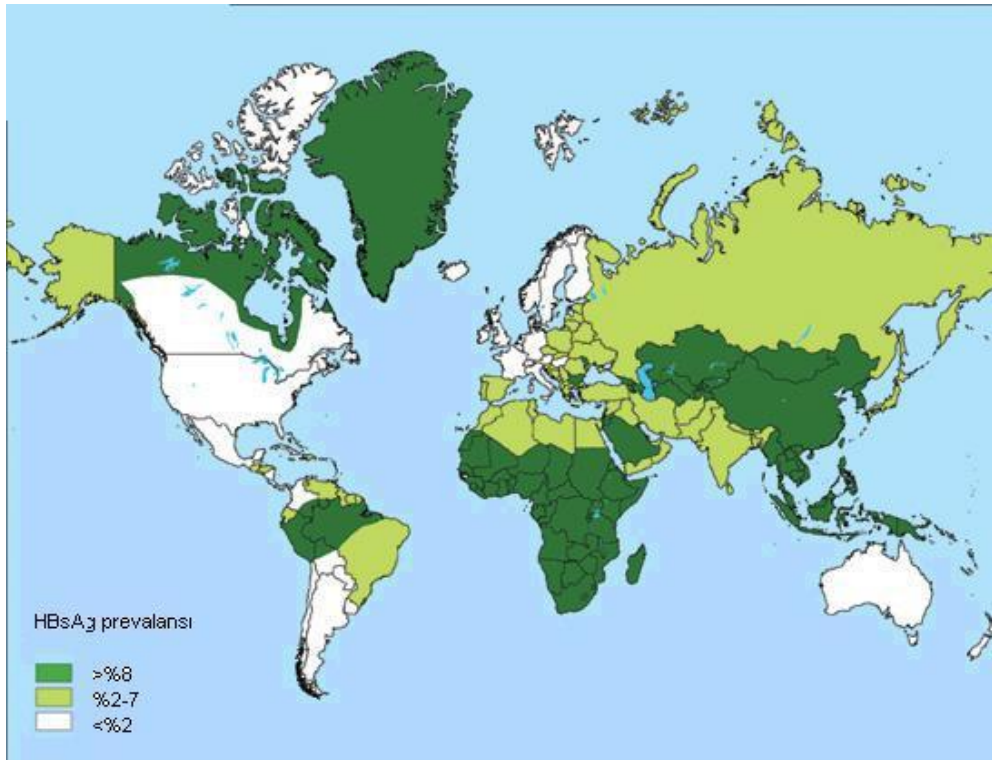
Şekil 2 3. Viral giriş ve HBV'nin replikasyon döngüsü (2).

2.4. Hepatit B Virüsünün Epidemiyolojisi

HBV enfeksiyonu dünyada ve ülkemizde en yaygın görülen enfeksiyonlardan birisidir. Önemli ölçüde mortalite ve morbidite oranına sahiptir. Hepatit B virüsünün bilinen karsinojenler arasında sigaradan sonra ikinci sırada yer aldığı da bilinmektedir. Dünyada yaklaşık 400-500 milyon kişinin HBV taşıyıcısı olduğu bilinmektedir. Her yıl 10-30 milyon kişi yine HBV ile enfekte olmaktadır ve bu durum da her yıl yaklaşık 1-2 milyon kişinin ölümüyle sonuçlanmaktadır (22, 23).

Dünya genelinde dağılımı coğrafi bölgelere göre de farklılık gösterirken bulaşma yolları da enfeksiyonun bölgesel prevalansına göre farklılık göstermektedir. Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) pozitifliğine göre HBV prevalansı > % 8 olan ülkeler yüksek, %2-8 arası olan ülkeler orta ve %2'den az olan ülkeler düşük endemite bölgeleri olarak kabul edilmektedir. Türkiye özelliklerine göre orta

endemisite bölgesinde yer alır ve ülkemizde yaklaşık 4 milyon insanın HBsAg taşıdığı tahmin edilmektedir. Ancak, HBV seroprevalansı ülke içinde coğrafi bölgelere göre büyük farklılık göstermektedir. Mesela; batı bölgelerinde HBV taşıyıcılığı % 6 olarak tahmin edilirken, doğu ve güneydoğu bölgelerinde %12.5-14.3 arasındadır (Şekil 2.4.) (24, 25). Malatya yöresinde yapılan bir çalışmada HBV prevalansı orta endemisite bölgesi içerisinde bulunmuştur (26).



Şekil 2.4. HBsAg prevalansı (27).

HBV'nin dört ana bulaş yolu vardır:

1. Perkütan (parenteral) Bulaş: HBV enfeksiyonunda en önemli bulaş yollarından biridir. Enfekte kan ve vücut sıvıları ile mukozal ya da kütanöz temas ile olmaktadır. Damar içi ilaç kullanımı, kontamine iğne yaralanmaları, hemodiyaliz, dövme yaptıрма gibi yollar bu tip bulaşın en önemli örnekleridir.
2. Cinsel Temas (semen ve vajinal sekresyonlar)
3. İnfekte Anneden Yenidoğana Bulaş (vertikal)
4. Horizontal Yol: Enfekte kişilerle cinsellik içermeyen yakın temas (28).

Hepatit B, çoğunlukla yüksek endemisite bölgelerinde perinatal veya çocukluk döneminde horizontal yolla bulaşırken; düşük endemisite bölgelerinde, adolesan ve genç erişkinlik döneminde cinsel temas ve damar içi ilaç kullanıcılarında ortak iğne kullanımı yoluyla bulaşmaktadır. Ülkemizin de yer aldığı orta endemisite bölgeleri ise her iki endemisite bölgesinin bulaşma özelliklerini göstermektedir. Ayrıca bu grupta güvenli olmayan sağlık ilişkili enjeksiyon uygulamaları da önemli bir bulaş yoludur (28, 29).

Sağlık çalışanları (özellikle hemodiyaliz, onkoloji, edinilmiş immün yetmezlik sendromu ünitelerinde çalışanlar, kan ve vücut sıvıları ile temas eden laboratuvar çalışanları, cerrahlar), bakımevlerinde kalanlar ve bu kişilere bakanlar, bunların aileleri, sık kan transfüzyonu yapılanlar, hemodiyaliz hastaları, organ transplantasyonu yapılanlar, intravenöz ilaç kullananlar, erkek erkeğe cinsel ilişkide bulunanlar, HIV pozitif olgular ve HCV ile enfekte kişiler, kronik hepatit B (KHB) olguları ile ev içi teması olanlar, hiperendemik bölgede doğanlar, kronik böbrek yetmezlikli olgular, periton diyalizi yapılanlar HBV enfeksiyonu için daha fazla risk taşımaktadırlar (24, 30).

2.5. Kronik Hepatit B Tedavisi

HBsAg pozitif olduğunda, viral replikasyonun varlığını göstermesi bakımından kronik hepatitlerde HBV DNA bakılması zorunlu hale gelmiştir. Günümüzde hem kalitatif hem de kantitatif yönden viral genomu araştırmaya yönelik çok duyarlı PCR yöntemleri bulunmaktadır (31).

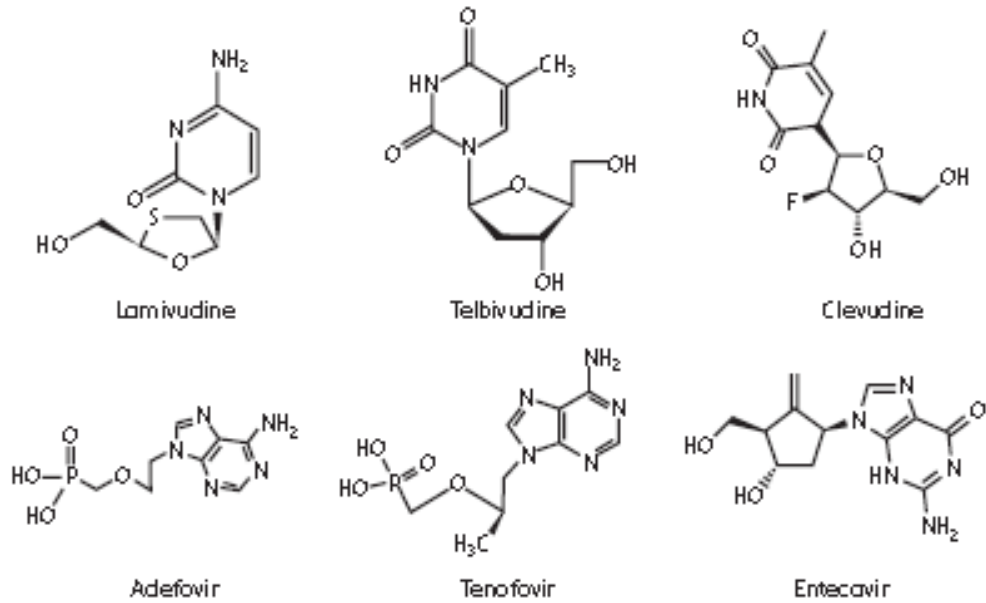
Hepatoselüler Karsinoma geliştirme riski ve siroza ilerleyişin azaltılabilmesi için antiviral ilaç direnci geliştirilmeden maksimum viral baskılamanın gerçekleştirilmesi kronik HBV tedavisinin en temel hedeflerindedir (3).

Antiviral tedaviye başlama kararı verilirken serum ALT düzeyi, HBV DNA düzeyi ile karaciğerin histopatolojik incelemesi önemli rol oynar. Viral yükü düşük (HBV DNA $< 2 \times 10^6$ IU/ml) olan hastalarda herhangi bir oral antiviralle tedaviye başlanabilir. Tenofovir ve entekavir, direnç ve antiviral etkinlik yönünden daha avantajlıdır ve viral yükü yüksek olan hastalarda (HBV DNA $< 2 \times 10^6$ IU/ml) tenofovir veya entekavir tercih edilmelidir (31) (Şekil 2.5.).

Hepatit B tedavisinde uygulanan tedavi yöntemleri Tablo 2.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Kullanılan tedavi yöntemleri (3).

Nükleozid Anologları	Lamivudin, Telbuvudin, Klevudin, Entecavir
Nükleotid Analogları	Tenofovir, Adefovir
İmmünomodülatörler	Kortikosteroidler, thymosin-B, levamisole, koloni stimüle edici faktörler, interlökinler
Moleküler Biyolojik Yöntemler	DNA ilaçları, antisens oligonükleotitler, ribozimler, DNAazlar, dominat negatif mutantlar
İnterferonlar	Alfa IFN, Beta IFN, Gama IFN



Şekil 2.5. FDA'nın kabul ettiği antivirallerin kimyasal yapısı (32).

2.5.1. Nükleozid Analogları

Virüs içerisinde bulunan Lamivudin, Telbuvudin, Klevudin, Entecavir gibi ticari isimlerle satılan bu grup ajanlar, revers transkriptaz enziminin katalitik bölgesi ile etkileşen ilaçlardır. Nükleozid Revers Transkriptaz İnhibitörleri olarak isimlendirilirler. Bu grup ilaçlar, 2', 3'-dideoksinükleozid (ddN) analoglarına sahiptirler ve bu ilaçların etki mekanizmaları birbirine benzer. NRTİ' ler hücre içine alındıktan sonra, 5'-monofosfat (ddNMP), 5'-difosfat (ddNDP) ve 5'-trifosfatlarına (ddNTP) dönüşürler. Bu işlem, ddNMP'nin, normal deoksinükleozit trifosfatın (dNTP) kompetitif inhibitörü/alternatif substratı olarak işlev görmesinden önce olur.

Normal substratın kompetitif bir inhibitörü olarak ddNTP, normal substratın DNA zinciri ile birleşmesini inhibe eder ve ddNMP halinde alternatif bir substrat olarak bu zincire katılır böylece zinciri sonlandırıcı olarak işlev görür (5).

2.5.2. Nükleotid Analogları

Nükleotid analogları, nükleozid analogları gibi virüsün revers transkriptaz enziminin katalitik bölgesi ile etkileşirler (5). Nükleotid Revers Transkriptaz İnhibitörleri olarak isimlendirilirler.

NtRTİ sınıfı ilaçlar, NRTİ'lerden kolayca ayırt edilir; çünkü NtRTİ'ler nükleotid analoglarıdır. NtRTİ'ler aktif formun oluşması için sadece iki fosforilasyona ihtiyaç duyarlar. NtRTİ'lerin en önemli özellikleri, AZTMP, ddAMP, ddCMP gibi nükleozid türevleri ile karşılaştırıldığında 3'-terminal uçtan bir defa birleştiğinde bu bileşiklerin yarılmamasını daha zor hale getirecek ve hidrolazlar vasıtasıyla parçalanmayacak bir fosfonat grubu taşımalarıdır.

Bu sınıf ilaçların prototipi tenofovirdir. Tenofovirin oral prodrug formu tenofovir disoproksil fumarattır. TDF, HBV enfeksiyonlarının tedavisi için sıkça kullanılan ilaçlardan biridir. TDF, 2008'den itibaren kronik hepatit B enfeksiyonlarının tedavisi için de onaylanmıştır (6).

2.5.3. Nükleozid ve Nükleotid Analogu İlaçların Yan Etkileri

Yaptıkları tedavilere karşın Kronik Hepatit B tedavisi için kabul edilen nükleozid ve nükleotid analogu ilaçların bazı yan etkileri bulunmuştur.

Nükleozid ve nükleotid analogu olarak kabul edilen genel 5 ilaç, viral DNA polimerazı inhibe ederek viral replikasyon ile serum HBV DNA' sını azaltmak üzere işlev gösterirler (Tablo 2.2.). Bazı analoglar, insan mitokondriyal DNA polimeraz gama aktivitesine de engel teşkil ederek mitokondriyal disfonksiyona neden olurlar. Mitokondri toksisitesi, miyopati, nöropati, hepatik steatoz, pankreatit, makrositozis, hiperlektemiya ve nefrotoksisite gibi hasarlarla kendini gösterir.

Diğer önemli husus, kabul gören bu beş ilaçta da gözlemlenen laktik asidozistir.

Nükleotid ve nükleozid analoglarının KHB tedavisi için daha düşük dozlarda verilmesi önerilmektedir (33).

Tablo 2.2. FDA'nın kabul ettiği beş antiviral (33).

	Lamivudine	Adefovir	Entakavir	Telbivudine	Tenofovir
Kabul Yılı	1998	2002	2005	2006	2008
Kısaltması	LAM	ADV	ATV	TBV	TNV
Etki Mekanizması	HBV Revers Transkriptazı Bloklar	HBV Revers Transkriptazı Bloklar	HBV DNA Polimerazı İnhibe Eder	HBV DNA Polimerazı İnhibe Eder	HBV DNA Polimerazı İnhibe Eder
Dozu	100mg/d	10mg/d	0.5mg/d	600mg/d	245mg/d
Yan Etkisi	Nadiren miyopati, nöropati, pankreatit	Nefrotoksisite, pankreatit	Gözardı edilebilir	Miyopati	Nefro toksisite

2.6. Tenofovir Disoproksil Fumarat

Tenofovir disoproksil, viral enfeksiyonlarda nükleotid ters transkriptaz inhibitörü olarak çalışan didenonükleozit inhibitör grubu bir ilaçtır. Kronik hepatit B ve AIDS hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kullanımı günlük 1 adet 245 mg film kaplı tablet şeklindedir (34). Tenofovir disoproksil

alımından sonra adenozin 5'-monofosfat, asiklik analogu olan tenofovire hidrolize edilir. Tenofovir, hücre içerisinde timidin kinaz, timidilat kinaz ve nükleozit difosfat (NDP) kinazlar tarafından gerçekleştirilen ardışık üç fosforilleme sonucunda aktif olan trifosfat formuna dönüşür. Bu trifosfat yapı, HBV ve HIV viral RNA'sının replikasyonu sırasında proviral DNA sentezini gerçekleştiren ters transkriptaz (reverse transcriptase, RT) enziminin substrat bağlama bölgesine bağlanarak onu kompetitif olarak inhibe eder. Böylece bir zincir sonlandırıcısı olarak etki gösterir (34, 35).

Tenofovir, yapısal olarak adefovire benzemektedir. Hem HBeAg pozitif hem de HBeAg negatif hastalarda viral baskılanma ve histolojik gelişme açısından adefovire göre daha etkin olduğu faz III çalışmalarıyla gösterilmiştir. Ayrıca adefovire göre daha az nefrotoksik olması sayesinde günde 245 mg kullanılabilmesi, daha güçlü bir antiviral olarak kullanılmasını sağlamıştır (36).

Geniş spektrumlu bir antiviral ilaçtır. Tenofovir retrovirüsler ve hepadnavirüslere seçici etkinlik göstermektedir.

TDF, HIV tedavisinde 2001 yılında kullanım onayı almıştır. Yaklaşık olarak 1.3 milyon HIV'li hastada güvenli kullanımı söz konusudur. Hepatit B tedavisi için ise 2008 yılında kullanım onayı almıştır (37).

Tenofovirin direnç gelişimine karşı yüksek genetik bariyer içeriyor olmasının yanında antiviral etkinlik gücü ile hepatit B tedavisinde umut veren tedavi seçeneği olarak görülmektedir (37, 38).

2.6.1. Tenofovirin Yan Etkileri

Yapılan çalışmaların sonuçlarına göre genel yan etkiler arasında baş ağrısı, bulantı-kusma, karın ağrısı, diyare, hafif yan etkiler arasında yer almaktadır; ciddi yan etkileri ise ALT yüksekliği, trombositopeni şeklinde bildirilmiştir.

Tenofovir kullanımı sonucunda Fanconi Sendromu ve böbrek yetmezliği oluşan vakalar da bildirilmiştir. Ayrıca, tenofovirin etki gösterirken, insan mitokondriyal DNA polimerazını inhibe ederek mitokondriyal disfonksiyona yol açtığı bildirilmiştir (15).

Nefrotoksik ajanlarla birlikte kullanılırken ve tenofovir düzeyini artıran ilaçlarla (ör: asiklovir, gansiklovir gibi antivirallerle) kullanılırken dikkatli

olunmalıdır. Atazanavir ile birlikte kullanımında atazanavirin düzeyini azaltacağından veya direnç gelişimine sebep olabileceğinden ötürü yanıtızsızlığa neden olabilir. Didanozin ile birlikte kullanımında pankreatit, laktik asidoz riski artmaktadır. Proteaz inhibitörleri tenofovir düzeyini artırarak nefrotoksisiteye yol açabilir (39).

