

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Handan ERBOĞA**

**ÜREME ÇAĞINDAKİ KADINLARDA ADET DÖNGÜSÜ  
HORMONLARINDAKİ PERİYODİK DEĞİŞİMLERE  
BAĞLI OLARAK ORTAYA ÇIKAN KROMOZOM  
HASSASİYETLERİ VE SİTOTOKSİK ETKİLER**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ADANA, 2012**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÜREME ÇAĞINDAKİ KADINLARDA ADET DÖNGÜSÜ  
HORMONLARINDAKİ PERİYODİK DEĞİŞİMLERE BAĞLI OLARAK  
ORTAYA ÇIKAN KROMOZOM HASSASİYETLERİ VE SİTOTOKSİK  
ETKİLER**

**HandanERBOĞA**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez .../.../2012Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

.....  
Doç.Dr. Hasan Basri İLA  
Danışman

.....  
Prof.Dr. Mehmet TOPAKTAŞ  
ÜYE

.....  
Prof.Dr.Rüştü HATİPOĞLU  
ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

**Kod No**

**Prof.Dr.M. Rifat ULUSOY  
Enstitü Müdürü**

Bu Çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.

**Proje No:FEF2009YL49**

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖZ

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

#### ÜREME ÇAĞINDAKİ KADINLARDA ADET DÖNGÜSÜ HORMONLARINDAKİ PERİYODİK DEĞİŞİMLERE BAĞLI OLARAK ORTAYA ÇIKAN KROMOZOM HASSASİYETLERİ VE SİTOTOKSİK ETKİLER

Handan ERBOĞA

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Doç. Dr. Hasan Basri İLA  
Yıl : 2012, Sayfa: 85  
Jüri : Doç. Dr. Hasan Basri İLA  
: Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ  
: Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU

Bu çalışma, kadınlardaki adet döngüsüne (foliküler faz, ovulasyon fazı ve luteal faz) bağlı olarak (ortalama 28 gün) ortaya çıkan hormon değerlerindeki periyodik değişimlerin (dalgalanmaların) kromozom hassasiyeti ve sitotoksiste üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Çalışma grupları herhangi bir ilaçla doğum kontrolü uygulamayan sigara kullanan ve kullanmayanlar olarak dörder kişilik sağlıklı kadın donörlerden (23-28 yaş) oluşturulmuştur. Sitogenetik deneyler *in vitro* koşullarda yapılmış olup kromozomların hassasiyetini belirlemek için alkilleyici bir ajan olan *Mitomycin C* (MMC)'nin bilinen mutajenik etkisinden yararlanılmıştır. Yukarıda anılan üç faza denk gelen zamanlarda (adet döngüsünün 5., 14. ve 23. günlerinde) her bir donörden ayrı ayrı kan alınıp muamelesiz kontrol grubu ile 24 ve 48 saatlik MMC muamelesi (pozitif kontrol) grupları oluşturulmuştur. Kromozom hassasiyeti için kardeş kromatid değişim (KKD) frekansı ve kromozom anormalliği (KA) değerleri, sitotoksiste olguları içinse proliferasyon indeksi (PI) ve mitotik indeks (MI) değerleri dikkate alınmıştır. Sigara kullanmayan ve kullanan donörlerden elde edilen sonuçlara göre bütün fazlarda MMC muamelesi, KKD frekansında artışlara neden olmuş, bunların büyük bir bölümü önemli bulunmuştur. Her iki grupta da (sigara kullanmayan ve kullanan) en düşük KKD değeri luteal fazda saptanmıştır. KKD'ye benzer şekilde MMC uygulaması bütün donörlerde genel anlamda KA ve KA/hücre frekanslarını kontrole göre istatistiksel olarak artırmıştır. Kromozom anormalliği bulguları yönünden en düşük değer ilginç bir şekilde yine luteal fazda saptanmıştır. Adet döngüsüne bağlı sitotoksiste bulguları yönünden öne çıkan bir sonuç belirlenmemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Adet Döngüsü Hormonları, İnsan Periferel Kan Lenfositleri, Kardeş Kromatid Değişimi (KKD), Kromozom Anormalliği (KA), Kromozom Hassasiyeti

## ABSTRACT

### MSc.THESIS

# EFFECTS OF PERIODIC CHANGES IN THE MENSTRUAL HORMONES ON THE CHROMOSOMAL SENSITIVITY AND CYTOTOXICITY IN THE REPRODUCTIVE AGEDWOMENS

Handan ERBOĞA

ÇUKUROVA UNIVERSITY  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Hasan Basri İLA  
Year :2012, Pages:85  
Jury : Assoc. Prof. Dr. Hasan Basri İLA  
: Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ  
: Prof. Dr. Rüşü HATİPOĞLU

This study was performed to determine on chromosomal sensitivity and cytotoxicity effects depending on the (average 28 days) periodic changes occurring hormone values (fluctuations) in women the menstrual cycle (follicular phase, ovulation phase and the luteal phase). Working groups (four non-smokers and four smokers) was created healthy female donors (22-25 years old) who not take any oral contraceptive. Cytogenetic experiments were made in vitro condition. To determine of chromosomal sensitivity was benefited from the alkylating agent Mitomycin C (MMC)'s known mutagenic effects. Blood samples were taken for each donor at the times corresponding to the above-mentioned three phases (menstrual cycle 5., 14. and 23rd days). Later groups were formed as untreated control group, treated with MMC 24 hours and 48 hours (positive control). Chromosomal abnormalities (CA), sister chromatid exchange (SCE) frequency, proliferation index (PI), and mitotic index (MI) were taken into consideration for cases of Chromosome sensitivity and cytotoxicity. MMC caused increases in the frequency of SCE, a large part of them were found significant, according to the results obtained from donors (Non-smokers and smokers) in all phases. The lowest SCE frequencies were determined in the luteal phase in both groups (non-smokers and smokers). In general, similar manner with SCE findings, MMC treatment statistically increased CA and CA/cell frequencies compared to control in all donors. Interestingly the lowest values, in terms of findings of chromosome abnormality, were observed in the luteal phase. Clear cytotoxicity findings were not determined depending on menstrual phases.

**Keywords:** Menstrual Cycle Hormones, Human Peripheral Blood Lymphocytes, Sister Chromatid Exchange (SCE), Chromosomal Aberration (KA), Chromosome Sensitivity

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana her açıdan destek olan, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve kişisel gelişimimde sonsuz sabır gösteren danışman hocam sayın Doç. Dr. Hasan Basri İLA'ya en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında, her konuda çok büyük yardımlarını gördüğüm sayın hocam Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ'ateşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez deneylerim sırasında yine çok büyük yardımlarını gördüğüm, Yard.Doç.Dr. Sebile AZIRAK'a, Uzman Biyolog Arş. Gör. Erman S. İSTİFLİ'ye, Uzman Biyolog Mehmet BÜYÜKLEYLA'ya, Uzman Biyolog FezelNİZAM'a, Uzman Biyolog Mehmet ARSLAN'a, Uzman Biyolog Nadire KOPAR'a, Biyolog Tuba CANITEZER'e ve Biyolog Taygun TİMOÇİN'eteşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında maddi ve manevi açıdan bana her zaman destek olan annem Sevim ERBOĞA, babam Halil ERBOĞA'yave işyerinden insan kaynakları ve eğitim müdürümüz Hülya ÖZKUL EROL ve mağaza müdürlerim Ersin ERTAN, Düriye YÜKSEL, Şebnem GÜLve Gökhan TEPEGÖZ'esonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, bu yüksek lisans çalışmasını maddi yönden destekleyen Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine ve Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

## SAYFA

ÖZ .....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER .....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XII
1.GİRİŞ.....	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	7
2.1. Kadınlardaki Doğal Hormon Profili .....	7
2.1.1. Östradiol (E2) Hormonu.....	7
2.1.2. Folikül Uyarıcı Hormon (FSH).....	10
2.1.3 Luteinleştirici Hormon (LH).....	11
2.1.4. Progesteron Hormonu.....	12
2.2. Östrojen'nin (Estradiol=E2) işe karıştığı Genotoksisite ve Kanserojenite. Çalışmaları .....	13
2.3. Progesteron İle Yapılmış Genotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları .....	17
2.4. Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) ve Luteinleştirici Hormon (LH) İle Yapılmış Genotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları .....	19
2.5. Adet Döngüsüne Bağlı Olarak Yapılmış Genotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları .....	19
3.MATERYAL VE METOD.....	23
3.1. Kullanılan Yöntem ve Deney Ekipmanları.....	23
3.1.1. Deneyde Kullanılan Gönüllü Kadın Donörler .....	24
3.1.1.1. Kadınlardaki Normal Adet Döngüsü Periyodu .....	24
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	28
3.1.2.1. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd) (Sigma) .....	28
3.1.2.2. Entellan (Merck).....	29
3.1.2.3. Fiksatif (Tespit Çözeltisi).....	29

3.1.2.4. Giemsa (Merck).....	30
3.1.2.5. Hipotonik Eriyik.....	30
3.1.2.6. Kolkisin (Kolşisin) (Sigma) .....	30
3.1.2.7. Kromozom (Karyotip) Medyumu.....	31
3.1.2.8. Mitomycin C (MMC).....	33
3.1.2.9. Nitrik Asit (HNO <sub>3</sub> ) .....	34
3.1.2.10. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer).....	34
3.1.2.11. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği .....	35
3.1.3. Kullanılan Deneş Ekipmanları .....	35
3.1.3.1. Flow Kabin (Steril Kabin).....	35
3.1.3.2. Hassas Terazî.....	35
3.1.3.3. Heparinli Deneş Tüpleri .....	35
3.1.3.4. Hormon Testi için Kullanılan Ekipman ve Yöntem.....	36
3.1.3.5. İnkübatör .....	36
3.1.3.6. Mikroskop .....	36
3.1.3.7. Santrifüj.....	36
3.1.3.8. Su Banyosu.....	37
3.2. Lamların Temizlenmesi .....	37
3.3. Sterilizasyon .....	37
3.3.1. BrdUrd Eriyiğinin Sterilizasyonu .....	37
3.3.2. Saf Suyun Sterilizasyonu.....	37
3.4. Kardeş Kromatid Değışimi (KKD) (Sister Chromatid Exchange= SCE) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) (Chromosome Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İnceleme .....	38
3.4.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....	38
3.4.1.1. KKD ve KA Yöntemi .....	38
3.4.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması .....	40
3.4.3. Daimi Preparatlarda Mikroskopik İnceleme.....	41
3.4.4. KKD Sayısının ve Proliferasyon İndeksinin (PI) (Replikasyon İndeksi=RI) Saptanması .....	41

3.4.4.1. KKD Sayısının Saptanması.....	41
3.4.4.2. Proliferasyon İndeksi (PI) (Replikasyon İndeksi=RI)'nin Saptanması .....	42
3.4.4.3. Kromozom Anormallikleri (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması .....	47
3.4.4.3. (1). Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması .....	47
3.4.4.3.(2).Mitotik İndeksin (MI) Saptanması .....	48
3.5.Mikroskopta Fotoğraf Çekme .....	49
3.6.İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi .....	49
4.BULGULAR VE TARTIŞMA .....	51
4.1.Bulgular.....	51
4.1.1. Donörlerin Hormon Değerleri .....	51
4.1.2. Aylık Adet Döngüsünün KKD Frekansı Üzerine Etkisi .....	53
4.1.3. Aylık Adet Döngüsünün Kromozom Anormalliği Oluşumu Üzerine Etkisi.....	55
4.1.4. Aylık Adet Döngüsünün DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerine Etkisi.....	63
4.2.Tartışma .....	65
4.2.1. Adet Döngüsü Evrelerinin İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) ve Kromozom Aberasyonu (KA) Üzerindeki Etkisi.....	65
4.2.2. Adet Döngüsü Evrelerinin Hücre Proliferasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerine Olan Etkisi .....	68
5.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	69
KAYNAKLAR .....	71
ÖZGEÇMİŞ .....	85





## ÇİZELGELER DİZİNİ

## SAYFA

Çizelge 3.1. Kromozom Medyum İçeriği .....	32
Çizelge 4.1. Sigara Kullanmayan (NS) ve Sigara Kullanan (S) Donörlerden Farklı Zamanlarda Alınmış Periferik Kanlara Ait Hormon Değerleri Ortalamaları .....	51
Çizelge 4.2. Sigara Kullanmayan ve Kullananların Adet Döngüsünün Çeşitli Aşamalarında Alınan Periferik Kanlardaki KKD Üzerine MMC'nin Etkisi .....	54
Çizelge 4.3. Sigara Kullanmayanların Adet Döngüsünün Çeşitli Aşamalarında Alınan Periferik Kanlardaki Kromozom Anormallik Çeşitleri, Anormal Hücre Yüzdesi ve KA/Hücre oranı .....	61
Çizelge 4.4. Sigara Kullananların Adet Döngüsünün Çeşitli Aşamalarında Alınan Periferik Kanlardaki Kromozom Anormallik Çeşitleri, Anormal Hücre Yüzdesi ve KA/Hücre oranı .....	62



## ŞEKİLLER DİZİNİ

## SAYFA

Şekil 3.1. Kardeş Kromatid Değişiminin Olduğu ve Olmadığı Durumun Şematik Olarak Gösterilmesi (Topaktaş ve Speit, 1990) .....	42
Şekil 3.2. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin (dU)'in kimyasal yapıları.....	43
Şekil 3.3. BrdUrd'nin DNA Yapısına Girmesi ile Birinci, İkinci ve Üçüncü Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Ayırt Edilmesinin Şematik Olarak Açıklanması (During, 1985'e göre Topaktaş ve Speit, 1990'dan).....	45
Şekil 3.4. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).....	46
Şekil 3.5. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).....	46
Şekil 3.6. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).....	47
Şekil 3.7. Atomik güç mikroskobu ile elde edilmiş kromatid gap görüntüleri.....	48
Şekil 4.1. Foliküler evrede alınan kan örneklerinde 48 saatlik MMC muamelesi sonucu ortaya çıkan kromatid kırığı (B').....	56
Şekil 4.2. Foliküler evrede alınan kan örneklerinde 24 saatlik MMC muamelesi sonucu ortaya çıkan kromatid kırığı (B'').....	57
Şekil 4.3. Foliküler evrede alınan kan örneklerinde 24 saatlik MMC muamelesi sonucu ortaya çıkan kardeş kromatid birleşmesi (SU) .....	58
Şekil 4.4. Foliküler evrede alınan kan örneklerinde 24 saatlik MMC muamelesi sonucu ortaya çıkan disentrik kromozom (DS) .....	58
Şekil 4.5. Foliküler evrede alınan kan örneklerinde kontrol grubunda ortaya çıkan fragment (F) .....	59
Şekil 4.6. Luteal evrede alınan kan örneklerinde 48 saatlik MMC muamelesi sonucu ortaya çıkan kromozom parça değişimi (KD).....	59
Şekil 4.7. Ovulasyon evresinde alınan kan örneklerinde 48 saatlik MMC muamelesi sonucu ortaya çıkan kromozom parça değişimi (KD) .....	60