2.7. Genetik Toksisite Testlerinin Kullanım Alanları

Genotoksisite, kimyasal veya fiziksel ajanların genetik materyalde oluşturduğu hasarlardır. Bu hasarlar, tek zincir kırıkları (SSB), çift zincir kırıkları, alkali labil bölgeler (ALS) ve DNA eklentilerinden oluşur ve bu hasarlar tamir edilemezse DNA sekans hataları, kromozom aberasyonları, nükleotid değişimleri ve bunların sonucunda mutasyonlar, kanser ve yaşlanma oluşabilir.

Genotoksisite testleri 1970 yıllarından günümüze kadar, mutajenik maddelerin toksik etkilerini ölçebilmek üzere geliştirilmiştir (40).

Genetik testler, *in vitro* veya *in vivo* olarak kullanılabilirler.

Genotoksisite testleri, UV, irradyasyon gibi genomu etkileyebilen fiziksel etmenler ile parazit, bakteri, virüs enfeksiyonları gibi biyolojik etmenler ve sigara, pestisitler, ilaçlar, nanomateryaller gibi kimyasal ajanların genotoksik ve karsinojenik potansiyellerini tespit etmek üzere kullanılırlar (41).

Bileşiklerin genotoksik etkilerini belirlemek üzere testlerin seri olarak değerlendirilmesinin daha doğru sonuçlar oluşturacağı düşünülmektedir (42).

2.7.1. Genetik Toksisite Testleri

Kimyasal veya fiziksel etkenlerin, karsinojenik ve mutajenik potansiyellerini genotoksik yönüyle test etmek üzere en yaygın olarak kullanılan standart *in vitro* ve *in vivo* mutajenite testleri şunlardır;

- Comet Testi
- Ames testi
- Kromozom Anomalileri (KA) Testi
- Gen (Nokta) Mutasyonları
- Kardeş Kromatid Değişimi (KKD)

- Mitotik İndeks (MI)
- Replikasyon İndeksi (RI)
- Mikronükleus Testi (MN) (40, 43, 44)

Bu çalışma kapsamında kronik tenofovir kullanımının olası genotoksik etkileri sitogenetik olarak MN ve MI testleri ile araştırıldı.

2.7.1.1. Mitotik İndeks (MI)

Bir hücre populasyonunda bulunan aynı cinsten bütün hücrelerin, bölünme süreleri tam olarak aynı değildir. Değişik faktörlere bağlı olarak hücre siklusları arasında farklılıklara rastlanır.

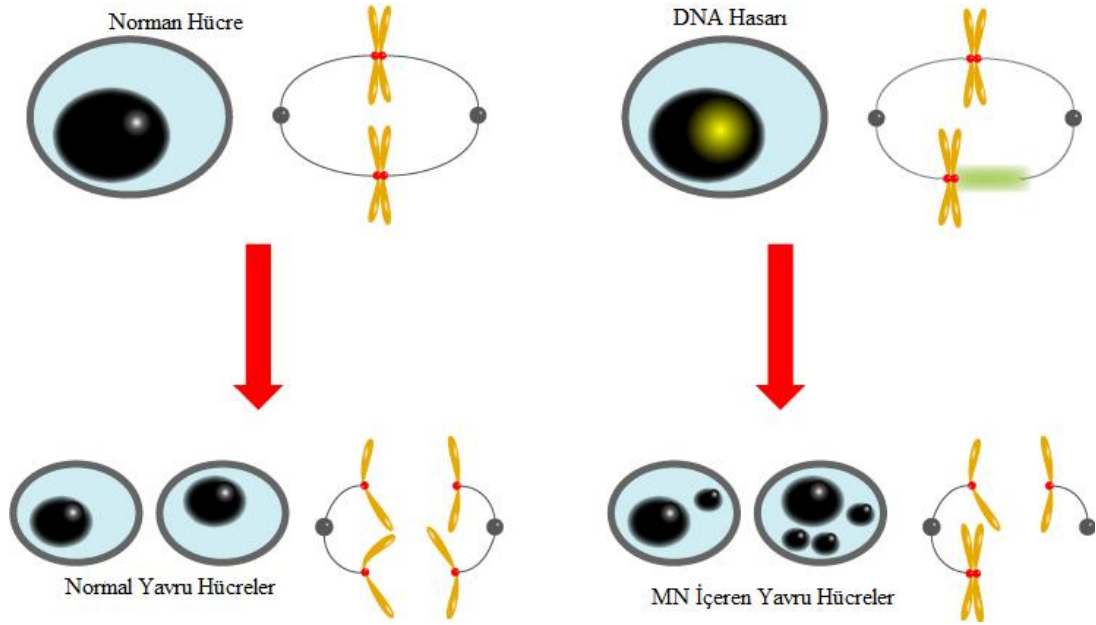
Hücre populasyonu içerisindeki hücre bölünmelerine dair kantitatif veriler elde etmek üzere çeşitli ölçümler yapılabilir. Bunlardan birisi de mitotik indeksin hesaplanmasıdır. Mitotik indeks, hücre populasyonu içerisinde mitoz bölünmede bulunan hücrelerin sayısının saptanarak, bu sayının tüm hücrelere oranının hesaplanmasıdır.

Mitotik indeks, hücre bölünme frekansını verir ve büyüme gelişme oranını belirlemek için önemli bir belirteç olarak kullanılabilir. Mitotik indeksteki azalmaya bağlı olarak büyüme ve gelişme olayları da yavaşlar. Uygulanan kimyasal miktarı ve hızı arttıkça mitotik indeks de etkilenip değişecektir (45).

2.7.1.2. Mikronükleus (MN)

Mikronükleus, hücre mitoz bölünme esnasında iken, asıl çekirdeğe dahil olmayan, kromozom parçalarından türeyen oluşumlardır. Bu yapılar genellikle hücre döngüsünü kontrol eden gen hatalarından, mitotik iğ hatalarından, kinetekordan ve kromozomal hasarlardan kaynaklanır (Şekil 2.6.). MN sayısındaki artış, çeşitli genotoksik ajanların, hücrelerde sayısal veya yapısal anomalilerin indirekt göstergesi olarak değerlendirilebilir. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hataları veya iğ iplikçikden kaynaklanan hatalara sebep olurken; klastrojen ajanlar ise kromozom kırıkları yaparak MN oluşumuna neden olurlar. Bu sebeplerden, MN sayısındaki artış, somatik hücrelerde, genomik kararsızlığın belirteci denilebilir (44).

MN testi, mitoz ile oluşan tüm hücre tipleri üzerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak uygulanabilmesi nedeniyle genetik toksikoloji araştırmalarında kullanılan yaygın bir test haline gelmiştir (46).



şekil 2.6. Mikronükleus içeren hücre oluşumu (47).

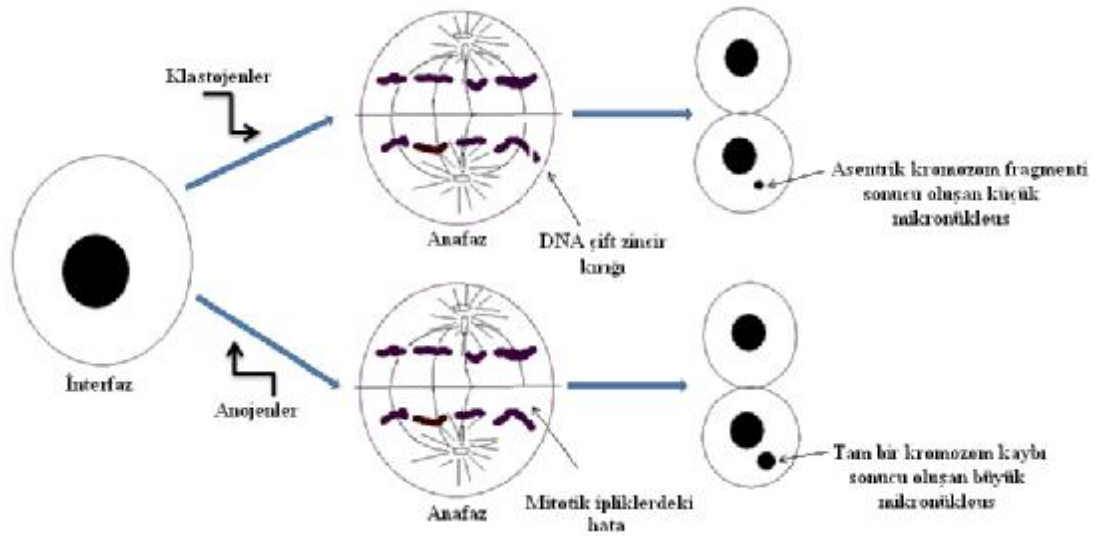
Ayrıca, kromozom analizine göre sitogenetik hasarı tespit etmek için daha kolay uygulanması ve daha fazla hücrenin değerlendirilmesine olanak vermesi gibi avantajları ile yaygın olarak kullanılmaktadır (47).

2.7.1.2.1. Mikronükleus Tekniğinin Gelişimi

MN'ler ilk kez Howell tarafından eritrosit hücresinde görülmüş ve bu yapılara "nükleer materyal fragmenti" denmiştir. Bunlar 1900'lü yılların başında Jolly terminolojisine göre "intraglobüler korpusküller" olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda "Howell-Jolly cisimcikleri" olarak da bilinirler. Benzer oluşumlar, sıçan embriyolarında ve Brenneke tarafından gösterilmiş ve arkasından, Thoday tarafından, *Vicia faba*'da gözlenmiştir. Bunlar "fragment nükleuslar" veya "mikronükleuslar" olarak adlandırılmıştır. *Vicia faba* bitkisinin kök uçlarında nötron ve gamma ışınlarının etkileri karşılaştırdıklarında, sitogenetik hasar belirteci olarak MN'lerin kullanılabildiğini tespit etmişlerdir.

MN testini ilk olarak öneren araştışıcılar Boller ve Schmid olup (1970). genotoksik ajanların işlevini ölçmek için kemik iliği eritrositlerinde MN yöntemini kullanmışlardır (48).

Bazı araştışmacılar, anöploidiye yol açan ajanlar ile klastrojenleri ayırmak için oluşan MN'lerin büyüklük farkından yararlanmışlardır. Klastrojenler sebebiyle asentrik kromozomal fragmentler içeren MN'ler, anojenlerce oluşturulan ve tam kromozom içeren MN'lerden daha küçük ebatlılardır. (şekil 2.7.)



şekil 2.7. Klastrojen ve anojenlerce oluşturulan MN'ler (44).

Eastmond ve Tucker da aynı amaçla antikinetekor antikorları ile kinetokor MN'lerin tam kromozom; kinetokor negatiflerin ise asentrik kromozom fargmentinden oluştuğunu bulmuşlardır. Bu yöntem, anöploidi oluşturun ajanlar ile klastrojenleri ayırmada daha kesin bir yol oluşturmuştur (44).

Sitokinez Bloklu Mikronükleus Metodu ise Fenech ve Morley tarafından geliştirilmiş ve tekniğin daha güvenli olması sağlanmıştır (49, 50).

2.7.1.2.2. Mikronükleus Oluşumu

MN, asıl kromozomdan koparak oluşan ya da anafaz sırasındaki hatalardan dolayı ana nükleusa katılamayan tam kromozomlardan oluşur, sitoplazma içerisinde bulunur ve ana nükleusun yanında ek bir parça halinde gözlenir.

Doğrudan DNA veya iğ ipliğinde oluşan bir hasar ile kromozom veya kromozomun kromatin haline gelmesi sonucunda oluşur. Hücre içerisinde gözlenen MN, o hücredeki genetik hasarı işaret edebilir.

Hücredeki kromozom anomalileri, bölünme esnasında kromozomların uzunlamasına olarak birbirlerinden ayrılamaması (nondisjunction) ya da kromozomların anafazda geri kalması (anafaz lagging) ile oluşmaktadır. Anafaz esnasında kromozomların geri kalmanın sebebi, sentriollerden oluşan mikrotübüllere sentromerlerinden bağlanamamalarıdır. Kromozom üzerindeki bir kıraktan oluşan kromozom parçaları sentromer içermiyor olabilir ve mikrotübüllere bağlanamayabilir. Kromozomların anafaz esnasında diğer bir geri kalma sebebi ise, sentromer içerisinde meydana gelen bir nokta mutasyon ve dolayısıyla yine mikrotübüllere bağlanamama olabilir.

Hücrede spontan olarak da MN oluşabilir. Spontan MN oluşumu iki nedene bağlıdır. Birincisi, kinetokor proteinleri ile sentromerde oluşan bir mutasyon ve anafazda kromozom kaybı veya iğ ipliğindeki mutasyonlardır. İkincisi ise, çevresel mutajenlere maruz kalmanın sonucu olarak tamir edilemeyen DNA zincir kırıklarıdır (45).

2.8. DNA Tamiri ve MN İlişkisi

DNA tamir kapasitesi bireyler arasında çeşitlilik göstermektedir. Kapasitenin düşmesiyle beraber artan kanser riski arasında ilişki gösterilmiştir. Kanserlerin önlenmesi ve genetik kararlılığın devamında DNA tamirinin önemli yeri olduğuna dair birçok çalışma bulunmaktadır (51, 52, 53, 54, 55, 56).

DNA tamir genlerindeki polimorfizm çalışmaları, DNA zincir kırıklarının veya eklentilerinin kaldırılması ve mutajenik ajanlar tarafından yapılan kromozom hasarları gibi sitogenetik yaklaşımları içermektedir. DNA onarım kapasitesindeki bireysel farklılıklar sadece hastalıkların önlenmesinde değil aynı zamanda yeni teröpatik modellerin yapılması ve kişiye özel ilaçların yapılabilmesi için de yardımcı olmaktadır.

MN testi, DNA hasarının ölçümü için kullanılan yaygın bir yöntemdir. Bu test hem kromozom kayıplarının hem de kromozom kırıklarının genel bir ölçüm

şeklidir. Ayrıca, DNA onarımının fenotipe yansımaları görmek için de önemli bir biyomarkerdir.

Genomun devamlılığı ve onarımında oldukça önemli rol oynayan DNA tamir genlerindeki bazı polimorfizmler çeşitli yönleri ile birçok çalışmaya konu olmuştur. Çalışmamızda MN frekansı belirlenen hasta ve kontrol gruplarımızda bu genlerden üç tanesindeki dört farklı polimorfizm araştırılmıştır.

2.9. DNA Tamir Mekanizmaları

Prokaryotik ve ökaryotik canlılarda, DNA'ların korunup nesilden nesile aktarılabilmesi için çeşitli DNA onarım mekanizmaları bulunmaktadır. DNA onarımı ile mutasyonlar, replikasyon hataları, genomik kararsızlık azaltılabilir.

X-ışınları, UV, kimyasal ve çevresel ajanlar sebebiyle DNA bütünlüğü sürekli tehdit altındadır. Hücre metabolitleri olarak açığa çıkan serbest radikaller de DNA üzerinde hasara neden olur (57).

DNA tamir mekanizmaları, doğrudan DNA tamiri, eksizyon tamiri, rekombinasyonel onarım ve S.O.S onarımı olarak gruplandırılır. Üç farklı eksizyon tamiri vardır: Baz Kesip – Çıkartma Tamiri (Base Excision Repair, BER), Nükleotid Kesip – Çıkartma Tamiri (Nucleotide Excision Repair, NER) ve Yanlış Eşleşme Tamiri (Mismatch Repair, MMR) (58).

Şimdiye kadar, insanlarda yaklaşık 130 adet DNA tamir enzimi tanımlanmıştır (58).

Tamir enzimlerinde ve etkinliğinin azalmasına yol açacak bir polimorfizm, hücre içerisinde enzimin bulunduğu onarım yolunda duyarlılığa neden olacaktır. Bu çalışmamız kapsamında araştırdığımız DNA tamir genleri, BER ve NER mekanizmalarında görev almaktadır.

2.9.1. Doğrudan Onarım Mekanizmaları

2.9.1.1. Fotoreaktivasyon Onarımı

Bu onarım UV etkisiyle oluşan baz dimerlerini yok eder (özellikle primidin dimerleri). Enzim olarak sadece DNA fotoliyaz enzimi kullanılır. Çoğunlukla timin

dimerlerini hedef alır ve Timin dimerinin bulunduğu DNA bölgesine bağlanarak dimeri monomer haline dönüştürür. Bu işlem için görünür ışığı (özellikle mavi ışık), kovalent bağları kırmak üzere kullanır.

Yaygın bir onarım sistemidir, bakterilerin çoğunda bulunur ancak, insan ve diğer pleentalı memelilerde henüz bulunmamıştır (59).

2.9.1.2. Metil Gruplarının Yok Edilmesi

Alkillenme reaksiyonlarıyla bazlara ve fosfatlara metil grupları eklenir. Bu eklenme en çok G bazının 6. konumundaki oksijenin metillenmesi şeklindedir. Bu metil grupları bir almaç proteine aktarılarak yok edilir. Metil transferaz reaksiyonunda katalizör olarak O₆alkilguanin transferaz görev alır. Enzimin işlevi; G→A ve T→C dönüşümlerini engellemektir. Alkilguanin transferaz (AGT), timin O₄ ile guanin O₆ pozisyonundaki alkil gruplarını uzaklaştırma yeteneğindedir. Alkil grupları dealkalasyon için, AGT ile sistein gruplarına bağlanarak metillenme hatalarını düzeltir.

Metilguanin transferaz, ekonomik bir yöntem değildir. Çünkü; yok edilmesi gereken her metil grubu için yeni bir enzim gerekir ve enzim sayısı kadar onarım reaksiyonu gerektirir. Hücre için pahalı bir yöntemdir (59, 60, 61).