Şekil 4.8. Luteal evrede alınan kan örneklerinde 24 saatlik MMC muamelesi sonucu ortaya çıkan kromatid değişimi (KD) ..... 60

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AH	: Anormal Hücre
ATM	: Atmosfer
B'	: Kromatid Kırığı
B''	: Kromozom Kırığı
BKI	: Beden Kitle İndeksi
BP-A	: Bisphenol A
BrdUrd	: 5'-Bromo-2'-Deoxyuridine
CA	: Chromosome Aberration
CE	: Chromatid Exchange
Cyt-B	: Cytochalasin-B
DES	: Diethylstilbestrol
DNA	: Deoksiribonukleik Asit
DS	: Disentrik Kromozom
dT	: Deoksitimidin
dU	: Deoxyuridine
E1	: Estron
E2	: Östrojen(Estradiol) Hormonu
E3	: Estriol
EE2	: Etilöstradiol
Er $\alpha$	: Östrojen reseptörü alfa
Er $\beta$	: Östrojen reseptörü beta
F	: Fragment
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
HepG2	: Hepatoselüler Karsinoma
HNO <sub>3</sub>	: Nitrik asit
HPRT	: Hipoksantin Fosforibozil Transferaz
GnRH	: Gonadotropin-releasing hormone
ICSH	: İntersifiyel Hücre Uyarıcı Hormon
IPCS	: International Programme on Chemical Safety

ISCN	: International System for Human Cytogenetic Nomenclature (Uluslararası İnsan Sitogenetik Adlandırma Sistemi)
İDK	: İlaçla Doğum Kontrolü
KA	: Kromozomal Anormallikleri
KCl	: Potasyum klorür
KD	: Kromatid Değişimi
KKB	: Kardeş Kromatid Bileşimi
KKD	: Kardeş Kromatid Değişimi
LH	: Luteinizan Hormon
MgCl <sub>2</sub>	: Magnezyum klorür
MI	: Mitotik indeks
MLA	: Mouse Lymphoma Assay
MMC	: Mitomycin C
MN	: Mikronukleus
NaCl	: Sodyum klorür
NADP	: Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NK	: Natural Killer
NP	: Nonilfenol
NS	: Sigara Kullanmayan
S	: Sigara Kullanan
P	: Poliploidi
PI	: Proliferasyon İndeksi
PK	: Pozitif Kontrol
r	: Korelasyon katsayısı
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute Medium
RI	: Replikasyon İndeksi
rpm	: Revolution Per Minute (devir/dakika)
S9mix	: Metabolik Aktivatör
SCD	: Sister Chromatid Differentiation (Kardeş Kromatidlerin Farklılaşması)
SCE	: Sister Chromatid Exchange (Kardeş Kromatid Değişimi)
SHE	: Syrian hamster embriyo

SSC : Standart Saline Citrate

T : Translokasyon

UV : Ultraviyole





## 1. GİRİŞ

Üreme çağında ve sağlıklı bir kadında ortalama 28 günde bir tekrar eden sürece “adet döngüsü” adı verilir. Adet döngüsü veya siklus, son adet tarihinin ilk gününden bir sonraki adet tarihinin ilk gününe kadar geçen zamanı ve bu zaman içinde kadın vücudunda gerçekleşen olayları ifade eder. Bir adet döngüsü kadında genellikle 28 gün sürmekle birlikte 21 ile 35 gün arası normalin alt ve üst sınırlarıdır. Adet kanaması ortalama 4 gün devam eder ve 1 ile 7 gün arası normalin alt ve üst sınırları olarak kabul edilir (Ayhan, 2008).

Normal bir adet döngüsüne sahip bireyde, cinsiyet hormonlarında (E2=Östrojen hormonu, FSH = Folikül Uyarıcı Hormon, LH=Lüteinleştirici Hormon ve Progesteron Hormonu) ortaya çıkan dalgalanmalar neticesinde bir takım fizyolojik değişiklikler yaşanmaktadır. Esasta bu hormonlardan etkilenen hücrelerin her ne kadar anılan hormon reseptörlerine sahip olması zorunluluğu olsa bile vücudun bir bütün olduğu düşünülecek olursa, hormon etkisine bağlı ortaya çıkacak kısmi değişikliklerin bütünü doğrudan ya da dolaylı olarak etkilemesi sürpriz olmamalıdır. Aslında adet döngüsü esnasında yaşanan olayı özetleyecek olursak; bu süreçte yumurta oluşumu, yumurtanın olgunlaşma ve döllenen yumurtanın atımı gerçekleşmektedir. İşte bu süreç içinde yaşanan fizyolojik hormonal değişiklikler göz önünde bulundurularak anılan bu süreç üç evrede incelenmektedir. Bu dönem sırasıyla aşağıdaki evreleri içerir;

	Kapsadığı Peryot
§ Foliküler faz .....	1-13.gün
§ Ovulasyon fazı (yumurtlama).....	14-15. gün
§ Luteal faz .....	15-28.günler arası

İşte çalışmanın omurgasını oluşturan periyodik örneklemenin zamanlaması yukarıdaki evrelere denk gelecek şekilde yapılmıştır. Bu evrelerde bulunan hormon seviyelerindeki artış ve azalışların (İleriki bölümde ayrıntılı olarak incelenecektir) bireyde bir takım değişiklikler (fizyolojik, genetik, epigenetik vs.) ortaya çıkarması

şaşırtıcı olmamalıdır. İşte çalışmanın hedefine uygun olarak yukarıda anılan örnekleme zamanlarındaki kan lenfositlerinde olası genotoksik etkileri göstermek için kısa süreli genotoksisite testlerinin ikisinden (kardeş kromatid değişimi ve kromozom aberasyonu testi) faydalanılmıştır. Genotoksisite konusunda çalışan otoriteler tarafından, bu testlerin güvenilirliği ile ilgili herhangi bir tereddütün olmadığı, daha önce yapılmış çeşitli çalışmalarla da doğrulanmıştır.

Bugün kısa süreli genotoksisite testleri olarak bilinen ve bir kimyasal maddenin ya da fiziksel bir etkinin genotoksik, anti-genotoksik veya sitotoksik etkisinin olup olmadığının belirlenmesinde en sık kullanılan deneyler; kardeş kromatid değişimi (KKD) (Tucker ve ark, 1993), ve kromozom aberasyonu (KA) testleridir (Carrano ve Natarajan, 1988; Anderson, 1988; Hagmar ve ark, 1994).