2.9.2. Kesip-Çıkarma ile DNA Onarımı

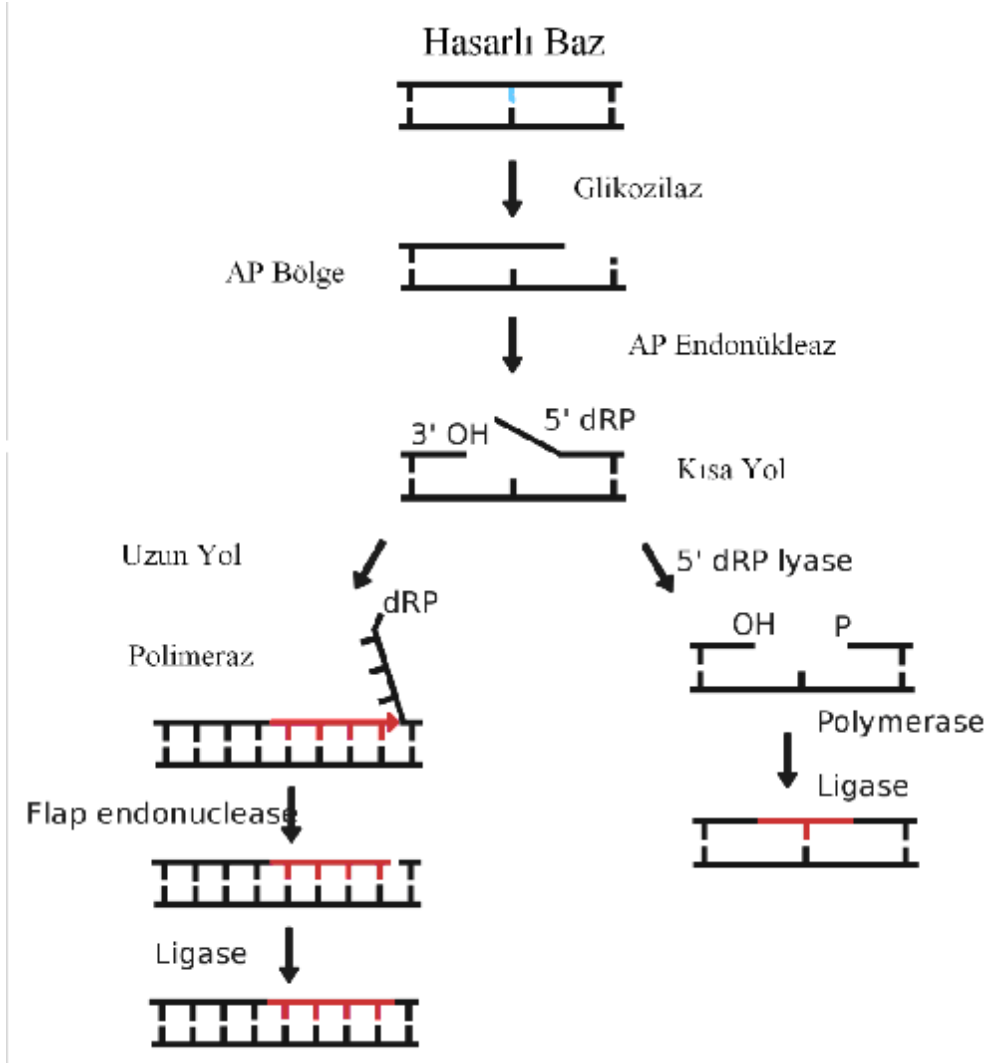
Kesip çıkarma onarımı birçok kimyasal reaksiyon sonucu oluşan hatalar için genel bir onarım sistemidir. İlk defa UV ile oluşan siklobütan timin dimerlerinin uzaklaştırıldığı bir sistem olarak *Eschericia coli*'de keşfedilmiştir (62). Sonuç olarak bu onarım sisteminin değişik tipleri hem prokaryot hem de ökaryotlar için en önemli onarım sistemidir.

Üç çeşit kesip-çıkarma onarım sistemi vardır: Baz kesip-çıkarma onarımı, nükleotid kesip çıkarma onarımı ve hatalı eşleşme onarımıdır (63).

2.9.2.1. Baz Kesip-Çıkarma Onarımı (BER)

BER ile okside/redükte, alkillenmiş, deamine olmuş veya yanlış yerleştirilmiş bazların onarımı gerçekleştirilir. BER mekanizması iki alt yolak ile gerçekleşebilir; kısa yolakta tek nükleotidlik bir değişim yapılır, uzun yolakta ise 2-10 nükleotidlik hasarlı bölge onarılır (64, 65).

BER mekanizması için ilk adım olarak, DNA glikozilazlar hatalı bazların olduğu bölgeyi tanır. Monofonksiyonel olan DNA glikozilazlar tarafından hatalı baz sadece uzaklaştırılıp apürinik veya apirimidinik bölge oluşturulur. Bifonksiyonel olan DNA glikozilazlar ise liyaz aktivitesi sayesinde hatalı bazı ayırıp AP liyaz aktivitesini katalizleyebilirler. Apürinik veya apirimidinik bölge *APE1* endonükleaz tarafından zincirden çıkartılır (Şekil 2.8.). Arkasından DNA polimeraz ile boşluklar doldurulup DNA ligaz ile birleştirilerek onarım tamamlanır. BER mekanizması için ayrıca uzun yolak olarak geçen bir şekilde, *XRCC1-PARP* (poli ADP riboz polimeraz), tek zincir kırıklarına bağlanıp süreci başlatabilir (66).



Şekil 2.8. Baz eksizyon onarımı (67)

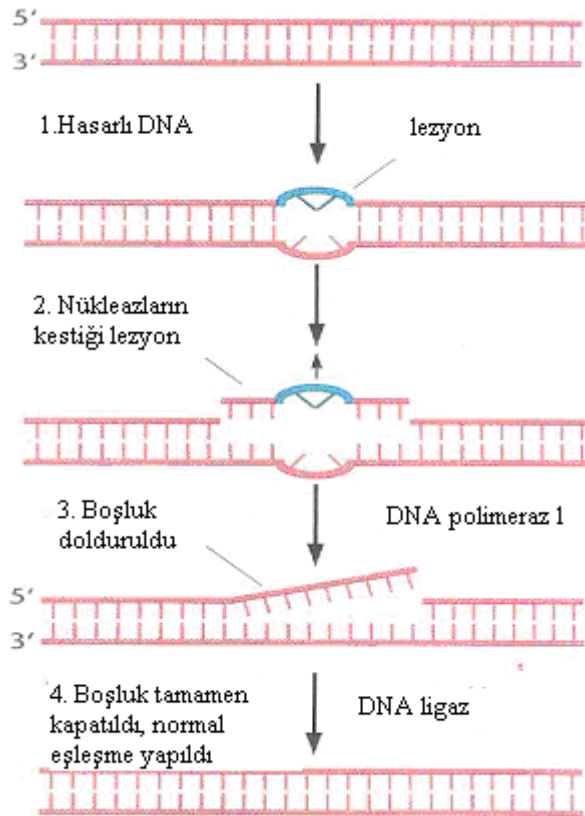
2.9.2.2. Nükleotid Kesip Çıkartma Onarımı

Baz kesip-çıkarma onarımından farklı olarak, bu sistemde çalışan enzimler, zarar gören bölge veya zarar tipini tanıyamazlar. Timin dimerleri ya da büyük eklentiler dolayısıyla DNA sarmalında oluşan bükülmeler, katlanmalar gibi daha genel özellikleri tanır ve işlevlerini gerçekleştirirler.

NER tamiri için, iki sarmal içinde bulunan çıkıntılar veya diğer düzensizlikleri aramak için bazı proteinlerin DNA çift sarmal molekülünü boyunca kayma yeteneği olması anahtar rol oynar (59).

İlk kez *E.coli*'de UV radyasyonuna duyarlılık gösteren bazı bağımsız mutantlar üzerinde gösterilmiş bir mekanizmadır. Uvr (Ultraviole onarımı) olarak tanımlanmış bu grup, *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* mutasyonlarını kapsar. Uvr gen ürünleri, mutasyonların tanınıp kesilmesi ile ilişkilidir. Onarım daha sonra DNA polimeraz I ve DNA ligaz ile tamamlanır (Şekil 2.9.). Onarım sırasında prokaryotlarda 12, ökaryotlarda 28 baz kesilip çıkartılır.

Memelilerde ise uvr gen gruplarına benzer genler eşliğinde benzer bir mekanizma tanımlandı. NER onarımı iki alt mekanizma ile meydana gelir: Global genom tamir yolu (GGR, Global Genom Repair) ve transkripsiyona kenetlenmiş tamir yolu (TCR, Transcription-coupled repair)' dur (59).



Şekil 2.9. Nükleotid eksizyon onarımı (68).

2.9.2.2.1. Global Genom Onarımı

NER mekanizmasında, XPC proteini DNA hasarında duyarlı olan sentrin 2 ve HHR23B ile kompleks yaparak DNA'ya bağlanır ve DNA sarmalı kısmen açılır. Böylece diğer tamir genleri bölgeye toplanabilirler. XPA, DNA hasarında doğrulamayı yapar. XPA'nın işlevi TFIIH aktivitesine destek olmak ve DNA eklentilerini sabitlemektir. Replikasyon faktör A, XPA ile kompleks oluşturur. Hasar tanıma arkasına, TFIIH de komplekse katılır ve sarmal daha çok açılır. XPB 3' →5' ve XPD 5' →3' helikaz aktivitesine sahiptir. TFIIH helikaz aktivitesiyle de DNA zinciri 20-30 nükleotid açılır. Arkasından, endonükleaz aktivitesi olan XPG, zinciri 3' bölgesinden DNA hasarına 5-6 nükleotid uzaktan keser. XPF proteini ERCC1 ile kompleks oluşturur ve zinciri 5' bölgesinden hasara 20-22 nükleotid uzaktan keser. Böylece geniş bir oligonükleotid bölgesi serbest kalır. Serbest kalan oligonükleotidler XPC/HHR' B proteini aracılığıyla uzaklaştırılır. Boşluk yine DNA polimeraz I ile doldurulur ve DNA ligaz ile birleştirilerek hasar onarılır (57, 64).

2.9.2.2.2. Transkripsiyona Bağlı Onarım (TCR)

Transkribe olacak olan kalıp DNA üzerinde oluşan hata ile RNA polimeraz aktivitesi ve transkripsiyon durdurulmuş olabilir. Nükleotid kesip-çıkarma onarımı ile bu hata da düzeltilebilir. TCR içerisindeki fark DNA hasar tanınmasında XPC/HHR23B kompleksi yerine CBS (sistationin beta sentaz) proteini görev alır. Bu kompleks RNA polimeraz II'yi ubiquitinleyerek parçalanmasını ve sonucunda uzaklaşmasını sağlar. Böylece hasarlı bölgeye TFIIH, XPA ve RPA proteinleri ulaşabilir. Geri kalanı ise global onarım ile aynı şekilde gerçekleşir (68).

2.9.2.3. Yanlış Eşleşme Tamiri (Mismatch Repair, MMR)

Bu tamir sistemi prokaryot ve ökaryotlarda tanımlanmış ve en iyi bakterilerde açıklanmıştır. Bu sistem ile yanlış eşleşen bazlar bulunup ortadan kaldırılarak DNA sentezinin doğruluğu 2-3 kat daha artar. *E.coli*'de oldukça ayrıntılı bir şekilde çalışılmıştır. *E.coli*'de onarımı yapmak üzere atasal olan DNA ipliği ile yeni sentezlenen DNA ipliğini birbirinden ayırt edebildiği gözlenmiştir. Bunun için,

GATC dizilerinde yer alan adeninler 6-metiladenin oluştururlar ve metillenme replikasyondan sonra gerçekleştiği için yeni sentezlenen zincirde metillenme görülmez ve böylece farklılık oluşur, tanınabilir.

Yanlış eşleşme onarımında ilk olarak, MutH endonükleazı metile olmamış olan ipliği GATC dizisinden keser. MutS ve MutL enzimleri de bir endonükleaz ve helikaz ile birlikte kırık olan bölge ile yanlış eşleşen bölge arasındaki DNA parçasını çıkartırlar ve boşluk DNA polimeraz ile doldurulup DNA ligaz ile birleştirilir.

Ökaryotlardaki yanlış eşleşme onarımında, MutS, MutL ve MutH yerine homologları bulunur. Metillenme gibi yeni ve eski zinciri ayırt etmesi ile tanıma mekanizması yoktur ancak genel olarak tamir işlemi, homologları ile yapılanla aynıdır (68).

2.9.3. Rekombinasyonel Onarım (Replikasyon Sonrası Onarım)

DNA onarımının bir başka tipi de rekombinasyonel onarımdır. DNA, hasarsız olan molekülle arasında parça değişimi yapar bu yüzden bu mekanizma rekombinasyon temeline dayanır ve replikasyondan sonra etkili olduğu için replikasyon sonrası onarım da denmektedir. Timin dimerleri veya diğer lezyonların hasar tamirinde sıkça kullanılır (68). Örneğin, ipliklerden birisinde oluşan timin dimeri NER mekanizması ile düzeltilememişse, DNA sentezi sırasında replikasyon çatalı oluştuğunda bozulma ile o bölgedeki kusurlu iplik kalıp olarak kullanılamaz. Bu durumda DNA polimeraz hata bölgesinde duraksar veya üzerinden atlar ve replikasyona ileriden devam eder. Sonucunda biri hatalı birisi normal olarak bulunan iki molekül birbirinden farklıdır. Bu durumda sağlam iplik hatalı bölge için kullanılır ve zarar gören bölge karşısındaki boşluk sağlam bölgedeki homoloğu ile doldurulur. Sağlam iplik tekrar DNA polimeraz ile doldurulur ve hasar düzeltilir (67). Rekombinasyonel onarım ayrıca iyonize radyasyon veya bazı kimyasallar ile oluşan çift zincir kırıklarının onarımı için de kullanılan bir mekanizmadır.

2.9.3.1. Çift Zincir Kırık Onarımı (DSBR, Double Strand Break Repair)

Çift zincir kırığı için en önemli neden iyonize radyasyon (X-ışını)'dur. Çift zincirde birden oluşan kırıklar ile DNA hasarı en yıkıcı hasara uğrar. Onarılamazsa

hücre ölümü, kromozom kırıkları gibi durumlar oluşabilir. Yanlış onarılması durumunda ise kansere neden olabilir (69). Çift zincir kırık onarımı için iki mekanizma kullanılabilir: Homolog uçların birleşmesi ve homolog olmayan uçların birleşmesi

2.9.3.1.1. Homolog Uç Birleşmesi

Hata olan iplik ile zarar görmemiş olan iplik arasında gerçekleşen bir rekombinasyon vardır. Hücreler içerisinde aynı DNA sarmalından iki tane bulunması özelliğinden yararlanır. Sağlam DNA sarmalındaki dizi rekombinasyon ile kırık olan bölgeye aktarılır ve çift iplik kırıklı moleküldeki iplikler iki DNA arasındaki karşılıklı parça değiş tokuşu ile uzar işlem bitince bağlantı çözülür replikasyon çatalı normal ilerlemeye devam eder.

Homolog uç birleşmesi özel proteinler gerektirir. Bu onarım sistemi *E.coli*'de *RecBCD* yoluyla gerçekleşir. Ökaryotlarda ise, *Rad* gen ailesi homolog uç birleşmesi ile yapılan rekombinasyon onarımında görevlidir. Özellikle *Rad52* grubundaki genler çift iplik kırık onarımında aktiftir (59, 69).

2.9.3.1.2. Homolog Olmayan Uç Birleşmesi

Homolog bir kromozomdan faydalanmaksızın DNA uçlarının bağlanması biyokimyasal şeklidir. DNA'nın iki ucu, kırık uçlarından dışa doğru çıkıntılar oluşturur ve tekli iplikler birbirleriyle bağlanabilirler. Bazı bazlar arasında bağlanma olabilir bu oldukça kısıtlıdır. Daha sonra tek iplik uçlar nükleazlar tarafından yok edilir, boşluk da DNA polimeraz ile doldurulur (59, 69).

Homolog olmayan uç birleşmesinde görevli Ku proteinleri tanımlanmıştır. DNA'daki kırık uçları bir araya getirir, o bölgeleri proteazlara karşı korur ve onarım proteinlerinin bölgeye toplanmasını sağlarlar.

Homolog olmayan uç birleşmesi sırasında, kırılma bölgesinde uçların bağlanabilmesi için baz kayıpları gerçekleşebilir. Hata eğilimli bir onarım sistemidir. Buna karşın, insanda yaygın kullanılan bir sistemdir. Memelilerde protein şifreleyen genler genomda çok az yer kapladıkları için, genomun büyük kısmı zarar görmez ve kromozomların yapısı korunmuş olur (59).

2.9.4. SOS Onarımı

E.coli'de, UV radyasyonu, baz analogları gibi kimyasal ajanlar DNA üzerinde hasar yaptıkları zaman SOS denilen bir sistem harekete geçer. Normal zamanda *Lex A* gen proteini SOS sisteminde görev alan genlerin operatör bölgelerine bağlanarak inhibe eder. Ancak hasar oluşumuna dair bir uyarın gelirse, *Rec A* geni aktive edilir. Aktif olan *Rec A* geni, *Lex A* proteinin yıkılmasına neden olur. *Lex A* geninin yıkılması ile baskıladığı genler aktifleşir ve SOS onarımı çalışır. Hasar onarımından sonra *Lex A* yıkımı durdurulur. Ve baskılanma tekrar aktifleşir. Rekombinasyonel onarımda olduğu gibi boşluk atlanarak sonra düzeltilmeye çalışılmaz. Hata olan bölgede doğru bazlar yerine tesadüfi de olsa bazlar yapıya anında eklenir ve replikasyonun doğruluğundan fedakarlık edilerek uyum sağlanır. Bu nedenle sistem hataya meyilli olarak tanımlanır (70).

2.10. DNA Onarım Genleri

Bu bölümde DNA tamir genlerinden yalnızca çalışmamıza dahil ettiğimiz genler; *APE1* Asp148Glu, *XRCC1* Arg194Trp, *XRCC1* Arg399Gln ve *XPB* Lys751Gln genleri ve polimorfizmleri açıklanmıştır.

2.10.1. *APE1* (Apürinik/Apiriminik endonükleaz I)

APE1 (Apürinik/Apiriminik Endonükleaz I) geni, kromozomun 14q11.2-q12 bölgesinde yerleşmiştir. Yaklaşık olarak, 2.6 kilobazdır ve 5 ekzon bölgesi içerir (71). Bu genin ürünü olan protein 317 aminoasitten oluşur ve 35 kDa ağırlığındadır.

APE1, DNA baz eksizyon onarım mekanizmasında önemli bir rol oynar. DNA eklentilerinin düzeltilmesinde, okside ve redükte olan bazların düzeltilmesinde ve metillenme ile ilişkili ajanların üretiminde işlevi vardır. DNA üzerinde hatalı olan bazın çıkartılmasıyla boş kalan abazik bölgede BER sürecini başlatır.

APE1 geninin 5. ekzonunda G→T değişikliği sonucu aspartik asitin glutamik aside dönüşümü (Asp148Glu) ve 3. ekzonda glutamik asitin histidine değişmesine neden olan C→G değişikliği (Gln51His) gibi tek nükleotid polimorfizmleri (SNP)

sıklıkla çalışılanlardandır ve bu polimorfizmlerin enzim fonksiyonu üzerinde de değişikliğe neden olduğu bildirilmiştir (72).

Bazı çalışmalar ile akciğer, ovaryan gastroözafagol ve osteosarkoma kanserleri ile de ilişkili olduğu bildirilmiştir (72, 73, 74, 75).

2.10.2. XPD (Xeroderma pigmentosum grup D)

Xeroderma pigmentosum grubunda 7 adet gen tanımlanmıştır. Bu genler nükleotid eksizyon onarımında görev alırlar. Bizim çalıştığımız *XPD* geni, kromozomun 19q13.3 bölgesinde lokalizedir. Yaklaşık olarak 19 kilobazdır ve 23 ekzon bölgesi içerir. Bu genin ürünü olan protein 760 aminoasitten oluşur ve molekül ağırlığı 87 kDa'dur.

XPD geni, NER ile timidin dimerleri gibi lezyonları tamir eder. TFIIH kompleksine bağlanarak 5' →3' helikaz aktivitesi gösterir.

XPD geninde oldukça fazla SNP belirlenmiştir ancak bunlardan sıklıkla iki tanesi çalışmıştır. *XPD* Asp321Asn polimorfizmi ile *XPD* Lys751Gln polimorfizmleri incelenmiştir. *XPD* Lys751Gln polimorfizminde 23.ekzonunda G →T olan bir değişim ile Lizin aminoasiti Glutamine dönüşür. Ve bu değişimin düşük DNA tamir kapasitesine neden olduğu düşünülmektedir (76, 77).

XPD Lys751Gln polimorfizmi ile fırında çalışanlarda ve *in vitro* olarak incelendiğinde vinil klorid monomerine maruz kalanlarda artmış MN frekansı belirlenmiştir (78). *XPD* polimorfizmlerinin ayrıca kafa boyun kanserleri, melonama deri kanserleri ve akciğer kanserleri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (79).

2.10.3. XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein grup 1)

XRCC1 geni kromozomun 19q13.2-q13.3 bölgesinde lokalize olmuştur. Yaklaşık olarak 33 kilobazdır ve 17 ekzon bölgesi içerir. Bu gen ürünü olan protein 633 aminoasitten oluşur ve moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 70 kDa'dur (60).

XRCC1, BER mekanizması üzerinde, DNA glikozilaz tarafından DNA hasarı sonucu oluşturulan abazik bölgede, *APE1*, DNA polimeraz β, DNA ligaz III ve poli-ADP-riboz polimeraz (*PARP-1* ve *PARP-2*) ile kompleks yaparak iskele görevi

görür. *XRCCI*, NER mekanizmasında da önemli bir rol oynar ve *NHEJ* geni ile beraber tek zincir kırıklarının tamirinde de rol oynadığı düşünülmektedir (13).

XRCCI geni için oldukça fazla SNP bildirilmiştir. Bunlar arasında özellikle kodon 280, kodon 194 ve kodon 399 çalışılmıştır. *XRCCI* Arg194Trp polimorfizminde C → T değişimi sonucunda Arjininden, Triptofana bir değişim gerçekleşir ve *XRCCI* Arg399Gln polimorfizminde ise G→A değişimi ile Arjinin, Glutamin değişimi olmaktadır (80).

Yapılan bazı çalışmalar ile kodon 399Gln allelinin yüksek mutajen duyarlılığı ve artmış seviyede DNA eklentileri ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Butadine maruz kalan Çinli işçilerde, artmış seviyede MN frekansı ve *XRCCI* Arg194Trp, *XRCCI* Arg399Gln gen polimorfizmleri arasında ilişki bulunmuştur (81). Başka bir çalışmada vinil klorid monomerine maruz kalma sonucu artan MN frekansı ile *XRCCI* Arg194Trp arasında ilişki tespit edilmiştir (73). Ayrıca, yine bazı çalışmalar sonucunda *XRCCI* 399 varyantının, kafa-boyun kanseri, akciğer kanseri, kolorektal kanser ve göğüs kanseri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (13, 82).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada 25-55 yaşlarında, sigara içmeyen, metabolik ve genetik hastalığı olmayan kronik hepatit B hastaları ile kontrol grubu olarak çalışma grubuyla benzer yaş grubu (25-55) özelliği gösteren, sigara içmeyen, metabolik ve genetik hastalığı olmayan sağlıklı bireyler alındı. Enfeksiyon Hastalıkları ve Gastroenteroloji bölümlerine başvuran kronik hepatit B enfeksiyonlu hastalar, demografik özellikleri, sigara, alkol kullanım durumları ve tenofovir kullanım durumlarını içeren “hasta kayıt formu”na kaydedildi. Çalışmaya dahil edilen hastalardan 5 ml heparinle yıkanmış enjektörle ve 3 ml EDTA’lı tüplerde kan örnekleri alınarak tenofovir kullanım sürelerine göre gruplandırıldılar ve tenofovirin genotoksik etkileri kontrol grubu ile karşılaştırılarak araştırıldı.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

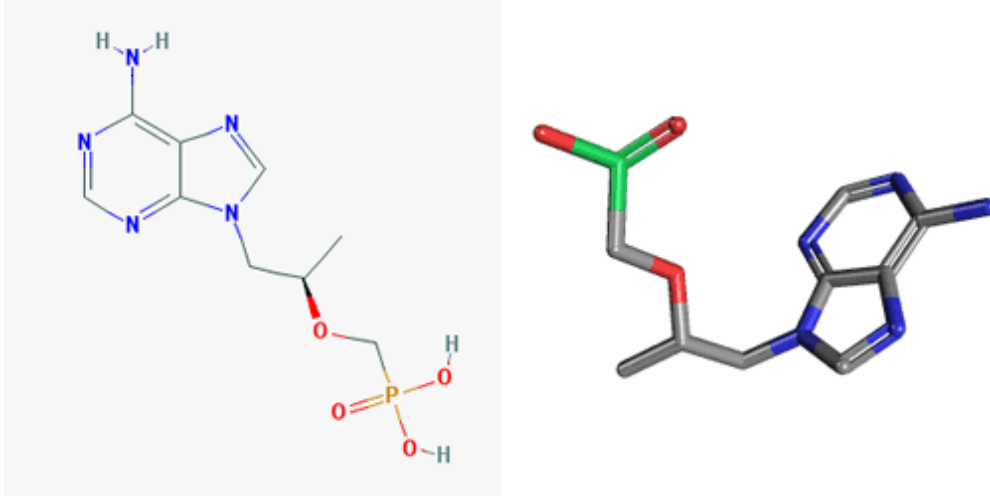
3.1.1.1. Tenofovir disproksil fumarat

Ticari Adı: Viread, Tenoviral, Zentovir

Kimyasal Adı: 9-((r)- 2-((bis(((isopropoxycarbonyl) oks) metoksi) fosphinyl) metoksi) propil) adenin fumarat

Kapalı Formülü: C₉H₁₄N₅O₄P

Açık Formülü:



Moleküler Ağırlığı: 287.212322 [g/mol]

Milli Tıp Kütüphanesi kayıt numarası (CAS No): 147127-20-6

3.1.1.2. Kromozom Medyumu

Bu çalışmada Peripheral Blood Karyotyping Complete Medium (Bio.End., 01-201-1B), hücre kültürü için kullanıldı. Bu medyum her tüpe 5 ml olacak şekilde paylaştırıldı ve bu miktarlarda kullanıldı. Kültür tüpleri steril olarak temin edildi.

3.1.1.3. Hipotonik

Hipotonik olarak 0,040 M' lık KCl kullanıldı. Her preparasyondan yaklaşık 2 saat önce yeteri kadar miktar hazırlanıp kullanım amacına göre 37 °C'deki inkübatörde bekletildi.

3.1.1.4. Fiksatif

MN için yapılan çıkarımda iki farklı fiksatif kullanıldı. İlk fiksatif 1 birim glasiyal asetik asitin 5 birim metanol ile karıştırıldıktan sonra 1/1 oranında % 0,9 NaCl ile seyreltilmesiyle hazırlandı. Diğer fiksatifler ise NaCl ilave edilmeden, 1

birim glacial asetik asitin 3 birim metanol ile karıştırılması ile hazırlandı. Fiksatif, her seferinde preparat yapım işleminden iki saat önce hazırlanıp +4 °C’ de saklandı.

3.1.1.5. Giemsa

Giemsa boyası (Merck, 9204) distile su içinde % 6’lık boya eriyiği olarak hazırlandı ve preparatların boyanmasında kullanıldı.

3.1.1.6. Entellan

Preparat kapatma solüsyonudur (Merck, 7961). Preparatlar daimi hale getirilirken lam ve lamelin birbirlerine yapıştırılmasında kullanıldı.

3.1.1.7. DNA İzolasyon Kiti

DNA izolasyonu için, Roche Diagnostic, GmbH, Mannheim, Germany manuel izolasyon kiti kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları

3.1.2.1. Hassas Terazî

Kimyasalların tartılmasında 0,001 gr hassasiyetindeki terazî (Precisa) kullanıldı.

3.1.2.2. Santrifüj

Rotor çapı 21 cm olan ve 4000 rpm’ye kadar yükselebilen devir hızı, 99 dakikalık zaman ayarlayıcı ve 28 tüp kapasiteli santrifüj (Hettich Universal) çalışmalarda kullanıldı.

3.1.2.3. Mikroskop

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan binoküler ışık mikroskobu (Carl Zeiss) preparat incelemeleri sırasında kullanıldı.

3.1.2.4. İnkübatör

Hücrelerin 37 °C’de inkübe edilmesi için inkübatör (Nüve EN500) kullanıldı.

3.1.2.5. Flow Kabin (Steril Kabin)

Hücre kültürü tüplerine kan ekiminin yapılması, test solüsyonlarının hazırlanması ve kültür tüplerine ilave edilmesi sırasında steril bir ortam olarak, % 99,9 partikül tutma özellikli filtreye sahip, UV ve floresan ışığı olan flow kabin (Labormed) kullanıldı.

3.1.2.6. Su Banyosu

Hücre kültürünü hazırlamak amacıyla kullanılan donmuş besiyerini eritmek amacıyla 0-60 °C’ye ayarlanabilir su banyosu (Memmert) kullanıldı.

3.1.2.7. Vorteks

Vorteks, harvest işleminde hipotonik ve fiksatif eklenme aşamasında kullanıldı.

3.1.2.8. Isı Bloğu

DNA izolasyonu sırasında Biosan marka ısı bloğu kullanıldı.

3.2. Çalışma Planı

Araştırma, iki çalışma grubu ile yürütüldü. 1. grup sağlıklı bireylerden oluşan bir kontrol grubu iken, 2. grup tenofovir kullanım süresine bağlı olarak (günlük 245

mg x 1) kronik hepatit B hastalarından oluşturuldu. Hasta grubundan oluşan 2. Grup içerisinde; hepatit B tanısı almış ancak ilaç kullanmayan hastalar grup A, 6 ay ilaç kullanan hastalar grup B ve ilacı 12 ay kullanan hastalar grup C olarak gösterildi (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. Deney grupları.

Gruplar		Denek Sayısı
Sağlıklı Kontrol Grubu		15
Hasta Grubu	Grup A (Tedavi görmeyen HBV hastaları)	10
	Grup B (0-6 ay tenofovir kullanmış HBV hastaları)	10
	Grup C (12+ ay tenofovir kullanmış HBV hastaları)	10

Hasta ve kontrol grubundaki her bireyden periferik venöz kan örneği 5 ml heparinle yıkanmış enjektör ve 3 ml EDTA'lı tüplerde alındı. Alınan örnekler üzerinde sitogenetik ve moleküler analizler yapıldı. Sitogenetik olarak MN sayısı ile MI incelendi ve moleküler olarak; DNA izolasyonu yapıldıktan sonra gerçek zamanlı PZR (Real Time PCR) ile *APE1* Asp148Glu, *XRCC1* Arg194Trp, *XRCC1* Arg399Gln ve *XPD* Lys751Gln tamir genlerinin polimorfizmleri incelendi.

3.3. Sitogenetik Analizler

3.3.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Hasta ve kontrol gruplarındaki bireylerden 1/10 oranında heparinize edilmiş enjektör ile 5cc olarak alınan kan örnekleri 5'er ml'lik kromozom medyumlarına steril şartlarda 0,4 ml ekildi. Hücreler inkübatörde 37 °C'de 72 saat için inkübasyona bırakıldı (83).

72 saatlik kültür sonunda MN ve MI incelemesi için çıkarım (harvest) işlemi uygulanarak preparatlar boyamaya hazır hale getirildi. Kültür süresi olan 72. saatin bitiminde kültür tüpleri 1700 rpm'de 10 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0,5-0,7 ml'lik sıvı pellet vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra tüplere etüvde 37 °C'de tutulan hipotonik eriyik ilave edildi. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve vorteks ile karıştırılarak yapıldı. Her tüpe 8 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak 7 dakika inkübatörde bekletildi. Sürenin sonunda tüpler 10 dk 1700 rpm'de santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Hipotonik eriyik ilavesi gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 6 ml soğuk fiksatif ve NaCl çözeltisi 1:1 oranında ilave edildi. Hücreler 1700 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere fiksatif ilave edildi. Bu işlem 3 kere tekrarlandı. 3. fiksatif muamelesinin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görüldü. Eğer sıvı berraklaşmamışsa tekrar fiksatif muamelesine devam edildi. Son santrifüjden sonra dipte 0,5-0,7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra preparat hazırlama işlemine geçildi. Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirildi. Pasteur pipetine 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekildi. Pasteur pipetinden, daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanmış lamların üzerine 50-75 cm yükseklikten farklı alanlara 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 3-4 damla) hücrelerin lam üzerinde yayılması sağlandı. Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edildi. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda ısısında bekletildi (84).

3.3.2. Preparatların Boyanması

Hazırlanan preparatlar % 5'lik giemsa boyası ile 10 dakika boyunca boyandı. Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarıldı, üç ayrı kaptaki saf su içinden geçirilerek preparatlar üzerindeki fazla boyanın akması sağlandı. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette konularak kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirildi. Entellan kuruduktan sonra bu daimi preparatlarda mikroskopik incelemeler yapıldı (43, 68).

3.3.3. Mikroskopik İnceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar Carl Zeiss ışık mikroskopunda 40'lık objektif ile incelendi (x400). Bu incelemeler sırasında her bir bireyden hazırlanan preparatlardan MN analizi için 1000 hücre; MI analizi için 3000 hücre sayıldı, bu verilerden MN yüzdesi belirlendi (85).

3.3.3.1. MN Sayısının Saptanması

MN ayırımı Fenech (2003) tarafından belirlenen kriterlere göre yapıldı. Bu kriterlere göre;

1. Ana nükleus ve MN, nükleus zarıyla çevrili yuvarlak ya da oval olmalıdır,
2. MN'ler ana nükleusun 1/3'ünden küçük ve 1/16'sından büyük olduklarında değerlendirilmelidir,
3. MN'ler ana nükleus gibi boyanmalıdır,
4. MN'ler ana nükleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır.

MN'nin hesaplanması kimyasal veya fiziksel bir maddenin sitotoksik etkisini göstermede önemli bilgiler sağlar (86). MN için her preparatta toplam 1000 hücre sayıldı.

3.3.3.2. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

Tenofovirin mitoz bölünme üzerindeki etkilerini belirlemek amacı ile MN için hazırlanmış preparatlarda toplam 3000 hücre incelendi ve bunlar arasında mitoz bölünme geçiren hücrelerin sayısı kaydedildi. Mitoz geçiren hücrelerin oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanarak yüzde cinsinden MI belirlendi (83).

MI= Metafazdaki hücre sayısı (M) x 100 / N

N: Toplam hücre sayısı

3.4. Moleküler Analizler

3.4.1. DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu için, çalışma gruplarındaki bireylerden alınan 2 ml periferik kan, antikoagulant olarak EDTA içeren tüplere alındı. DNA izolasyonu için “High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics Mannheim, Germany)” kullanıldı.

Her hasta için:

- 200µl Elution Buffer, ependorfa eklenerek, son işlemde kullanılmak üzere ısı bloğunda 70 °C’de bekletildi.
- 200 µl kan ependorf tüplerine konuldu.
- Kanın üzerine 200 µl Binding Buffer eklendi.
- 40 µl Proteinaz K eklendi.
- Karışım vortekslendikten sonra 70°C ısı bloğunda 10 dakika bekletildi.
- Isı bloğundan alındıktan sonra, 100 µl izopropanol eklenerek karıştırıldı.
- Tüm karışım filtreli tüplere aktarıldı ve 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj sonrasında kolonun altındaki kolleksiyon tüpü atıldı ve yeni kolleksiyon tüp takıldı.
- 500 µl Removal Buffer eklendi. Ve 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj sonrasında kolonun altındaki kolleksiyon tüpü atılır ve yeni kolleksiyon tüp takıldı.
- İki kez 500 µl Wash Buffer eklenerek yıkama işlemi tekrarlandı.
- En son ısı bloğundaki Elution Buffer eklenip santrifüj işlemi tekrarlandı ve DNA’nın filtreden alt tüpe geçmesi sağlandı.
- Tüpte izole olan DNA ependorf tüpüne konularak istenildiği zaman kullanılmak üzere -20°C’de bekletildi.

3.4.2. Gerçek Zamanlı PZR (PCR)

Polimorfizmlerin belirlenmesi için ilgili gen bölgesi bir çift primer ve floresan-isaretli prob kullanılarak çoğaltıldı. Bu aşamada LightSNiP assay (TIB-MolBiol, Berlin, Germany) ve “LC™ LightCycler FastStart DNA Master HybProbe Kit” kullanılarak LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) cihazında erime eğrisi analizine göre yapıldı. Reaksiyon karışımı bir hasta için 20 µl hacimde 5 µl genomik DNA, 2 µl LC™ FastStart DNA Master miks, 1 µl of reagent mix, 1.2 µl of MgCl₂ (25 mM) and 10.8 µl H₂O olmak üzere hasta sayısına uygun olarak hazırlandı ve cam kapiler tüplere dağıtıldı. Kapilerler kapatılarak cihaza yerleştirildi.