Kardeş kromatid değişimi, DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon yoluyla onarılmasını gösteren kardeş kromatidlerin homolog lokusları arasında DNA replikasyon ürünlerinin değişimidir (Sonoda ve ark, 1999, Helleday, 2003). Mutajen ve kanserojen olduğu bilinen maddelere maruz kalan insan ve hayvanların hücrelerinde KKD frekansının arttığı ve tek-gen mutasyonlarının artışı ile KKD frekansı arasında lineer bir ilişki olduğu saptanmıştır (Perry ve Evans, 1975; Carrano ve ark, 1978; Albertini ve ark, 2000). Benzer bir ilişkinin KKD'nin artışıyla *in vivo* tümörlerin oluşumu arasında da olduğu Cheng ve ark (1981), tarafından bildirilmiştir. KA'nin aksine KKD tek başına genotoksik riski belirlemede yetersizdir. Fakat, KKD deneysel çalışmalarda, indikatör test olarak insanlarda genotoksik etkileri göstermede uygun bir yöntem olarak kullanılmaya devam etmektedir (Norppa ve ark, 2006).

KA oluşum mekanizmasının farklı dokularda benzer olmasından dolayı, lenfositlerdeki anormallik seviyesinin, kansere yatkın dokulardaki anormallik seviyesini gösterdiği ve böylece kanser riskinin de göstergesi olabileceği düşünülmektedir (Bonassi ve ark, 2000; Albertini ve ark, 2000; Bonassi ve ark, 2004, 2005). Yüksek KA frekansı, KA artışı başlatan sebebe bakılmaksızın yüksek kanser riskinin bir göstergesi olabilir, çünkü KA oluşumu DNA'daki zincir kırıklarının yanlış onarılmasından da kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Savage, 1993).

Bu çalışmada; adet döngüsü evrelerine paralel olarak değişen hormon seviyelerinin genotoksik ve sitotoksik risk üzerine olan etkileri araştırıldığı için, burada anılan endojen eşey hormonlarının sitolojik etkileri ile ilgili daha önceden yapılan çalışmaların önemli bir kısmında dikkate değer bulgular rapor edilmiştir. Bunlardan bir kaçına aşağıda değinilmiştir.

Kültüre edilmiş insan periferik kan lenfositlerinde dışarıdan çeşitli dozlarda 17 $\beta$  estradiol (Estradiol=E2) ilavesi hücredeki kardeş kromatid sayısını (KKD) önemli derecede artırmıştır (Djelic ve Djelic, 2002). Ayrıca E2'nin kendisi ve muhtemelen metaboliti aşırı dozlarda güçlü bir mutajen olduğu bildirilmiştir (Ahmad ve ark. 2000). Yine E2 ile yapılan bir çalışmada çeşitli hücre test sistemleri ile *in vitro* ve *in vivo* şartlarda denenmesi sonucu hormonun aneuploidinin de dâhil olduğu çeşitli kromozomal ve genetik lezyonlar, kromozomal aberasyon, gen amplifikasyonu ve mikrosatellit kararsızlığı gibi çeşitli genetik bozukluklar ortaya çıkardığı bulunmuştur (Liehr, 2000).

Joseph-Lerner ve ark (1993), *in vitro* fertilizasyon uygulaması için ovulasyon uyaran ilaç kullanan kadınlarda artmış bir KKD frekansı gözlemişlerdir. Başka bir çalışmada (Cavaliere ve ark, 2000), birçok tipte dolaylı DNA hasarları, östrojenlerin indüklediği oksidant kaynaklı olduğu bulunmuş olup estradiol ve sentetik östrojen kültürdeki hücrelerde ve *in vivo* şartlarda sayısal, yapısal kromozom aberasyonları ve birçok tipte gen mutasyonlarını indükledikleri bulunmuştur. Aynı çalışmada doğal estradiol ve östronda dâhil olmak üzere östrojenlerin genotoksik kanserojenler olarak kabul edilmesi gerektiği önerilmiştir. Stopper ve ark (2003), östrojen reseptörü negatif insan ovaryum kanseri hücre hatlarında estradiolün etkisi olarak mitotik karışıklıklar ve kromozom kırıklarıyla ilintili olarak artmış bir mikronukleus formasyonu gözlemişlerdir. Bu bulguların aksine, benzer bir çalışmada (Fischer ve ark, 2001), mikronukleusların oluşumunun estradiolün kromozoma hasar verici aktivitesinden kaynaklanmadığı ileri sürülmüştür. Burada indüklenen genomik hasar hücre siklusunun homeostatik kontrolünden sorumlu kontrol noktalarının bastırılmasından kaynaklanmış olabileceği bildirilmiştir.

Başka bir çalışmada adet döngüsüne bağlı olarak KKD ve KA frekanslarında önemli dalgalanmalar gözlenmiştir; KKD adet döngüsünün sonunda en yüksek

değerine ulaşırken ovulasyonda düşmüştür. Hâlbuki KA'lar adet döngüsünün başından ovulasyon evresine kadar gittikçe artma eğilimindedir ve daha sonra kademeli olarak düşmüştür. MN ise önemli seviyede dalgalanmamıştır. Ayrıca KKD, KA ve MN frekanslarındaki farklılıkları değerlendirmek için üreme çağı kadınlarla, doğum kontrol hapi kullanan kadınlar karşılaştırıldığında aralarında istatistikî anlam bulunmamıştır (Landi ve ark, 1999). Travis ve Key (2003), menapoz sonrası devredeki kadınlarda dolaşımdaki östrojenin artması ile meme kanseri riskinin yükselmesi arasında güçlü bir ilişki olduğunu bulmuşlardır.

Başka bir derleme çalışmada (Preston-Martin ve ark, 1990), artmış hücre bölünme hızının, riskleri de beraberinde getirdiği bildirilmiştir. Bir takım genetik hasar kombinasyonunun birikiminin, hücreyi bir neoplastik fenotipe yönlendirdiği vurgulanmıştır. Bu tip genetik hataların birikimi ve neoplastik transformasyona yönelime, hormonlar, ilaçlar, enfeksiyon ajanları, kimyasallar, fiziksel yahut mekanik travma ve başka kronik irritasyonların (tahriş) yol açtığı bildirilmiştir. Liehr (1997)'in yaptığı bir çalışmada, östrojenlerin kemirgenlerin karaciğerleri hariç başka organlarında tümörleri indüklediklerini bildirmiştir. Son olarak bahsedeceğimiz çalışmada, adet döngüsünün belirli evrelerinde alınıp *in vitro* şartlarda kültüre edilen insan periferik lenfositlerinde mutajen tarafından indüklenen KKD frekanslarının, o dönemde mevcut endojen eşey hormonları tarafından büyük ölçüde değiştirildiği gösterilmiştir. Bu hormonların, mutajenle muameleyi takiben hücrede herhangi bir genetik hata sonrasında aktive olan kontrol noktalarının bastırılmasında rol oynayabileceği bildirilmiştir. Bu etkinin, hormon karsinogenezi ile ilgili bir epigenetik mekanizma olabileceği düşünülmektedir (Cocchi ve ark, 2005).