Cihazın PCR programı; 95°C’de 10 dakika başlangıç denetürasyonunun ardından; 95°C’de 10 saniye denatürasyon, 60°C’de 10 saniye bağlanma ve 72 °C’de 15 sn uzamayı içeren 45 döngü olarak ve erime eğrisi analizi için, 95°C’de 20 sn denatürasyonu takiben ısı değişim oranı 20°C/sn olacak şekilde 40°C’ye kadar soğutma, sonra ısı değişim oranı 0.2°C/sn olacak şekilde 85°C’ye kadar tekrar ısıtma son olarak tekrar 40°C’de 30 sn son soğutma olacak şekilde ayarlandı.

Her mutasyon için olguların genotiplendirilmeleri, çalışma sonrasında oluşan erime derecelerine (melting temperature, T_m) göre belirlendi.

3.5. İstatistiksel Analiz

Sitogenetik analizler sonucunda elde edilen MN, MI, polinükleer ve nükleus anomalisi parametrelerine ait verilerin istatistiksel değerlendirmelerinde “Windows for SPSS Version 21” yazılım programı kullanıldı. Ölçülebilir veriler median, minimum ve maximum olarak sunuldu. Örneklem sayısı (n)≤50 olduğu için Shapiro-Wilk normallik testi ile değişkenlerin normal dağılım göstermediği saptandı (p<0.05). MN ve MI verilerinin gruplar arası karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis varyans analizi, Mann-Whitney U testi ve Conover testleri kullanıldı. P≤0.05, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Verilerden elde edilen moleküler analizlerin sonucuna göre; *APE1* Asp148Glu, *XRCC1* Arg194Trp, *XRCC1* Arg399Gln ve *XPD* Lys751Gln gen

polimorfizmlerinin kontrol ve hasta gruplarına ait genotip ve allel dağılımlarının karşılaştırılmasında çok gözlü ki-kare testi kullanıldı. *APE1* Asp148Glu, *XRCC1* Arg194Trp, *XRCC1* Arg399Gln ve *XPD* Lys751Gln gen polimorfizmleri ile mikronükleus frekansı ilişkisi Mann-Whitney U testi ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

Bulgular değerlendirilirken, hasta grubu içerisinde; hepatit B tanısı almış ancak ilaç kullanmayan hastalar grup A, 0-6 ay ilaç kullanan hastalar grup B ve ilacı 12+ ay kullanan hastalar grup C olarak gösterilmiştir.

4.1. Sitogenetik Analizlerden Elde Edilen Bulgular

4.1.1. Tenofovir Disoproksil Fumarat'ın Mikronükleus Oluşumu Üzerine Etkileri

Tüm parametreler için örneklem sayısı (n) ≤ 50 olduğundan dolayı normallik testi için Shapiro-Wilk testi kullanıldı. MN için yapılan normallik testi sonucuna göre gruplar arasında normal bir dağılım olmadığı saptanmıştır.

MN sıklığını incelemek üzere MN değeri yüzde (%) olarak hesaplandı. Kontrol grubunda karşılaştırmada kullanılmak üzere median 0,100 bulunurken; Hasta grubu içerisinde; Grup A'da 0,200, Grup B'de 0,350 ve Grup C'de 0,200 olarak bulundu. Tüm hasta grupları birlikte kontrole göre kıyaslandığı zaman istatistiksel olarak aralarında anlamlı fark olduğu tespit edilmiştir ($p < 0.05$) (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Kontrol grubu ve hasta gruplarından elde edilen periferik lenfositlerinde MN'li hücre yüzdesi.

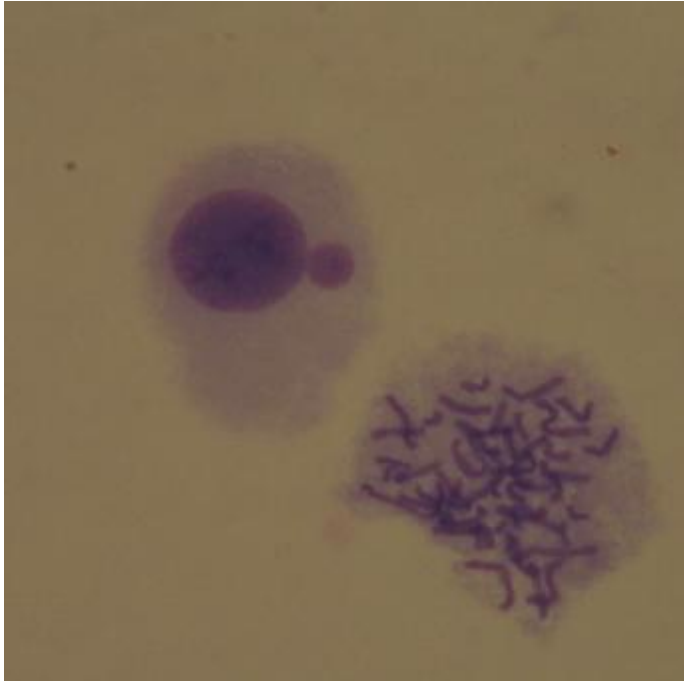
Gruplar		Mikronükleus	
		Median	(Min-Max)
Kontrol Grubu		0,100	(0,00-0,40)
Hasta Grubu	Grup A	0,200	(0,00-0,40)
	Grup B	0,350	(0,20-0,90)
	Grup C	0,200	(0,10-0,80)

Hasta grupları MN frekansı bakımından grup içi karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Dolayısı ile hastalık tanısı almış ancak ilaç tedavisi başlamamış hastalar ile ilaç tedavisi alan hastalar arasında önemli farklılık saptanamamıştır (Tablo 4.2.).

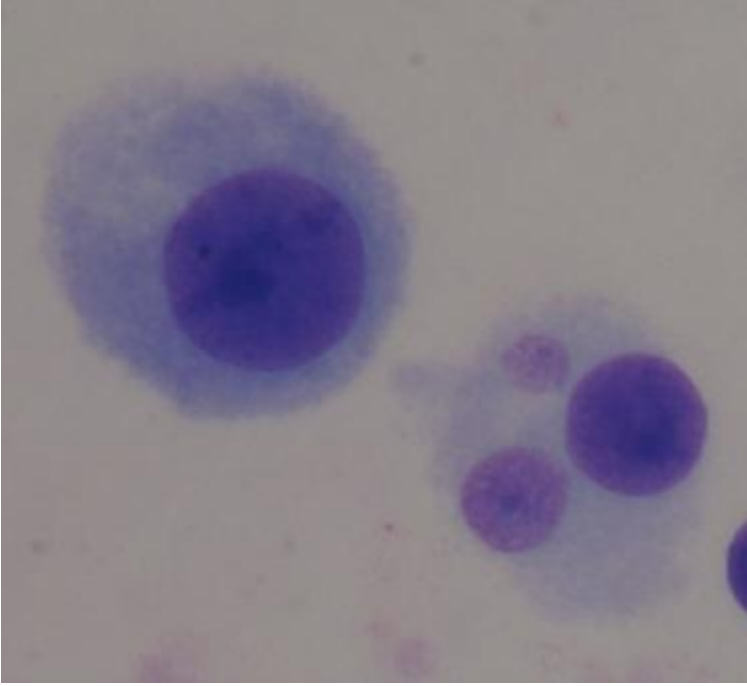
Tablo 4.2. Hasta gruplarının MN'li hücre yüzdesi.

Hasta Grupları	Mikronükleus	
	Median	(Min-Max)
Grup A	0,200	(0,00-0,40)
Grup B - C	0,250	(0,10-0,90)

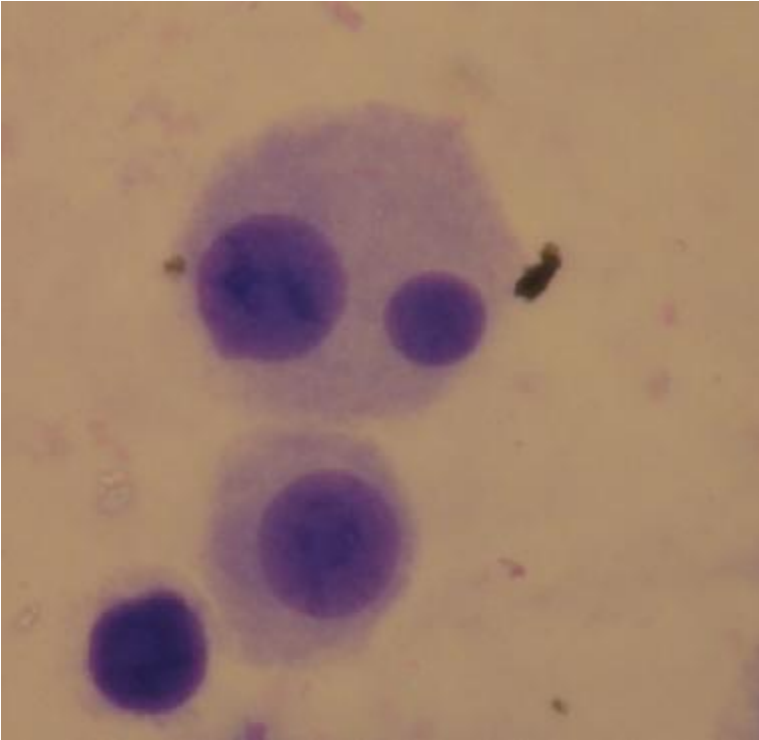
Yapılan mikroskopik incelemelerde tek mikronükleuslu ve çift mikronükleuslu hücrelere rastlanmıştır (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. MN içeren hücre ile mitoz bölünme geçiren hücre



Şekil 4.2. İki MN' li hücre



Şekil 4.3. MN içeren hücre

4.1.2. Tenofovir Disproksil Fumarat'ın Mitotik İndeks (MI) Üzerine Etkileri

Tenofovir'in mitoz bölünme üzerindeki etkisini belirlemek üzere MI değeri saptanmıştır. Mitotik indeks için gruplar normallik testi ile bakıldığında normal dağılım göstermediği bulunmuştur.

MI için karşılaştırma yapmak üzere kontrol grubu medianı 2,100; hasta grubu içerisinde Grup A 4,400; Grup B 3,450; Grup C 4,300 olarak bulunmuştur. Tüm gruplar MI'ya göre kıyaslandığı zaman aralarında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.3.).

Tablo 4.3. Kontrol grubu ve hasta gruplarından elde edilen periferik lenfositlerinde MI'lı hücre yüzdesi.

Gruplar		Mitotik İndeks	
		Median	(Min-Max)
Kontrol Grubu		2,100	(1,17-4,00)
Hasta Grupları	Grup A	4,400*	(3,33-7,17)
	Grup B	3,450*	(1,60-5,20)
	Grup C	4,300*	(2,70-7,27)

* Kontrol ile karşılaştırmada fark anlamlı. $p < 0,05$

MI' ya göre, hasta grupları arasında Hepatit B tanısı almış ancak ilaç kullanmayan hasta grubu ile ilaç kullanan hasta grubu karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Tablo 4.4.).

Tablo 4.4. Uygulama gruplarının MI'lı hücre yüzdesi.

Hasta Grupları	Mitotik İndeks	
	Median	(Min-Max)
Grup A	4,400	(3,33-7,17)
Grup B-C	3,865	(1,60-7,27)

4.2. Moleküler Analizlerden Elde Edilen Bulgular

4.2.1. *XPD* Lys751Gln Gen Polimorfizmi

İlaç kullanım süresine göre gruplandırılmış olan Hepatit B hastalarından oluşan hasta grupları ile kontrol grubundaki bireylerin *XPD* Lys751Gln polimorfizmi bakımından genotiplerini belirlemek üzere gerçek zamanlı-PZR çalışması yapılmıştır. *XPD* Lys751Gln polimorfizmi bakımından hasta ve kontrol gruplarımızdaki genotip ve allel dağılımları hesaplanmış olup Tablo 4.5. ve Tablo 4.6.'da verilmiştir.

Bulgularımıza göre; kontrol grubumuzda genotip frekansları Lys/Lys % 20, Lys/Gln % 60 ve Gln/Gln % 20 olarak belirlenmiştir. ($p>0.05$).

Hasta gruplarımızın genotip frekans oranları ise: Grup A'da Lys/Lys genotip frekansı % 20 Lys/Gln ve Gln/Gln genotip frekansları ise % 40 olarak belirlenmiştir. Grup B'de Lys/Lys genotip frekansı % 40, Lys/Gln ve Gln/Gln genotip frekansları % 30 olarak belirlenmiştir. Grup C'de Lys/Lys, Lys/Gln ve Gln/Gln genotip frekansları sırası ile % 30, % 60 ve % 10 olarak belirlenmiştir.

Genotip frekansları bakımından tüm gruplar elde edilen verilere göre istatistiksel olarak değerlendirildiğinde aralarındaki farkın anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$) (Tablo 4.5.).

İlaç kullanım süresine göre gruplandırılmış olan Hepatit B hastalarından oluşan hasta grupları ile kontrol grubumuzu oluşturan bireyler allel dağılımları bakımından da değerlendirilmiş olup sonuçlar Tablo 4.6.'da verilmiştir.

Elde edilen verilere göre; kontrol grubunda Lys allel frekansı % 50 ve Gln allel frekansı yine % 50 olarak hesaplanmıştır.

Hasta grupları içerisinde Grup A'da *XPD* kodon 751, Lys allel frekansı % 40 Gln allel frekansı % 60 Grup B'de Lys allel frekansı % 55, Gln allel frekansı % 45 ve Grup C'de ise Lys allel frekansı % 60 Gln allel frekansı % 40 olarak belirlenmiştir.

Allel sıklığı bakımından elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde gruplar arasındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$) (Tablo 4.6.).

Tablo 4.5. Hasta ve kontrol gruplarında *XPD* Lys751Gln polimorfizmi bakımından genotip dağılımı.

Gruplar		<i>XPD</i> Genotip Frekansı			Toplam N (%)
		N (%)			
		Lys/Lys	Lys/Gln	Gln/Gln	
	Kontrol	3 (20,0)	9 (60,0)	3 (20,0)	15 (100,0)
Hasta Grubu	Grup A	2 (20,0)	4 (40,0)	4 (40,0)	10 (100,0)
	Grup B	4 (40,0)	3 (30,0)	3 (30,0)	10, (100,0)
	Grup C	3 (30,0)	6 (60,0)	1 (10,0)	10 (100,0)
Toplam		12 (26,7)	22 (48,9)	11 (24,4)	45 (100,0)

Tablo 4.6. Hasta ve kontrol gruplarında *XPD* Lys751Gln polimorfizmi bakımından allel dağılımı.

Gruplar		<i>XPD</i> Allel Frekansı		Toplam N (%)
		N (%)		
		Lys Alleli	Gln Alleli	
Kontrol		15 (50,0)	15 (50,0)	30 (100,0)
Hasta Grubu	Grup A	8 (40,0)	12 (60,0)	20 (100,0)
	Grup B	11 (55,0)	9 (45,0)	20 (100,0)
	Grup C	12 (60,0)	8 (40,0)	20 (100,0)
Toplam		46 (51,1)	44 (48,9)	90 (100,0)

4.2.2. *XRCC1* Arg194Trp Gen Polimorfizmi

İlaç kullanım süresine göre gruplandırılmış olan Hepatit B hastalarından oluşan hasta grupları ile kontrol gruplarındaki bireylerin *XRCC1* Arg194Trp polimorfizmi bakımından genotiplerini belirlemek üzere gerçek zamanlı-PZR çalışması yapılmıştır. Elde edilen bu sonuçlar ile her grupta *XRCC1* Arg194Trp polimorfizmi için genotip ve allel dağılımları hesaplanmış olup sırasıyla Tablo 4.7. ve Tablo 4.8.'de verilmiştir.

Elde edilen verilere göre kontrol grubunda Arg/Arg genotip frekansı % 100 olarak belirlenmiş olup Arg/Trp ve Trp/Trp genotipine sahip bireylere rastlanmamıştır.

Hasta grupların içersinde sırasıyla; Grup A'da genotip frekansları Arg/Arg % 80, Arg/Trp % 10 ve Trp/Trp ise % 10 olarak belirlenmiştir. Grup B'de Arg/Arg genotip frekansı % 90, Trp/Trp genotip frekansı % 10 olarak belirlenmiş iken Arg/Trp genotipine sahip bireye rastlanamamıştır. Grup C'de ise Arg/Arg genotip frekansı % 80 ve Arg/Trp genotip frekansı % 20 olarak belirlenmiş iken Trp/Trp genotipine sahip birey olmadığı tespit edilmiştir.

Genotip frekansları bakımından elde kontrol ve hasta grupları değerlendirildiğinde gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$) (Tablo 4.7.).

İlaç kullanım süresine göre gruplandırılmış olan Hepatit B hastalarından oluşan hasta grupları ile kontrol gruplarındaki bireyler allel dağılımları bakımından da değerlendirilmiş olup sonuçlar Tablo 4.8.'de verilmiştir. Buna göre kontrol grubunda Arg allel frekansı % 100 ve Trp alleleline sahip birey bulunmadığından Trp allel frekansı % 0 olarak hesaplanmıştır.

Hasta grupları içerisindeki allel frekanslarında; Grup A' da *XRCCI* kodon 194, Arg allel frekansı % 85 Trp allel frekansı ise % 15 Grup B' de Arg allel frekansı % 90, Trp allel frekansı % 10 ve Grup C'de Arg allel frekansı % 90, Trp allel frekansı % 10 olarak belirlenmiştir.

Allel sıklığı bakımından elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde gruplar arasındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$) (Tablo 4.8.).

Tablo 4.7. Hasta ve kontrol gruplarında *XRCCI* Arg194Trp polimorfizmi bakımından genotip dağılımı.

Gruplar		<i>XRCCI-194</i> Genotip Frekansı N (%)			Toplam N (%)
		Arg/Arg	Arg/Trp	Trp/Trp	
Kontrol		15 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	15 (100,0)
Hasta Grubu	Grup A	8 (80,0)	1 (10,0)	1 (10,0)	10 (100,0)
	Grup B	9 (90,0)	0 (0,0)	1 (10,0)	10 (100,0)
	Grup C	8 (80,0)	2 (20,0)	0 (0,0)	10 (100,0)
Toplam		40 (88,9)	3 (6,7)	2 (4,4)	45 (100,0)

Tablo 4.8. Hasta ve kontrol gruplarında *XRCCI* Arg194Trp polimorfizmi bakımından allel dağılımı.

Gruplar		<i>XRCCI-194</i> Allel Frekansı N (%)		Toplam N (%)
		Arg Alleli	Trp Alleli	
Kontrol		30 (100,0)	0 (0,0)	30 (100,0)
Hasta Grubu	Grup A	17 (85,0)	3 (15,0)	20 (100,0)
	Grup B	18 (90,0)	2 (10,0)	20 (100,0)
	Grup C	18 (90,0)	2 (10,0)	20 (100,0)
Toplam		83 (92,0)	7 (7,8)	90 (100,0)

4.2.3. *XRCCI* Arg399Gln Gen Polimorfizmi

İlaç kullanım süresine göre gruplandırılmış olan Hepatit B hastalarından oluşan hasta grupları ile kontrol gruplarındaki bireylerin *XRCCI* Arg399Gln polimorfizmi bakımından genotiplerini belirlemek üzere gerçek zamanlı-PZR çalışması yapılmıştır. Elde edilen bu sonuçlar ile her grupta *XRCCI* Arg399Gln polimorfizmi için genotip ve allel dağılımları hesaplanmış olup sırasıyla Tablo 4.9. ve Tablo 4.10.'da verilmiştir.

Elde edilen verilere göre kontrol grubunda Arg/Arg genotip frekansı % 26,7, Arg/Gln genotip frekansı % 66,7 ve Gln/Gln genotipinin frekansı ise % 6,7 olarak saptanmıştır.

Hasta gruplarımızda ise; Grup A'da Arg/Arg genotip frekansı % 30, Arg/Gln genotip frekansı % 60 ve Gln/Gln genotip frekansının ise % 10 Grup B'de genotip frekansları Arg/Arg % 40, Arg/Gln % 40 ve Gln/Gln % 20 ve Grup C'de Arg/Arg genotip frekansı % 50, Arg/Gln genotip frekansı % 30 ve Gln/Gln genotip frekansı ise % 20 olarak bulunmuştur.

Genotip frekansları bakımından tüm gruplar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde gruplar arasındaki farkın anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$) (Tablo 4.9.).

İlaç kullanım süresine göre gruplandırılmış olan Hepatit B hastalarından oluşan hasta grupları ile kontrol gruplarındaki bireyler allel dağılımları bakımından da değerlendirilmiş olup sonuçlar Tablo 4.10.'da verilmiştir. Buna göre kontrol grubunda Arg allel frekansı % 60 olarak ve Gln allel frekansı % 40 olarak hesaplanmıştır.

Hasta grupları içerisinde; Grup A'da *XRCCI* kodon 399, Arg allel allel frekansı % 60, Gln allel frekansı % 40, Grup B'de, Arg allel frekansı % 60, Trp allel frekansı % 40 ve Grup C'de ise, Arg allel frekansı % 65, Gln allel frekansı % 35 olarak belirlenmiştir.

Allel sıklığı bakımından elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde gruplar arasındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$) (Tablo 4.10.).

Tablo 4.9. Hasta ve Kontrol Gruplarında *XRCCI* Arg399Gln polimorfizmi bakımından genotip dağılımı.

Gruplar		<i>XRCCI</i> -399 Genotip Frekansı N (%)			Toplam N (%)
		Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln	
Kontrol		4 (26,7)	10 (66,7)	1 (6,7)	15 (100,0)
Hasta Grubu	Grup A	3 (30,0)	6 (60,0)	1 (10,0)	10 (100,0)
	Grup B	4 (40,0)	4 (40,0)	2 (20,0)	10 (100,0)
	Grup C	5 (50,0)	3 (30,0)	2 (20,0)	10 (100,0)
Toplam		16 (35,6)	23 (51,1)	6 (13,3)	45 (100,0)

Tablo 4.10. Hasta ve Kontrol Gruplarında *XRCCI* Arg399Gln polimorfizmi bakımından allel dağılımı.

Gruplar		<i>XRCCI</i> - 399 Allel Frekansı		Toplam N (%)
		N (%)		
		Arg Alleli	Gln Alleli	
Kontrol		18(60,0)	12 (40,0)	30 (100,0)
Hasta Grubu	Grup A	12 (60,0)	8 (40,0)	20 (100,0)
	Grup B	12 (60,0)	8 (40,0)	20 (100,0)
	Grup C	13 (65,0)	7 (35,0)	20 (100,0)
Toplam		55 (61,1)	35 (38,9)	90 (100,0)

4.2.4. *APEI* Asp148Glu Gen Polimorfizmi

İlaç kullanım süresine göre gruplandırılmış olan Hepatit B hastalarından oluşan hasta grupları ile kontrol gruplarındaki bireylerin *APEI* Asp148Gln polimorfizmi bakımından genotiplerini belirlemek üzere gerçek zamanlı-PZR çalışması yapılmıştır. Elde edilen bu sonuçlar ile her grupta *APEI* Asp148Gln polimorfizmi için genotip ve allel dağılımları hesaplanmış olup Tablo 4.11. ve Tablo 4.12.'de verilmiştir.

Elde edilen verilere göre kontrol grubunda Asp/Asp genotip frekansı % 60, Asp/Glu genotip frekansı %26,7 ve Glu/Glu genotip frekansı % 13,3 olarak saptanmıştır.

Hasta gruplarının genotip frekansları incelediğimizde ise; Grup A'da genotip frekansları Asp/Asp % 70, Asp/Glu % 30 olarak belirlenirken Glu/Glu genotipinden ise bireye rastlanmamıştır. Grup B'de Asp/Asp ve Asp/Glu genotip frekansları % 40, Glu/Glu genotip frekansı ise % 20 olarak belirlenmiştir. Grup C'de Arg/Arg genotip frekansı % 80, Arg/Gln genotipine sahip bireye rastlanmamış iken; Gln/Gln genotip frekansı ise % 20 olarak belirlenmiştir.

Kontrol grubu ile Grup A, B ve C'yi içeren uygulama grupları genotip frekansları bakımından istatistiksel olarak değerlendirildiğinde gruplar arasındaki farkın anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.11.) (Tablo 4.12.).

İlaç kullanım süresine göre gruplandırılmış olan Hepatit B hastalarından oluşan hasta grupları ile kontrol gruplarındaki bireyler allel dağılımları bakımından da değerlendirilmiş olup sonuçlar Tablo 4.12.'de verilmiştir. Buna göre kontrol grubunda Asp allel frekansı % 73,3 ve Glu allel frekansı % 26,7 olarak hesaplanmıştır.

Hasta grupları içerisinde Grup A'da *APEI* Kodon 148 polimorfizminde, Asp allel frekansı % 85, Glu allel frekansı % 15, Grup B' de, Asp allel frekansı % 60, Glu allel frekansı % 40, Grup C'de ise, Asp allel frekansı % 80, allel frekansı % 20 olarak belirlenmiştir.

Allel sıklığı bakımından elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildiğinde gruplar arasındaki farkın önemli olmadığı belirlenmiştir ($p>0,05$) (Tablo 4.12.).

Tablo 4.11. *APEI* Asp148Glu polimorfizmi bakımından genotip dağılımı.

Gruplar		<i>APEI</i> Genotip Frekansı N (%)			Toplam N (%)
		Asp/Asp	Asp/Glu	Glu/Glu	
Kontrol		9 (60,0)	4 (26,7)	2 (13,3)	15 (100,0)
Hasta Grubu	Grup A	7 (70,0)	3 (30,0)	0 (0,0)	10 (100,0)
	Grup B	4 (40,0)	4 (40,0)	2 (20,0)	10 (100,0)
	Grup C	8 (80,0)	0 (0,0)	2 (20,0)	10 (100,0)
Toplam		28 (62,2)	11 (24,4)	6 (13,3)	45 (100,0)

Tablo 4.12. *APEI* Asp148Glu polimorfizmi bakımından allel dağılımı.

Gruplar		<i>APEI</i> Allel Frekansı N (%)		Toplam N (%)
		Asp Alleli	Glu Alleli	
	Kontrol	22(73,3)	8 (26,7)	30 (100,0)
Hasta Grubu	Grup A	17 (85,0)	3 (15,0)	20 (100,0)
	Grup B	12 (60,0)	8 (40,0)	20 (100,0)
	Grup C	16 (80,0)	4 (20,0)	20 (100,0)
Toplam		67 (74,4)	23 (25,6)	90 (100,0)

4.2.5. Hasta ve Kontrol Gruplarında *XPB* Lys751Gln, *XRCC1* Arg194Trp, *XRCC1* Arg399Gln ve *APEI* Asp149Gln Gen Polimorfizmleri ile MN İlişkisi

Kontrol grubu ve hasta gruplarımızda belirlediğimiz MN değerleri ile *XPB* Lys751Gln, *XRCC1* Arg194Trp, *XRCC1* Arg399Gln ve *APEI* Asp149Gln gen polimorfizmlerine ait genotipler arasındaki olası ilişki bir arada değerlendirilmiş olup sonuçlar Tablo 4.13.'de gösterilmiştir.

Kontrol ve hasta gruplarımız bir arada değerlendirildiğinde; *XPB* Lys751Gln gen polimorfizmi bakımından Lys/Lys genotipi 12 bireyde belirlenmiş olup MN sayısı, ortalama olarak % 3,25 olarak tespit edilmiştir. Heterozigot Lys/Gln ve homozigot mutant Gln/Gln genotiplerinin birlikteliği durumunda değerlendirme yapıldığında ise bu genotiplere sahip 33 bireyde MN sayısı, ortalama olarak % 2,27 olarak tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak karşılaştırıldıkları zaman aralarında anlamlı bir fark tespit edilememiştir (p=0,28)

XRCC1 Arg194Trp gen polimorfizmi ve MN ilişkisi değerlendirilmiş olup toplamda Arg/Arg genotipinde 40 birey ve ortalama % 2,57 MN sayısı bulunurken kalan 5 birey heterozigot Arg/Trp ve homozigot mutant Trp/Trp genotiplerinin

birlikteliği durumunda % 2,20 oranında MN sayısı bulunduğu tespit edilmiştir. Gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir (p=0,77)

XRCCI Arg399Gln gen polimorfizmi ve MN ilişkisi değerlendirilmiş olup toplamda Arg/Arg genotipinde 16 birey ve ortalama % 3,06 MN sayısı bulunurken kalan 29 birey heterozigot Arg/Gln ve homozigot mutant Gln/Gln genotiplerinin birlikteliği durumunda % 2,24 oranında MN sayısı bulunduğu tespit edilmiştir. Gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir (p=0,30).

APEI Asp148Gln gen polimorfizmi ve MN ilişkisi değerlendirilmiş olup toplamda Asp/Asp genotipinde 28 birey ve ortalama % 2,46 MN sayısı bulunurken kalan 17 birey heterozigot Asp/Gln ve homozigot mutant Gln/Gln genotiplerinin birlikteliği durumunda % 2,64 oranında MN sayısı bulunduğu tespit edilmiştir. Gruplar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir (p=0,64) .

Tablo 4.13. Kontrol grupları ile hasta gruplarında, *XPD* Lys751Gln, *XRCCI* Arg194Trp, *XRCCI* Arg399Gln ve *APEI* Asp149Gln genotipleri ve MN frekansının ilişkisi.

	Genotip	Kontrol		Grup A		Grup B		Grup C		Toplam	
		N	MN	N	MN	N	MN	N	MN	N	MN
<i>XPD</i> - Lys751Gln	Lys/Lys	3	0,07	2	0,30	4	0,45	3	0,43	12	3,25
	Lys/Gln+Gln/Gln	12	0,14	8	0,18	6	0,46	7	0,21	33	2,27
P			0,32		0,17		0,65		0,19		0,28
<i>XRCCI</i> - Arg194Trp	Arg/Arg	15	0,12	8	0,20	9	0,48	8	0,30	40	2,57
	Arg/Trp+Trp/Trp	0	-	2	0,25	1	0,20	2	0,20	5	2,20
P			-		0,59		0,28		0,58		0,76
<i>XRCCI</i> - Arg399Gln	Arg/Arg	4	0,10	3	0,26	4	0,50	5	0,34	16	3,06
	Arg/Gln+Gln/Gln	11	0,13	7	0,18	6	0,43	5	0,22	29	2,24
P			0,73		0,29		0,91		0,44		0,30
<i>APEI</i> - Asp148Glu	Asp/Asp	9	0,11	7	0,21	4	0,52	8	0,28	28	2,46
	Asp/Gln+Gln/Gln	6	0,15	3	0,20	6	0,41	2	0,25	17	2,64
P			0,35		0,81		0,50		0,78		0,64

5. TARTIŞMA

HBV enfeksiyonu, dünya genelinde yaklaşık 2 milyar kişinin etkilendiği bunların da yaklaşık 400 milyonunun kronik HBV taşıyıcısı olduğu önemli bir sağlık problemidir. HBV nedeniyle her yıl siroz ve hepatoselüler karsinoma nedeniyle ölenlerin sayısı 500.000'i geçmektedir (87).

Tenofovir, HBV tedavisinde etkin olan ve yaygın bir şekilde kullanılan nükleotid analogu bir ilaçtır. Tenofovir, virüsün nükleotid revers transkriptaz enzimini bloke ederek enfeksiyon oluşumunu engeller (35, 88).

Bu çalışma, kronik olarak hepatit B enfeksiyonu tedavisinde kullanılan tenofovirin, olası genotoksik etkileri ile bu genetik hasara karşı aktive olan DNA onarım genlerinden *APE1* Asp148Glu, *XRCC1* Arg194Trp, *XRCC1* Arg399Gln ve *XPD* Lys751Gln ile ilişkisini araştırmak üzere planlanmıştır. Araştırma, hepatit B tanısı almış ancak ilaç kullanmayan, tenofoviri 0-6 ay kullanan ve tenofoviri 12+ ay kullanan hastalar ile sağlıklı kişilerden oluşan kontrol grubu arasında karşılaştırılarak yapılmıştır.

Tenofovirin, hücre bölünmesi üzerine etkisinin olup olmadığını test etmek için çalışmaya katılan kişilerin lenfosit hücrelerinde mitotik indeks (MI) değerleri hesaplanmıştır. Çalışmada, tedavisine başlanmamış hepatit B hastaları ile tenofoviri 0-6 ay ve 12+ ay kullanmış hastaların, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli oranda daha yüksek değerde MI'e sahip oldukları bulunmuştur. Buna karşın, hasta grupları kendi arasında karşılaştırdıkları zaman, tedavi alan ve almayan hastalar arasında MI bakımından anlamlı fark tespit edilemedi. Bu bulgular MI seviyesindeki artışın tenofovirden değil HBV'den kaynaklı olduğunu düşündürmektedir. HBV tedavisinde kullanılan bazı ilaçların genotoksik etkileri birçok araştırmacı tarafından *in vitro* olarak farklı test sistemleri ile kapsamlı bir şekilde test edilmiş ve birbiriyle uyumlu olan pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin Thust ve arkadaşları (1996), *in vitro* deney düzeneğinde pürin grubununun nükleozid analoglarından olan acyclovir (ACV), valaciclovir (VACV), penciclovir (PCV) ve ganciclovirin hücre bölünmesini geciktirerek MI'i düşürdüğünü tespit etmişlerdir (89). Yine Gonzales ve Larippa (1994)'nın yaptıkları çalışma ile nükleozid analoglarından zidovudin hücre kinetiğindeki gecikme sonucu MI'de

düşüşe neden olduğunu bildirilmiştir (90). Benzer bir çalışmada, Jain ve Andsorbhoy (1988), zidovudinun mitokondri üstüne etkisinde ATP üretiminin baskılayarak MI'ı azalttığını rapor etmişlerdir (91). Söz konusu çalışmalarda, HBV tedavisinde kullanılan tenofovir dışı ilaçlar MI'ı azaltmaktadır. Buna karşın yaptığımız çalışmada tenofovir kullanımının MI üzerine önemli bir etkisi olmadığı anlaşılmıştır. Bu durumun, diğer çalışmaların aksine çalışmamızın *in vivo* uygulama ile yapılmasından dolayı ilacın vücut içi metabolize olması ve etkinliğinin değişmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Araştırmamızda, MI üzerine ilacın etkisi olmamasına karşın HBV'nin, MI'ı kontrol grubuna göre artırdığı gözlemlendi. Bu durum ise HBV'nin hepatoselüler karsinomaya gidişin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Tabii bunun söylenebilmesi için bu konuda daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Tenofovir'in ve HBV'nin genotoksik etkilerini saptamanın en önemli testlerinden biri de mikronükleus (MN) analizidir. MN'ler, hücrelerde mitoz bölünme esnasında ortaya çıkan esas çekirdeğe dâhil olmayan, tam kromozom fragmentlerinden meydana gelen oluşumlardır. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozomal düzensizliklerin indirekt göstergesidir (44). MN, hem klastojenik hem de anojenik mekanizmalar sonucu oluşabilmektedir (92). MN frekansındaki artış, klastojenitenin bir göstergesi olup, bu da genetik hastalıkları ve kanser riskini artırır. Epidemiyolojik çalışmalar, yüksek frekanstaki MN oluşumu ile kanser riski arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermektedir (93). Yaptığımız çalışmada, hasta gruplarındaki MN sıklığının sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli seviyede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak, hepatit B hastası olup henüz tedavi uygulanmayan, 0-6 ay ve 12+ ay tenofovir tedavisi almış olan hasta grupları kendi arasında kıyaslandığında istatistikî olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Dolayısıyla MN frekansındaki artışın tenofovir kaynaklı değil de HBV kaynaklı olduğu belirlenmiştir. Literatür taramalarında tenofovir ilacı ile benzer etki mekanizmasına sahip olan diğer antiretrovirallere dair çalışmalara rastlandı. Örneğin, azidotimidinin kültür hücrelerinde MN oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (10). Gonzales ve Larippa (90), Çin hemstir ovaryum hücrelerinde, Stern (94), CD4 lenfositlerinde; Aruna ve Jagetia (95) HeLa hücrelerinde azidotimidinin doza bağlı

olarak MN sıklığını artırdığını bildirmişlerdir. Phillips ve arkadaşları (1991) ise benzer ilaç grubundan olan didanozin ile muamele edilen dişi farelerin eritrositlerinde MN artışı meydana geldiğini saptamışlardır (96). Azidotimidin ve zidovudine maruz kalan fare yavrularında doğumdan sonra beslenme ve emmenin ardından, eritrositlerdeki MN sıklığında sıra dışı bir artış bulmuşlardır. Bayram S, insan periferik lenfositlerinde *in vivo* lamivudin uygulaması ile MN frekansının önemli oranda arttığını bildirmiştir (97). Bu bulguların aksine Tungeln ve arkadaşları (2002) lamivudine maruz kalan farelerin kemik iliğindeki eritrositlerinde MN oluşumunun artmadığını tespit etmişlerdir (98). Çoğu araştırmanın aksine, araştırmamızda tenofovirin MN sıklığında önemli bir etkisi olmadığı tespit edildi. Çalışmalar arasındaki bu farklılık uygulamanın *in vivo* veya *in vitro* yapılmasından kaynaklanabilir. Çalışmalardaki doz miktarının farklılığının da etkili olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda ilacın MN artışına dair etkisini bulamamıza karşın HBV'nin MN sıklığını istatistiksel olarak önemli oranda artırdığı tespit edilmiştir. Kronik HBV enfeksiyonunun en önemli komplikasyonlarından biri, *de novo* kanserin gelişmesi ve tümör oluşma riskinin artmasıdır (99). HBV, sadece konakçı hepatosit genomunu değil aynı zamanda kan hücreleri gibi diğer hücreleri de etkilemektedir. HBV girişi, genetik rekombinasyonlara ve kromozomal instabiliteye neden olur. HBV, farklı viral proteinlerin sentezlenmesini sağlar. Mesela; HBV çekirdek proteini histonlarla ilişki kurar, kromozomal yapıyı etkiler ve kromozom kondensasyonunu değiştirerek MN oluşumuna neden olabilir (100). Bir çalışma sonucunda gösterilmiş ki; HBV geni, genoma entegre olarak hücre döngüsü kontrol noktalarını ve hücre proliferasyonu bozar, genomik instabiliteyi etkileyerek mutasyon birikimi ve MN oluşumuna neden olur (101). Hasta, HB X geni, hepatoselüler karsinomunun oluşumuna da neden olmaktadır (102). Bu durumda, bizim araştırmamız sonucuna göre, tenofovirin insan periferik lenfositlerinde, MN oluşumunu uyaracak şekilde klastojenik etkisi olmadığını ancak HBV'nin MN sıklığını artırdığını söyleyebiliriz.