Yukarıda anılan literatür bilgileri ışığında adet döngüsü hormonlarının bazılarının, bireyin gebelikten korunması ve/veya tedavisi (menopoz vs.) için eksojen olarak alınması yada üreme çağı kadınlarda döngüye bağlı olarak vücuttaki miktarlarının dalgalanması bir takım genotoksik ya da sitotoksik riskleri beraberinde getireceği ortaya konmuştur.

Buradan yola çıkarak; çevresel kirleticilerin yanında çeşitli nedenlerle kullanılmak zorunda kalınan tedavi edicilerin (kemoterapötik ajanlar da dâhil) iyileştirici etkilerinin yanında mevcut yan etkilerinden dolayı risk faktörleri

içerisinde sayılmaktadır. Bu tehlike ve risklerle karşı karşıya olan insan, kimyasalların toksik ve özellikle de genotoksik etkilerine belirgin şekilde maruz kalmaktadır. Bu gibi risklerle karşılaşma zamanını tam olarak ayarlayamadığımız yaşam süreci içinde olası dönemsel kromozomal hassasiyetler veya epigenetik mekanizmalar son derece önem kazanmaktadır. Bununla birlikte ilaç kullanım periyodunun kısmen ayarlanması bile varsa dönemsel kromozom duyarlılık sürecinin atlatılmasında çok önemli katkılar sağlayacaktır. Bu bilinçle olası olumsuz etkilerden bireylerin kendini maksimum seviyede koruması önerilebilir.

Bizim çalışmamızda ise, sigara kullanmayan ve kullanan üreme çağında ve ilaçlı doğum kontrolü uygulamayan kadınlarda adet döngüsüne bağlı olarak vücutta miktarı değişen eşey hormonlarının (Estradiol, FSH, LH ve progesteron) kromozom hassasiyeti ve sitotoksite üzerine olan etkilerini incelemek amacıyla KKD ve KA testleri uygulanmış ve sitotoksiteyi belirlemek için de PI ve MI saptanmıştır.



## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

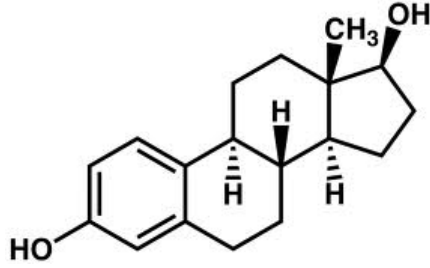
Bu çalışmada, üreme çağında, gebe olmayan ve ilaçla doğum kontrolü (İDK) uygulamayan kadınların aylık periyodik adet döngüsü sürecinde rol aldığı bilinen bazı hormonların (E2, FSH, LH ve progesteron) kandaki konsantrasyon değişimine bağlı olarak ortaya çıkması muhtemel olan kromozom hassasiyeti ve sitotoksik etkileri çeşitli testlerle sınanmıştır. Çalışma her ne kadar doğal hormon dalgalanmalarına bağlı etkileri incelemeyi hedefliyorsa da literatürde bu konuda oldukça kısıtlı çalışmalara rastlanıldığı için *in vivo* ve *in vitro* şartlarda eksojen hormon muamelesinin ve hormon tedavisinin etkilerini inceleyen çalışmalara geniş çapta değinilmiştir. Bu bölümde ise anılan hormonlar ve adet döngüsü evrelerine bağlı olarak ortaya çıkan genotoksik ve sitotoksik etkiler kronolojik olarak ele alınacaktır.

### 2.1. Kadınlardaki Doğal Hormon Profili

#### 2.1.1. Estradiol (E2) Hormonu

Estradiol (E2, 17 $\beta$ -estradiol ya da oestradiol olarak anılan) bir cinsiyet hormonudur. Moleküler yapısında iki hidroksil grubu bulundurduğu için estradiol E2 olarak simgelenmiştir. Estron (E1) bir, estriol (E3) ise yapısında üç OH grubu barındırmaktadır. Estradiol, östrojenik etki açısından estrondan yaklaşık 10 kat estriol ise yaklaşık 80 kat daha güçlüdür. Üreme çağı kadınlarda adet döngüsünün foliküler fazının erken evresi hariç serum seviyesi estrondan bir miktar daha yüksektir. Üreme çağında östrojen mutlak serum seviyesi kadar östrojenik aktivite yönünden de baskındır. Menopoz esnasında östron, gebelik esnasında estriol dolaşımdaki östrojene baskındır. Testosteronun aktif metabolik bir ürünü olarak üretilmekte olan estradiol erkeklerde de bulunmaktadır. Erkeklerdeki serum seviyesi (14 - 55 pg/mL) postmenopozal kadınlardaki seviye (< 35 pg/mL) ile kabaca karşılaştırılabilir düzeydedir. Estradiol sadece üreme ve cinsiyet fonksiyonları üzerine değil kemik gibi diğer organlar üzerine de kritik etkilere sahiptir (Anomynous,2012).





Estradiolün açık formülü

Östrojen hormonu, kadınların adet döngüsünde ve diğer önemli rol oynayan bir grup steroid hormondur. Östrojen üreme yaşında kadınlarda seviyeleri çok yüksektir. Östrojen kadınlarda meme gibi ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişimini sağlar ve adet döngüsüyle ilişkili olan endometrium kalınlaşması ve diğer süreçleri düzenler. Folikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteinizan hormon (LH), yumurtlayan kadınlarda östrojen üretimini düzenlerler. Kan dolaşımında bulunan östrojen, FSH ve LH'nin seviyelerinin azalmasına neden olduğu için bazı oral kontraseptiflerde (doğum kontrol ilacı) östrojenler bulunur (Vardar ve ark, 1993).

**Sentezi (Kimyasal Bileşimi):** Diğer steroidler gibi estradiol de kolesterolden türemiştir. Yan zincir bölünmesinin ardından delta-5 yahut delta-4 yolağı kullanılarak anahtar aracı molekül androstenedione sentezlenir. Androstenedione'nin bir bölümü testosterona dönüştürülür ki bu da aromataz adı verilen bir enzim aracılığıyla estradiole dönüştürülür. Alternatif bir yolak olarak androstenedione önce estrona aromatize edilir, daha sonra estradiole dönüştürülür.

**Üretimi:** Üreme çağı yılları boyunca estradiol kadınlarda ovaryumun birçok granuloza hücreleri tarafından üretilmektedir. Teka follikül hücreleri tarafından üretilen androstenedione aromatisasyonu sayesinde oluşturulan estron, 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase tarafından estradiole dönüştürülür. Az miktarda estradiol adrenal korteks ve (erkeklerde) testis tarafından üretilir. Estradiol sadece gonadlarda üretilmez: her iki cinsiyette de testosteron aromatisasyon aracılığıyla estradiole çevrilir. Özellikle yağ hücreleri öncü molekülleri estradiole dönüştürmede aktif rol oynar ve bu durum menopoz sonrasında bile devam eder. Estradiol ayrıca beyinde ve arterial duvarda da üretilmektedir (Anomynous,2012).

**Etki Mekanizması:**Estradiol hücrelere serbestçe girer ve bir sitoplazmik hücre reseptörü ile etkileşime geçer. Östrojen reseptörünün liganda (substrat) bağlanmasının ardından estradiol hedef hücrenin nukleusuna girerek gen transkripsiyonunu düzenler. Burada transkripte edilen mRNA ribozomla etkileşime girerek estradiolun etkinliğini gösterdiği hedef hücrede spesifik proteini üretir. Estradiol diğer estrogenlerin aksine her iki östrojen reseptörüne (ER $\alpha$  ve ER $\beta$ ) de iyi bir şekilde bağlanır. Estradiol doğal yollardan oluşan en kuvvetli östrojendir (Wikipedia).

**Östrojen Hormonunun Görevleri:**Kadınlarda bulunan üç ana östrojen, estradiol, estriol ve estron'dur. Menarş ile menopoz arasında başlıca östrojen estradiol'dur. Ergenlik çağında vücudun hipofiz bezinden salgılanan FSH ve LH hormonları genç kızlarda yumurtalıkları uyararak östrojen salgısını başlatır (Vardar ve ark, 1993).

Östrojen hormonu salınımı genç kızlarda boy büyümesi erkeklere nazaran ergenliğin başında başlar, hızlı olur ve daha çabuk biter. Östrojenin etkisi ile genital bölgede kıllanma, kalça bölgesinde yağlanma, memelerde büyüme, meme başının renginde koyulaşma ve gelişme görülür. Genç kızlarda vücut hatları yuvarlaklaşır, meme ve kalçalar dolgunlaşır. Yumurtalıkların hacmi artar, rahim iç ve dıştan kalınlaşır, vajina boy olarak uzar ve içindeki hücreler kayganlığı sağlayan mukus maddesini salgılar (Vardar ve ark, 1993).

Kadınlarda ergenliğin son noktası olarak adet kanaması gerçekleşir ve bununla beraber boy büyümesi durur. Östrojen, progesteron dediğimiz diğer bir hormonla belirli bir düzen içinde çalışır. Âdetin ilk iki haftasında östrojen salgılanıp, rahmi büyütür ve yumurtanın oluşmasında rol oynar. Adet döneminin son iki haftasında progesteron salgılanarak rahim salgılarını arttırır, eğer bu dönemde hamilelik gerçekleşirse progesteron rahmi hamileliğe hazırlar, gebelik oluşmaz ise progesteron adet kanamasına yani mens oluşumuna yol açar (Vardar ve ark, 1993).

**Östrojen Eksikliği:**Östrojen eksikliği memelerde küçülme, vajinada kuruluk, cinsel ilişki esnasında ağrı, ciltte kırısklık, saç dökülmesi, vajinada sarkma, cinsel isteksizlik ve cinsel ilişkiden zevk almama sonuçlarını doğurur. Östrojen eksikliği

olursa kadın erken menopoza girebilir, bu durumda sıcak basmaları, terleme atakları ve psikolojik dengesizlikler görülür (Vardar ve ark, 1993).

**Östrojen Fazlalığı:**Östrojen fazlalığı en sık yumurtalık faaliyetlerinin bozulması sonucu gelişir. Polikistik over hastalığı dediğimiz sendromda düzenli aylık yumurtlama yoktur ve kısırlık vardır. Fazla östrojenin en kötü sonucu kanser hücrelerini uyarmasıdır. Östrojen hap olarak alınsa da vücut kendi kendine aşırı salgılama yapsa da fazlası kanseri tetikleyebilir. Östrojen düzeyinin kanda yüksek olması rahim ve meme kanseri için direk bir risk faktörüdür. Östrojen fazlalığı yağ dokusunun miktarını artırır. Artan yağ dokusunda daha fazla testosteron östrojene çevrilir, bu da yağ dokusu miktarını daha da artırır. Sonuçta bir kısır döngü oluşur. Daha fazla östrojen daha fazla yağ; bu da yine daha fazla östrojen demektir. Sonuçta hücreler uyarılır ve vücutta kadınlık organlarında kanser gelişimi başlayabilir. Östrojen fazlalığı vücudun su ve tuz tutmasına neden olur. Yüz yuvarlaklaşır, el ve ayaklarda şişlik ve ödem gelişir. Östrojen fazlalığı bacak damarlarının tıkanmasına, akciğere pıhtı kaçmasına, safra kesesinde taş oluşmasına ve tansiyonda artışa sebep olabilir (Vardar ve ark, 1993).

### 2.1.2. Folikül Uyarıcı Hormon (FSH)

FSH insanlarda ve diğer hayvanlarda bulunan bir hormondur. Bu hormon ön hipofiz bezinin gonadotrof (gonadotropin sentezleyen hücre) bölgesi tarafından sentezlenir ve salgılanır. FSH gelişme, büyüme, ergenlik olgunlaşması ve vücudun üreme işlemlerini düzenlemektedir. FSH ve luteinleştirici hormon (LH) üreme için sinerjik etki gösterirler. Özellikle, ön hipofiz tarafından salınan FSH'ta bir artış ovulasyona neden olur (Anomynous,2012).

**Yapısı:**FSH bir glikoproteindir. Her bir monomerik birim ona bağlı bir şeker ile bir protein molekülü olup, bunlar bir araya gelerek işlevsel proteini oluştururlar. FSH yapısı LH, TSH ve hCG yapısına benzemektedir. Protein dimer alfa ve beta alt birimleri ile etiketli iki polipeptid içermektedir. LH, FSH, TSH ve hCG'nin alfa alt birimleri identik olup 92 amino asit içermektedir. Beta alt birimleri değişken olup FSH'nin kendine özgü FSH reseptörü ile etkileşiminden sorumlu olan 118 amino

asitten ibaret bir beta alt ünitesine (FSH  $\beta$ ) sahiptir. Hormonunun şeker kısmı fukoz (aldoheksoz), galaktoz, mannoz, galaktosamin, glikozamin ve siyalik asitten oluşmaktadır, bu durum onun biyolojik yarı-ömrü için kritiktir. FSH yarılanma ömrü 3-4 saattir (Anomynous,2012).

**Genleri:**Molekülün alfa alt biriminin geni, kromozomun 6p21.1-23 bölgesine yerleşmiştir. Bu molekül farklı hücre tiplerinde eksprese edilmektedir. FSH'ın beta alt biriminin geni ise kromozom 11p13 bölgesine yerleşmiş ve hipofiz hücrelerinin gonadotrof bölgesinde eksprese edilmektedir (Anomynous,2012).

### 2.1.3 Luteinleştirici Hormon (LH)

Luteinizan hormon (LH, bazen lutropin ve lutrophin olarak da bilinir) ön hipofiz bezi tarafından üretilen bir hormondur. Kadınlarda akut LH yükselmesi ovulasyon ve korpus luteum gelişimini tetikler. Erkeklerde ise interstisyel hücre uyarıcı hormon (ICSH) da denilen LH, Leydig hücrelerinde testosteron üretimi uyarır. LH ile FSH sinerjik hareket etmektedirler (Anomynous,2012).

**Yapısı:**LH bir heterodimerik glikoproteindir. Her bir monomerik birim glikoprotein molekülü olup; bir alfa ve bir de beta alt birim bir araya gelerek tam olarak işlevsel proteini oluştururlar.