Tenofovir genotoksitesitesi ve üç DNA tamir genine ilişkin 4 polimorfizmin (*APE1* Asp148Glu, *XRCC1* Arg194Trp, *XRCC1* Arg399Gln ve *XPD* Lys751Gln) arasındaki ilişki araştırıldı. DNA tamiri, bireyler arasında farklılık gösterebilir. Bu durum DNA tamir genlerindeki polimorfizmlerin keşfi ile açıklanmıştır (103). DNA

tamirindeki farklılıkların incelenmesi için periferal kan lenfositlerinde, mutajenle oluşan, kromozomal kırıkları da içeren sitogenetik yaklaşımlar kullanılmaktadır. Bu yaklaşımlar, mutajenik ve karsinojenik ajanlara maruz kalmanın göstergesi ve kansere dair genetik yatkınlığın belirlenmesi için başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (104). Bu testler MN, MI, KKD, KA gibi uygulamaları içermektedir. (104). Son yıllarda polimorfizm çalışmalarıyla beraber MN testi de çalışılmaktadır (14). MN oluşumu, DNA onarımındaki bazı genlerin polimorfizmlerinden etkilenmektedir ve MN oluşumu, özellikle bizim de araştırdığımız bir grup gen ile ilişkili bulunmuştur (13). Yaptığımız çalışmada sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubu ile ilaç tedavisi alan hasta grupları karşılaştırıldığında; *APE1* Asp148Glu, *XRCC1* Arg194Trp, *XRCC1* Arg399Gln ve *XPB* Lys751Gln polimorfizmleri ile MN frekansı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir. Çalışmamızda kronik hepatit B enfeksiyonunun ise MN frekansını anlamlı ölçüde artırdığı belirlendi ancak, HBV ile oluşan MN artışının *APE1* Asp148Glu, *XRCC1* Arg194Trp, *XRCC1* Arg399Gln ve *XPB* Lys751Gln polimorfizmleri ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkisi bulunmadığı görülmüştür.

DNA lezyonlarının zamanında ve tam onarımı genomun kararlılığını sürdürebilmesi için oldukça önemlidir. Multiselüler organizmalarda ekzojen ve endojen kaynaklar nedeniyle sürekli bir DNA hasarı oluşur. Bu durum, reaktif oksijen türleri (Reactive oxygen species, ROS), UV ışınları, radyasyon ve mutajenleri içerir. Yüksek ROS seviyeleri ve oksidatif stres, çeşitli insan hastalıklarıyla ilişkilidir (105). HBV ve HCV enfeksiyonları da artan oksidatif DNA hasarı ile ilişkili bulunmuştur (106, 107, 108). HBV immün sistem aracılı inflamasyon ile oksidatif stres tetikler. Akut karaciğer hasarı ve hepatik inflamasyon sırasında, nötrofiller ve kupfer hücreleri tarafından ROS üretilir. ROS, direkt DNA ile ilişki kurarak oksidatif DNA hasarını uyarır, oksidatif DNA lezyonları, abazik bölgeler, deamine ve eklentili bazlar ile tek zincir kırıkları oluşturulabilir. DNA lezyonları, BER ve NER yolları ile onarılır. Oksidatif DNA hasarı ve onarım dengede olmalıdır ancak; kronik oksidatif stres durumunda kalıcı genetik hasarlar oluşabilir (106). Higgs ve arkadaşları (2014), HBV enfeksiyonunun oksidatif stres ile ilişkili olduğunu göstermiştir (106, 107). Ayrıca, *in vitro* olarak HBV replikasyonunun hepatoma hücre hattında oksidatif stres uyardığı gösterilmiştir.

Çalışmamızda *APE1* geninin 5.ekzonundaki C→G değişikliği ile oluşan *APE1* Asp148Glu Polimorfizmi çalışıldı ve bu gen polimorfizminin MN sıklığındaki artış ile ilişkisi olmadığı tespit edildi. İlaçlar gibi kimyasal ajanların parçalanması ve HBV gibi hastalık inflamasyonlarında açığa çıkan ROS ile modifiye edilen bazların, DNA glikozilazlar ile kaldırılması sonucu apürinik/apürimidinik bölge oluşur. AP bölgeleri mutajeniteye etkisinden dolayı onarılmalıdır. *APE1* enzimi, AP bölge onarımında başlangıç adımını katalizler (105). Çalıştığımız genlerden birisi olan *APE1* geni, HBV'deki oksidatif stres altında, DNA ve transkripsiyon faktörlerini korur. Bu yüzden kronik viral hepatitlerde, hepatokarsinogenezisin önlenmesi için *APE1* önemli bir role sahiptir (109). Benzer araştırmalardan; Fujihara ve arkadaşları Glu alleli taşıyan bireylerde diyabet sonucu oluşan oksidatif hasarın göstergesi olan 8-OHdG (8-hidroksi 2P-deoksiguanozin)'in daha fazla olduğunu dolayısıyla DNA onarım etkinliğinin düştüğünü saptamışlardır (110). *APE1* Asp148Glu Polimorfizmi ile MN sıklığı ilişkisine dair, bütadien, vinil klorid monomeri gibi ajanlarla yapılan çalışmalarda anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir (14).

XRCC1 geninin kodon 194'deki C→T değişimi ile oluşan *XRCC1* Arg194 Trp ve kodon 399'daki G→A değişimi ile oluşan *XRCC1* Arg399Gln polimorfizmleri tenofovir ve HBV etkisiyle uyarılan MN oluşumu arasında anlamlı bir ilişki olmadığı görülmüştür. Çalışmamıza benzer olarak *XRCC1* Arg194Trp ve *XRCC1* Arg 399 Gln gen polimorfizmleri ile yapılan bir araştırmada bütadiene maruz kalan Çinli işçilerde artmış seviyede MN frekansı bulunmuştur (81). *XRCC1* geni; tek zincir kırık onarımı, BER ve NER'de görevlidir. BER üzerinde *APE1* geni, polimeraz β, DNA ligazIII ve poli ADP riboz polimeraz ile kompleks yaparak DNA onarımında esasi rol oynar. Wen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, vinil klorid monomerine maruz kalma sonucu *XRCC1* Arg194Trp polimorfizmi ile artan MN frekansı arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir (73). Ayrıca, *XRCC1* Arg399Gln allelinin artan hepatoselüler karsinoma ile ilişkisi bulunmuştur (111).

XPD geninin 23.ekzonundaki G→T değişimi ile oluşan *XPD* Lys751Gln allel polimorfizmi ve MN ilişkisini araştırdığımızda, tenofovir ve HBV' nin etkisi olmadığı tespit edildi. *XPD* Lys751Gln polimorfizminin daha az DNA onarımına ve dolayısıyla MN oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (76, 77). *XPD* geni; DNA üzerinde oluşan dimerler gibi lezyonların tamiri için NER mekanizmasında görev alır

(56). HBV' deki HB X geninin, *XPD*'yi de içerecek şekilde NER yolağını inhibe ederek hepatoselüler karsinomaya neden olduğu bildirilmiştir (112). Benzer çalışmalar ile vinil klorid monomerine maruz kalanlar ve fırın çalışanlarında artmış seviyedeki MN frekansı ile *XPD* Lys751Gln gen polimorfizmi ilişkili bulunmuştur (79).

Araştırmamızda, kontrol grubu ve hasta grupları arasında incelediğimiz tüm gen polimorfizmleri ve artmış MN frekansı için anlamlı bir ilişki tespit edilemedi. Ancak bu durum, polimorfizm çalışması için denek sayımızın yetersiz olmasından kaynaklanmış olabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, tenofovirin MN ve MI testleri aracılığı ile genotoksik etkilerini araştırmayı ve bu genotoksitenin DNA tamir genlerinden *APE1* Asp148Glu, *XRCC1* Arg194Trp, *XRCC1* Arg399Gln ve *XPB* Lys751Gln gen polimorfizmleri ile ilişkisinin ortaya çıkarılması amaçlandı.

Araştırmalarımız sonucunda, kontrol ve hasta grupları karşılaştırıldığında fark anlamlı ancak ilaç kullanmayan ve kullanan uygulama grupları kendi içinde karşılaştırıldığında aradaki fark anlamsız olarak bulundu. Bu durum tenofovirin MI üzerinde etkisi olmadığı ancak HBV enfeksiyonunun MI'yı istatistiksel olarak anlamlı oranda yükselttiğini göstermiştir.

MN çalışması sonucunda ise kontrol grubu ve uygulama gruplarının karşılaştırılması ile yine tenofovirin istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olmadığı ancak HBV enfeksiyonunun anlamlı oranda MN frekansını artırdığı belirlenmiştir.

MN frekansının artması ile gen polimorfizmleri arasında önceki çalışmalara dayanarak anlamlı bir ilişki beklememize karşın bizim araştırmamızda, MN frekansındaki bu artış, *APE1* Asp148Glu, *XRCC1* Arg194Trp, *XRCC1* Arg399Gln ve *XPB* Lys751Gln gen polimorfizmleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir. Bunun nedeni gen polimorfizm çalışması için yeterli örneklem sayısına ulaşamaması olabilir.

Çalışmadan elde edilen tüm bu sonuçlar göz önünde bulundurulacak olursa, tenofovirin günlük 245 mg doz kullanımı ile genotoksik bir etkisi olmadığını ancak HBV enfeksiyonunun genotoksik etkileri olduğunu söyleyebiliriz. Literatür taramalarında çalışma planımıza benzeyen ve çalıştığımız parametreleri içeren araştırmalara rastlanamamıştır. Bu nedenle bu çalışma, tenofovirin ve HBV'nin genotoksikite potansiyellerini göstermesi bakımından orijinal bir çalışmadır. Ancak tenofovir ve HBV açısından bu yargıları daha kesin değerlendirebilmemiz için *in vivo* olarak uyguladığımız testin ayrıca *in vitro* olarak da farklı dozlar ile uygulanması ve gen polimorfizm çalışması için daha fazla denek sayısı ile çalışılması gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Lee, W. M. (1997). Hepatitis B virus infection. *The New England Journal of Medicine*, 337 (24), 1733-1745.
2. Hepatitis B Virus Genetic Diversity: Disease Pathogenesis. Erişim: 24 Nisan 2014, <http://www.intechopen.com/books/viral-replication/hepatitis-b-virus-genetic-diversity-disease-pathogenesis>
3. Hepatit B Virüs Enfeksiyonlarında Anti-Viral İlaç Direnci-Mikrobiyolojik Yaklaşım.Erişim:15Nisan2014,http://www.vhsd.org/files/file/2009_sunumlar/53.pdf
4. Menendez-Arias, L., Alvarez, M., Pacheco, B. (2014). Nucleoside/nucleotide analog inhibitors of hepatitis B virus polymerase: mechanism of action and resistance. *Current Opinion in Virology* 8(8C), 1-9.
5. De Clercq, E. (2009). Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33 (4), 307-320.
6. Sulukan, E. E., Küçüköğlü, K., Gül, İ. (2009). Aids ve Tedavisinde Kullanılan İlaçlar. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 38 (1), 47-78.
7. Kohler, J. J., Hosseini, S. H., Hoying-Brandt, A., Green, E., Johnson, D. M., Russ, R., Tran, D., Raper, C. M., Santoianni, R., Lewis, W. (2009). Tenofovir renal toxicity targets mitochondria of renal proximal tubules. *Laboratory Investigation*, 89 (5), 513-519.
8. Ingiliz, P., Valantin, M. A., Duvivier, C., Medja, F., Dominguez, S., Charlotte, F., Tubiana, R., Poynard, T., Katlama, C., Lombes, A., Benhamou, Y. (2009). Liver damage underlying unexplained transaminase elevation in human immunodeficiency virus-1 mono-infected patients on antiretroviral therapy. *Hepatology*, 49 (2), 436-442.
9. Gerschenson, M., Kim, C., Berzins, B., Taiwo, B., Libutti, D. E., Choi, J., Chen, D., Weinstein, J., Shore, J., da Silva, B., Belsey, E., McComsey, G. A., Murphy, R. L. (2009). Mitochondrial function, morphology and metabolic parameters improve after switching from stavudine to a tenofovir-containing regimen. *J Antimicrob Chemother*, 63 (6), 1244-1250.

10. Olivero, O. A. (2007). Mechanisms of genotoxicity of nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 48 (3-4), 215-223.
11. Wu, Q., Beland, A. F., Cheang C-W, Fang, J-L. (2011). XPC is essential for nucleotid excision repair of zidovudine-induced DNA damage in human hepatoma cells. *Toxicology and Applied Farmacology*, 251, 155-162.
12. Lourenco, E. D., do Amaral, V. S., Lehmann, M., Dihl, R. R., Schmitt, V. M., Cunha, K. S., Reguly, M. L., de Andrade, H. H. (2010). Micronuclei induced by reverse transcriptase inhibitors in mononucleated and binucleated cells as assessed by the cytokinesis-block micronucleus assay. *Genetics and Molecular Biology*, 33 (4), 756-760.
13. Feng, N., Li, Y., Long, C., Xia, Z. L., Brandt-Rauf, P. W. (2014). Effects of DNA repair gene polymorphisms on DNA damage in human lymphocytes induced by a vinyl chloride metabolite in vitro. *Biomarkers*, 19 (4), 281-286.
14. Dhillon, V. S., Thomas, P., Iarmarcovai, G., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Fenech, M. (2011). Genetic polymorphisms of genes involved in DNA repair and metabolism influence micronucleus frequencies in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 26 (1), 33-42.
15. Demirtürk, N., Demirdal, T. (2011). Yüksek Genetik Bariyerli Antivirallerle Tedavi Edilen Kronik Hepatit B Hastalarında Gözlenen Yan Etkiler. *Yeni Tıp Dergisi*, 28 (3), 146-149.
16. Mahoney, F. J. (1999). Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 12 (2), 351-366.
17. HepatitB.Erişim:30 Nisan 2014, <http://www.tsn.org.tr/folders/file/hepatitb.pdf>
18. HBV' nin Genel Yapısı. Erişim: 30 Nisan 2014, <http://diclekent.com/?orta=24&id=27&saglikyasam=2>
19. Güler, M. (2005). Allojenik Kök Hücre Transplantasyonu Yapılmış Hastalarda ve Donörlerinde Virüs Spesifik Sitotoksik T Lenfositlerin Hepatit B Virüs Enfeksiyonu Seyrine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

20. Tanhan, Ö. (2011). Kronik Hepatit B' li Hastaların Tedavisinde Entekavir' in Direnç ve Etkinliğinin Belirlenmesi. Uzmanlık Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
21. Jalali, M. V., Alavian, S. M. (2006). Hepatitis B Antigen-Negative Chronic Hepatitis B. *Hepatitis*, 6 (1), 31-35.
22. Hou, J., Liu, Z. ve Gu, F. (2005). Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *International Journal Medical Sciences*, 2 (1), 50-57.
23. Çetin, M., Temiz., M., Aslan, A., Turhan, E. (2007). Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Görevlilerinin Hepatit B Virüsü İnfeksiyonuna İlişkin Bilgi Düzeylerinin Değerlendirilmesi. *Viral Hepatit B Dergisi*, 12 (3), 121-127.
24. Güçlü, E., Geyik, M. F. (2012). Hepatit B Enfeksiyonu ve Korunma. *Konuralp Tıp Dergisi*, 4 (2), 54-58.
25. Sarıkaya, G. H. (2009). Kronik Hepatit B Hastalarında Lamuvidin ve Adefovir Dipivoksil Tedavilerinin Etkinlikleri ve Güvenilirlikleri. Uzmanlık Tezi, On Dokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun.
26. Kurcer, M. A., Pehlivan, E. (2002). Hepatitis B seroprevalance and risk factors in urban areas of Malatya. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, 13 (1), 1-5.
27. Hepatitis, Viral Type B. Health Information for International Travel Erişim: 2 Mayıs 2014, <http://wwwn.cdc.gov/travel/yellowBookCh4-HepB.aspx>
28. Özdemir, D., Kurt, H. . (2007). Hepatit B Virüs Enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi. *Viral Hepatit B Dergisi*, 108-117.
29. Hou, J., Liu, Z., Gu, F. (2005). Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *International Journal of Medical Sciences*, 2 (1), 50-57.
30. Tosun, S. (2013). Viral Hepatitlerin Ülkemizdeki Değişen Epidemiyolojisi. *Ankem*, 27 (2), 128-134.
31. III. Viral Hepatit B Tanı ve Tedavi Rehberi. Erişim: 15 Haziran 2014, http://www.vhsd.org/files/file/rehberler/3_Viral_Hepatit_Tani_ve_Tedavi_Rehberi2.pdf

32. Fung, J., Lai, C. L., Seto, W. K., Yuen, M. F. (2011). Nucleoside/nucleotide analogues in the treatment of chronic hepatitis B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66 (12), 2715-2725.
33. Khungar, V., Han, S. H. (2010). A Systematic Review of Side Effects of Nucleoside and Nucleotide Drugs Used for Treatment of Chronic Hepatitis B. *Current Hepatology Reports*, 9 (2), 75-90.
34. Tenofovir' in Kullanma Talimatı. Erişim: 24 Mayıs 2014, http://212.174.130.226/Folders/KubKT/Ruhsats%C4%B1z%20Jenerik%20%C3%9Cr%C3%BCnler%20%C5%9Eube%20M%C3%BCd%C3%BCrl%C3%BC%C4%9F%C3%BC/ONAYLIKTenevir245mgFilmTab.1_07f11c6.pdf
35. Fung, H. B., Stone, E. A., Piacenti, F. J. (2002). Tenofovir disoproxil fumarate: a nucleotide reverse transcriptase inhibitor for the treatment of HIV infection. *Clinical Therapeutics*, 24 (10), 1515-1548.
36. Hepatit B Virüs Enfeksiyonlarında Anti-Viral İlaç Direnci-Mikrobiyolojik Yaklaşım.Erişim:14Mayıs2014,http://www.vhsd.org/files/file/2009_sunumlar/53.pdf
37. Yamazhan, T. (2011). Kronik Hepatit B Tedavisinde Güncel durum *Ankem*, 25 (2), 234-237.
38. Buti, M., Homs, M. (2012). Tenofovir disoproxil fumarate in the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Review of Gastroenterology and Hepatology*, 6 (4), 413-421.
39. Marcellin, P., Heathcote, E. J., Buti, M., Gane, E., de Man, R. A., Krastev, Z., Germanidis, G., Lee, S. S., Flisiak, R., Kaita, K., Manns, M., Kotzev, I., Tchernev, K., Buggisch, P., Weilert, F., Kurdas, O. O., Shiffman, M. L., Trinh, H., Washington, M. K., Sorbel, J., Anderson, J., Snow-Lampart, A., Mondou, E., Quinn, J., Rousseau, F. (2008). Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *The New England Journal of Medicine*, 359 (23), 2442-2455.
40. Bedir, B., Bilgici, B., Yurdakul Z., Gürsel, B. Ş., Alvur, M. (2004). DNA Hasarı Analizinde μ - FADU ve Comet Yöntemlerinin Karşılaştırılması. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2 (3), 97-103.

41. Choy, W. N. (1996). Principles of genetic toxicology. *Drug and Chemical Toxicology*, 19 (3), 149-160.
42. Mortelmans, K., Rupa, D. S. (2004). Current issues in genetic toxicology testing for microbiologists. *Advances in Applied Microbiology*, 56, 379-401.
43. Yüzbaşıoğlu, D., Zengin, N., Ünal, F. (2014). Gıda Koruyucuları ve Genotoksisite Testleri. *Gıda*, 39 (3), 179-186.
44. Şekeroğlu, V., Şekeroğlu, Z. A. (2011). Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 68 (4), 241-251.
45. Öcal, A. (2012). İnsan Periferik Kan Lenfositlerinde Hipericum Heterophyllum Vent. Türünün Mikronükleus, Mitotik İndeks ve Replikasyon İndeksi Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Bozok Üniversitesi, Yozgat.
46. Stopper, H., Muller, S. O. (1997). Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview. *Toxicology in Vitro*, 11 (5), 661-667.
47. Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A. T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D. A., Tucker, J. D., Thomas, P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 26 (1), 125-132.
48. Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A. (2003). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat Res*, 540 (2), 153-163.
49. Demirel, S., Zamani, A. G. (2002). Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları *Genel Tıp Dergisi*, 12 (3), 123-127.
50. Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455 (1-2), 81-95.
51. Kolodner, R. D., Marsischky, G. T. (1999). Eukaryotic DNA mismatch repair. *Current Opinion in Genetics & Development*, 9 (1), 89-96.
52. Zhou, C., Xie, L. P., Lin, Y. W., Yang, K., Mao, Q. Q., Cheng, Y. (2013). Susceptibility of XPD and hOGG1 genetic variants to prostate cancer. *Biomed Rep*, 1 (4), 679-683.
53. Li, W., Li, K., Zhao, L., Zou, H. (2014). DNA repair pathway genes and lung cancer susceptibility: a meta-analysis. *Gene*, 538 (2), 361-365.

54. Fan, X. M., Li, K. X., Niu, S. H., Fang, Z. H., Liu, H. (2013). [Relationship of XRCC1 polymorphism with the risks and clinicopathological factors of cervical cancer]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 93 (43), 3454-3456.
55. Hemminki, K., Shields, P. G. (2002). Skilled use of DNA polymorphisms as a tool for polygenic cancers. *Carcinogenesis*, 23 (3), 379-380.
56. Kashfi, S. M., Nazemalhosseini, M. E., Haghighi, M. M. (2013). XPD gene polymorphism and colorectal cancer risk. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*, 6 (2), 110-111.
57. Leibel, D., Laspe, P., Emmert, S. (2006). Nucleotide excision repair and cancer. *Journal of Molecular Histology* 37 (5-7), 225-238.
58. Fleck, O., Nielsen, O. (2004). DNA repair. *Journal of Cell Science*, 117 (4), 515-517.
59. Temizkan, G. (2013). *Moleküler Genetik*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.
60. Özcan, A. (2008). Hematolojik Maligniteli Hastalarda DNA Tamir Genlerindeki (XRCC1 ve XPD) Polimorfizmlerin Araştırılması. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir.
61. Mullapudi, S. R., Ali-Osman, F., Shou, J., Srivenugopal, K. S. (2000). DNA repair protein O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase is phosphorylated by two distinct and novel protein kinases in human brain tumour cells. *Biochemical Journal*, 15 (351), 393-402.
62. Reardon, J. T., Sancar, A. (2005). Nucleotide excision repair. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 79, 183-235.
63. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H., Matsudaira, P. (2011). *Molecular Cell Biology*. New York: W. H. Freeman and Company.
64. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kacmaz, K., Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry* 73, 39-85.
65. Robertson, A. B., Klungland, A., Rognes, T., Leiros, I. (2009). DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66 (6), 981-993.

66. Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., D' Errico, M., Simonelli, V., Dogliotti, E. (2003). The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. *Biochimie*, 85 (11), 1053-1071.
67. Klug, W., S., Cummings, M. R., Spencer, C. A. (2006). UK: Pearson Education.
68. Cooper, G., M., Hausman, R., E. (2003). *Cell: A Molecular Approach*. England: Sinauer Associates Inc.
69. Bütüner, D. B., Kantarcı, G. (2006). Mutasyon, DNA Hasarı, Onarım Mekanizmaları ve Kanslerle İlişkisi. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 35 (2), 149-170.
70. van der Veen, S., Abee, T. (2011). Bacterial SOS response: a food safety perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 22 (2), 136-142.
71. APE1.Erişim:13Ocak2014, http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/GeneSummary?g=ENSG00000100823;r=14:20923350-20925927
72. Wang, D., Luo, M., Kelley, M. R. (2004). Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3 (6), 679-686.
73. Wen-Bin, M., Wei, W., Yu-Lan, Q., Fang, J., Zhao-Lin, X. (2009). Micronucleus occurrence related to base excision repair gene polymorphisms in Chinese workers occupationally exposed to vinyl chloride monomer. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 51 (5), 578-585.
74. Chang-Claude, J., Popanda, O., Tan, X. L., Kropp, S., ve Helmbold, I., von Fournier, D., Haase, W., Sautter-Bihl, M. L., Wenz, F., Schmezer, P., Ambrosone, C. B. (2005). Association between polymorphisms in the DNA repair genes, XRCC1, APE1, and XPD and acute side effects of radiotherapy in breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 11 (13), 4802-4809.
75. Hung, R. J., Hall, J., Brennan, P., Boffetta, P. (2005). Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *American Journal of Epidemiology*, 162 (10), 925-942.

76. Hemminki, K., Xu, G., Angelini, S., Snellman, E., Jansen, C. T., Lambert, B., Hou, S. M. (2001). XPD exon 10 and 23 polymorphisms and DNA repair in human skin in situ. *Carcinogenesis*, 22 (8), 1185-1188.
77. Kazimirova, A., Barancokova, M., Dzapinkova, Z., Wsolova, L., Dusinska, M. (2009). Micronuclei and chromosomal aberrations, important markers of ageing: possible association with XPC and XPD polymorphisms. *Mutant Research*, 661 (1-2), 35-40.
78. Abdel-Rahman, S. Z., El-Zein, R. A. (2011). Evaluating the effects of genetic variants of DNA repair genes using cytogenetic mutagen sensitivity approaches. *Biomarkers*, 16 (5), 393-404.
79. Guven, M., Guven, G. S., Oz, E., Ozaydin, A., Batar, B., Ulutin, T., Hacıhanefioglu, S., Domanic, N. (2007). DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and their association with coronary artery disease risks and micronucleus frequency. *Heart Vessels*, 22 (6), 355-360.
80. XRCC1. Erişim: 13 Ocak 2014, http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000073050;r=19:44047192-44084625
81. Wang, Q., Wang, A. H., Tan, H. S., Feng, N. N., Ye, Y. J., Feng, X. Q., Liu, G., Zheng, Y. X., Xia, Z. L. (2010). Genetic polymorphisms of DNA repair genes and chromosomal damage in workers exposed to 1,3-butadiene. *Carcinogenesis*, 31 (5), 858-863.
82. Vural, P., Degirmencioglu, S., Dogru-Abbasoglu, S., Saral, N. Y., Akgul, C., Uysal, M. (2009). Genetic polymorphisms in DNA repair gene APE1, XRCC1 and XPD and the risk of pre-eclampsia. *European Journal of Obstetrics & Gynecology*, 146 (2), 160-164.
83. Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E. (2010). *Sitogenetik*. Ankara: Nobel Yayın Dağıtım.
84. Alper, Ö., Lüleci, G. (2009). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
85. Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay. *Nature Protocols*, 2 (5), 1084-1104.
86. Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria

for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Research*, 534 (1-2), 65-75.

87. Lavanchy, D. (2004). Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *Journal of Viral Hepatitis*, 11 (2), 97-107.
88. Margolis, A. M., Heverling, H., Pham, P. A., Stolbach, A. (2014). A review of the toxicity of HIV medications. *Journal of Medical Toxicology*, 10 (1), 26-39.
89. Thust, R., Schacke, M., Wutzler, P. (1996). Cytogenetic genotoxicity of antiherpes virostatics in Chinese hamster V79-E cells. I. Purine nucleoside analogues. *Antiviral Research* 31 (1-2), 105-113.
90. Gonzalez Cid, M., Larripa, I. (1994). Genotoxic activity of azidothymidine (AZT) in in vitro systems. *Mutant Research*, 321 (1-2), 113-118.
91. Jain, A., Andsorbhoy, R. K. (1988). Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides III. concluding remarks. *Cytologia*, 53, 427-436.
92. Samanta, S., Dey, P. (2012). Micronucleus and its applications. *Diagnostic Cytopathology*, 40 (1), 84-90.
93. Bhatia, A., Kumar, Y. (2013). Cancer cell micronucleus: an update on clinical and diagnostic applications. *APMIS*, 121 (7), 569-581.
94. Stern, M., Cid, M. G., Larripa, I., Slavutsky, I. (1994). AZT-induction of micronuclei in human lymphocyte subpopulations. *Toxicology Letters*, 70 (2), 235-242.
95. Aruna, R., Jagetia, G. C. (2001). Azidothymidine induces dose dependent increase in micronuclei formation in cultured HeLa cells. *Pharmazie*, 56 (6), 492-500.
96. Phillips, M. D., Nascimbeni, B., Tice, R. R., Shelby, M. D. (1991). Induction of micronuclei in mouse bone marrow cells: an evaluation of nucleoside analogues used in the treatment of AIDS. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 18 (3), 168-183.
97. Bayram, S. (2005). Lamivudin' in İnsan Periferel Lenfositlerinde *In vitro* Genotoksik Etkileri. Yüksek Lisans Çukurova Üniversitesi, Adana.

98. Von Tungeln, L. S., Hamilton, L. P., Dobrovolsky, V. N., Bishop, M. E., Shaddock, J. G., Heflich, R. H., Beland, F. A. (2002). Frequency of Tk and Hprt lymphocyte mutants and bone marrow micronuclei in B6C3F(1)/Tk+/- mice treated neonatally with zidovudine and lamivudine. *Carcinogenesis*, 23 (9), 1427-1432.
99. Shlomai, A., de Jong, Y. P., Rice, C. M. (2014). Virus associated malignancies: The role of viral hepatitis in hepatocellular carcinoma. *Seminars in Cancer Biology*, 26C, 78-88.
100. Ozkal, P., Ilgin-Ruhi, H., Akdogan, M., Elhan, A. H., Kacar, S., Sasmaz, N. (2005). The genotoxic effects of hepatitis B virus to host DNA. *Mutagenesis*, 20 (2), 147-150.
101. Livezey, K. W., Negorev, D., Simon, D. (2002). Increased chromosomal alterations and micronuclei formation in human hepatoma HepG2 cells transfected with the hepatitis B virus HBX gene. *Mutant Research*, 505 (1-2), 63-74.
102. Hai, H., Tamori, A., Kawada, N. (2014). Role of hepatitis B virus DNA integration in human hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol*, 20 (20), 6236-6243.
103. Iarmarcovai, G., Bonassi, S., Botta, A., Baan, R. A., Orsiere, T. (2008). Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutant Research*, 658 (3), 215-233.
104. Norppa, H. (2004). Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicology Letters* 149 (1-3), 309-334.
105. Higgs, M. R., Chouteau, P., Lerat, H. (2014). 'Liver let die' : oxidative DNA damage and hepatotropic viruses. *Journal of General Virology*, 95 (5), 991-1004.
106. Demirdag, K., Yilmaz, S., Ozdarendeli, A., Ozden, M., Kalkan, A., Kilic, S. S. (2003). Levels of plasma malondialdehyde and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with chronic hepatitis B. *Hepatogastroenterology*, 50 (51), 766-770.
107. Bolukbas, C., Bolukbas, F. F., Horoz, M., Aslan, M., Celik, H., Erel, O. (2005). Increased oxidative stress associated with the severity of the liver

- disease in various forms of hepatitis B virus infection. *BMC Infectious Disease*, 5, 95.
108. Fujita, N., Sugimoto, R., Ma, N., Tanaka, H., Iwasa, M., Kobayashi, Y., Kawanishi, S., Watanabe, S., Kaito, M., Takei, Y. (2008). Comparison of hepatic oxidative DNA damage in patients with chronic hepatitis B and C. *Journal of Viral Hepatitis*, 15 (7), 498-507.
 109. Sumiyoshi, S., Kobayashi, Y., Kawamura, K., Kawata, K., Nakamura, H. (2013). Differential expression of hepatic apurinic/aprimidinic endonuclease 1, a DNA repair enzyme, in chronic hepatitis. *World Journal of Hepatology*, 5 (4), 206-213.
 110. Fujihara, J., Soejima, M., Yasuda, T., Koda, Y., Kunito, T., Iwata, H., Tanabe, S., Takeshita, H. (2011). Polymorphic trial in oxidative damage of arsenic exposed Vietnamese. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 256 (2), 174-178.
 111. Bose, S., Tripathi, D. M., Sukriti B., Sakhuja, P., Kazim, S. N., Sarin, S. K. (2013). Genetic polymorphisms of CYP2E1 and DNA repair genes HOGG1 and XRCC1: association with hepatitis B related advanced liver disease and cancer. *Gene*, 519 (2), 231-237.
 112. Jia, L., Wang, X. W., Harris, C. C. (1999). Hepatitis B virus X protein inhibits nucleotide excision repair. *International Journal of Cancer*, 80 (6), 875-879.

EKLER**Ek 1 : Etik Kurul Kararı****KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU**

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	MALATYA KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
	AÇIK ADRESİ:	İnönü Üniversitesi Merkez Kampüsü, 44280, Malatya, Türkiye
	TELEFON	+90 422 341 06 60 / 1219
	FAKS	+90 422 341 00 36
	E-POSTA	inu.dhek@inonu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Tenofovir'in mikronükleus saklığına etkileri ve APE1, XRCC1ve XPD DNA tamir genlerindeki polimorfizm ile ilişkisinin araştırılması			
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	2013/144			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADU/SOYADI	Yrd. Doç. Dr. Şengül YÜKSEL			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	MALATYA			
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma		<input type="checkbox"/>			
Diger ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili			
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ				Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama					
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>					
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>					
	BIYOLOJİK MATERİYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>					
	İLAN	<input type="checkbox"/>					
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>					
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>					
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>					
DİĞER:	<input type="checkbox"/>						
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2013/144	Tarih: 04.12.2013					
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmann/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmann/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.						

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Rifat KARLIDAĞ
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Tenofovir'in mikronükleus sıklığına etkileri ve APE1, XRCC1 ve XPD DNA tamir genlerindeki polimorfizm ile ilişkisinin araştırılması

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Rifat KARLIDAĞ	Psikiyatri	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Metin GENÇ	Halk Sağlığı	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Saim YOĞLU	Biyoistatistik	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Türkan TOĞAL	Anesteziyoloji ve Rea.	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ahmet KARADAĞ	Çocuk Sağlığı ve Hast.	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Alaadin POLAT	Fizyoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. H.Birgül CUMURCU	Psikiyatri	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

Doç. Dr. Yusuf AKUPOÇUĞLARI	Tıbbi Mikrobiyoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Sedat TAŞDEMİR	Tıbbi Farmakoloji	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Mehmet KARATAŞ	Tıp Tarih ve Etik	İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Nerlihan SİMŞEK	Diş Hekimliği	İnönü Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	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"/>	
Em. Dr. Ömer Murat AYDIN	Nükleer Tıp Uzmanı	Malatya Devlet Hastanesi	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"/>	
Acin TAY	Eczacı	Serbest Eczacı	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Zafer ERGÜZEL	Hukuk	İnönü Üniversitesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Hasan KONAN	Sivil Dava	Zaferoğlu Ltd. Şti.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

Toplantıda Bulunan

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : SELCEN KORKMAZ

Doğum Yeri ve Tarihi : Sivas-1987

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.B.D.

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.B.D. – Arş. Gör. (2013-****)

İLETİŞİM

E-posta Adresi : selcenkorkmaz@hotmail.com