Yapısı diğer glikoprotein hormonlara (FSH, TSH ve hCG), benzemektedir. İki glikopeptidik alt birimden ibaret olan protein dimer nonkovalent şekilde bir araya getirilmiştir (yani bunları birbirine bağlayan bir disülfid köprüsü yoktur).

LH, FSH, TSH ve hCG'nin alfa alt birimleri birbirlerinin aynıdır ve insanda 92 amino asit içeren, hemen hemen bütün diğer omurgalılarda 96 amino asitten ibaret bir moleküldür (Anomynous,2012).

**Genleri:**Alfa alt birimi geni kromozom 6q12.21 üzerinde yer almaktadır. Luteinizan hormon beta alt birim geni ise kromozom 19q13.32 üzerinde LHB/CGB gen kümesinde lokalize olmuştur. Alfa geni aktivitesi aksine, beta LH altbirim geni aktivitesi hipofiz gonadotropik hücreleri ile sınırlıdır. Bu durum hipotalamustan gonadotropin salgılatıcı hormon tarafından düzenlenir.

#### 2.1.4. Progesteron Hormonu

**Görevleri:**Progesteron her ay, rahmi hamilelik için hazırlayan başka bir kadınlık hormonudur. Ayın ikinci yarısında progesteron seviyesi birkaç günde yükselir ve ardından adet kanamasıyla birlikte düşer. Doğum kontrol hapları progesteronun sentetik formlarıdır. Progesteron aslında yumurtalık tarafından salgılanan bir cinsiyet hormonudur. Ön hipofizden salgılanan lutein yapıcı hormonun denetimi altında üretilir. Progesteron başlıca etkilerini kadın cinsel organlarında gösterir. Östrojenin etkilerini bastırır ve östrojenle birlikte bazı değişimlere yol açar (Vardar ve ark, 1993).

**Progesteron hormonun kimyasal yapısı:**Dölyatağı, uterus kas dokusunun uyarılar birliğini azaltarak kasılmasını zorlaştırır, bu salgının artmasını sağlar, dölyatağı ağzındaki (serviks) bezlerin salgısının birleşimini ve özelliklerini değiştirir, dölyatağında döllenmiş yumurtanın daha kolay yerleşmesi için gerekli ortamı hazırlar. Bütün bu özellikleriyle gebeliğin başlamasını ve sürmesini sağlayan progesteron ayrıca gebelikte diğer hormonlarla birlikte meme dokusunu geliştirir ve bu dokuyu doğum sonrasında süt salgılamaya hazır duruma getirir. Düşük tehlikesi durumunda erken gebelikte bazen progesteron azlığı ihtimali düşünülerek düşüğü engellemek için az miktarda progesteron ilaçları (duphaston ve progestan gibi) doktorun önerisi ile kullanılmaktadır (Vardar ve ark, 1993).

**Luteal Faz Kusuru:**Luteal faz kusuru ya da luteal faz yetmezliği adet günü ile karşılaştırıldığında rahim iç tabakasının 2 gün ya da daha fazla geride olması ve gerektiği kadar olgunlaşmamasıdır. Eğer bu durum iki adet dönemi arka arkaya saptanır ise luteal faz bozukluğunun kısırılık nedeni olabileceği kabul edilir. Kısırılık (infertilite) nedeni ile tedavi olan veya kadın doğum uzmanına başvuran kadınların % 3-4'ünde sorun luteal faz kusurudur. Tekrarlayan düşüklerde de bu sorun görülmektedir ve bu oran biraz daha yüksektir. Progesteron yetersizliğinin luteal faz defektine neden olabileceği düşünülmektedir. Bunun dışında yüksek prolaktin düzeylerinde ve yumurtlamanın uyarılması için klomifen (klomen, gonophene) alan kadınlarda da luteal faz yetmezliği görülür (Vardar ve ark, 1993).

## 2.2. Östrojen'nin (Estradiol=E<sub>2</sub>) ile ilgili Genotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları

Gebelikten östrojen-progestojen kombinasyonu preparatıyla korunan kadınlarda KKD frekansının arttığı gösterilmiştir. Bu artış ilaç kesilmesinden üç ay sonra düşme eğilimine girmiştir. Öte yandan enjekte edilebilir progesteron'nun KKD frekansında değişikliklere yol açmadığı aynı çalışmada belirtilmiştir (Murthy ve Prema, 1983). Kochhar (1985) kültüre edilmiş Çin hamsterı ovaryum (CHO) hücrelerinde 17-beta estradiol, estriol, estrone ve ethynyl estradiol steroid bileşiklerinin, anılan hücrelerde çeşitli tipte kromozom aberasyonlarını oluşturmada etkili olduğunu belirtmiştir. Aynı araştırmacının yaptığı benzer bir çalışmada (Kochhar, 1988), 17-beta estradiol, estriol, estrone ve ethynyl estradiol bileşiklerinin CHO hücrelerinde KKD frekansını kontrole göre önemli seviyede artırdığı ve bu artışın da doza bağlı bir artış şeklinde olduğu bildirilmiştir. Benzer şekilde *in vitro* fertilizasyon (tüp bebek) uygulaması için ovulasyon uyaran ilaç kullanan kadınlarda KKD frekansının arttığı bildirilmiştir (Joseph-Lerner ve ark, 1993). Ancak Ames Salmonella mikrozom testi ile sınılanmış çeşitli cinsiyet steroidlerinin, S9 mix varlığında ya da yokluğunda herhangi bir gen mutasyonuna yol açmadığı (Lang ve Reimann, 1993), belirlenmiştir. Benzer şekilde bir östrojen olan lynoral'ın farelere *in vivo* olarak uygulanması sonrasında kemik iliği hücrelerinde kromozom aberasyonu ve mikronukleus gibi önemli bir genetik hasara yol açmadığı (Shyama ve Rahiman, 1996), saptanmıştır. Liehr (1997), yaptığı bir çalışmada, östrojenlerin kemirgenlerin karaciğerleri hariç başka organlarında tümörleri indüklediklerini bildirmiştir. Hundal ve ark (1997), ise genel bir kullanıma sahip östrojenlerden, estrogens-ethynyl estradiol, cyclotriol ve cyclodiol'ün etkilerini kısa süreli *in vitro* ve *in vivo* deneylerle incelemişlerdir. Sonuç olarak ilaçlardan hiç birisi Ames salmonella testinde, S9 mix varlığında ya da yokluğunda His+ revertantlarının sayısını önemli seviyede ne artırmış ne de azaltmıştır. Bununla birlikte bu ilaçların kromozom hasarlarını ve kardeş kromatid değişimini artırmış olması onların klastojenik potansiyeli için önemli kanıtlar olabileceğini belirtmişlerdir. Tsutsui ve Barrett (1997)'in yaptığı çalışmada E2 ve DES (diethylstilbestrol) ve de bunların metabolitlerinin Syrian

hamster embriyo (SHE) hücrelerinde morfolojik ve neoplastik transformasyonları uyardığı ve ayrıca bu iki kimyasalla muamele edilen hücrelerde herhangi bir DNA hasarının ortaya çıkmadığını göstermişlerdir. Ancak araştırmacılar sayısal kromozom anormalliğinin mitotik aparatın fonksiyonunun bozulmasından ya da mikrotübül karmaşasından kaynaklanmış olabileceğini ifade etmişlerdir. Ayrıca E2'nin kendisi ve muhtemelen metaboliti aşırı dozlarda güçlü bir mutajen olduğunu Ahmad ve ark, (2000), bildirmiştir. Kayıkçioğlu ve ark (2000), çeşitli nedenlerle menopoza girmiş kadınlarda östrojen-progesteron (A grubu) ve yalnızca östrojen (B grubu) tedavisi ardından KKD frekansında artış tespit etmişler ve bu artışın potansiyel habis tümörün bir kanıtı olabileceğini öne sürmüşlerdir. Yine E2 ile yapılan başka bir çalışmada çeşitli hücre test sistemleri *in vitro* ve *in vivo* şartlarda denenmiştir. Anılan hormonun aneuploidinin de dâhil olduğu çeşitli kromozomal ve genetik lezyonlar, kromozomal aberasyon, gen amplifikasyonu ve mikrosatellit kararsızlığı gibi çeşitli genetik bozukluklar ortaya çıkardığı bulunmuştur (Liehr ve ark, 2000). Estradiol ve sentetik östrojen, kültürdeki hücrelerde ve *in vivo* şartlarda sayısal, yapısal kromozom aberasyonları ve birçok tipte gen mutasyonlarını indükledikleri bulunmuştur (Cavalieri ve ark, 2000). Hormonal karsinogenezde östrojenlerin genotoksik rollerini saptamak için yapılan bir çalışmada (Tsutsui ve ark, 2000), 17-beta estradiol ve onun sekiz metabolitinin büyük bir kısmının SHE hücrelerinde klastojenik ve anöjenik oldukları bildirilmiştir. Buna benzer bir çalışmada mikronukleusların oluşumunun estradiolün kromozoma hasar verici aktivitesinden kaynaklanmadığı ileri sürülmüştür. Burada indüklenen genomik hasar hücre siklusunun homeostatik kontrolünden sorumlu kontrol noktalarının bastırılmasından kaynaklanmış olabileceği bildirilmiştir (Fischer ve ark, 2001). Liehr (2001)'in V79 hücreleri ve SHE hücreleriyle yaptığı bir çalışma sonucunda östrojenlerin anılan hücrelerde Hipoksantin fosforibozil transferaz (hprt) genindeki mutasyonları uyardığını saptamıştır. Ayrıca araştırmacı estradiolün mutajen/kanserojen olarak ve tümör indüksiyonunda gelişimi uyarıcı hormon olarak ikili rol oynadığı sonucuna varmıştır. Kültüre edilmiş insan periferik kan lenfositlerinde dışarıdan çeşitli dozlarda 17-β estradiol ilavesi hücredeki KKD frekansını önemli derecede artırmıştır (Djelic ve Djelic, 2002). Başka bir çalışmada (Yared ve ark, 2002), kumulatif östrojen

muamelesinin meme kanseri riskinin artmasıyla bağlantılı olduğunu belirtmişlerdir. Stopper ve ark (2003), östrojen reseptörü negatif insan ovaryum kanseri hücre hatlarında estradiolün indüklediği hücre proliferasyonu ile ilgili olarak artmış bir mikronukleus formasyonu gözlemişlerdir. Gebeliği önleyici formülasyon içinde kullanılan ve steroidal bir östrojen olan Ethinylestradiol kültüre edilmiş memeli lenfositlerinde uygulanması (1, 5 ve 10 mikroM) sonucunda S9 mix yokluğunda ve NADP bulunmayan S9'lu ortamlarda genotoksik olmadığı ancak NADP bulunan S9'lu ortamda genotoksik olduğu tespit edilmiştir (Siddique ve ark, 2005). Östrojene bağlı meme kanseri çalışmalarında model organizma olarak kullanılan dişi ACI<sup>1</sup> sıçanlarının, östrojenin önemli bir metaboliti olan “estradiol-3,4-quinone” ile yapılan muamele sonrasında meme bezi hücrelerinin DNA'larında AT-GC transisyon mutasyonları saptanmıştır (Mailander ve ark, 2006). Masuda ve ark (2006), nitritle muamele edilmiş 17-β estradiolün Salmonella typhimurium'un TA100 ve TA98 suşlarında mutajenik aktivite gösterdiğini bulmuşlardır. Ayrıca aynı çalışmada nitrit muameleli E2'nin erkek test farelerinde klastojenik bir etki göstererek mikronukleusu önemli seviyede yükselttiğini saptamışlardır. E2 ile iki farklı yoldan muamele edilen (yaşadığı suya ilave şeklinde ve intraperitoneal muamele) deniz levreğinde endokrinel karmaşa, plasma kortisol seviyesi azalması, genotoksisite ve eritrositlerde nükleer anormallikler rapor edilmiştir (Teles ve ark, 2006). Ancak araştırmacılar muamele yolunun ve uygulama dozunun belirgin bir etkisini saptamamışlardır. Rossi ve ark (2007), östrojenin kanserojenik potansiyeli ile ilişkili olmayan zayıf bir genotoksisiteye sahip olduğu hipotezini kendi çalışma bulgularıyla desteklemişlerdir. Estrojen ve bazı çevresel estrojen benzeri kimyasallarla yapılan bir çalışmada (Tayama ve ark, 2008), E2'nin ve östrojen benzeri kimyasallardan DES ve BP-A (bisphenol A)'nın anenjenik özelliğe sahip olduğunu yani poliploid indükleyici ajan oldukları rapor edilmiştir. Naik ve Vijayalaxmi (2009), bir östrojenik bileşik olan bisfenol-A (BP-A)'nın genotoksisitesini İsviçre albino farelerinde üç sitogenetik test (kromozom aberasyon testi, mikronukleus testi ve c-mitotik etki) ile sınımlamışlardır. Sonuç olarak BP-A'nın kromozom hasarı ve

<sup>1</sup> Bu sıçan ırkı 1926 yılında Kolombiya Üniversitesinde Irish postlu Agust erkeği ile Kopenak 2331 dişisinin kazara çiftleştirilmesi sonucu elde edilmiş bir ırktır. Bu ırk, östrojenin uyardığı hipofiz gelişimi, karsinogenez ve transplant immünolojisi çalışmalarında kullanılmaktadır.



mikronukleus oluşturmadığını ancak genotoksik potansiyeli olarak kemik iliği hücrelerinde akromatik lezyonlar ve c-mitotik etkiler ortaya çıktığı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada östrojen ve türevlerinin genotoksitesini göstermede çift kabuklu bir yumuşakça olan *Scrobicularia plana*'da yapılan komet deneyi (Petridis ve ark, 2009), sonucunda doğal östrojen 17- $\beta$  estradiol (E2) ve sentetik (kseno) östrojen etinilöstradiol (EE2) ve nonilfenol (NP)'un *S. plana*'da genotoksik etki ortaya çıkardıkları saptanmıştır. Başka bir çalışmada Fucic ve ark (2009)'nın sentetik östrojen diethylstilbestrol (DES)'un cinsiyet ve yaşa bağlı genotoksitesini, üç haftalık prepubertal ve 12 haftalık ergin BALB/JC farelerinde MN oluşturma potansiyelini inceleyerek araştırmışlardır. Bu sentetik östrojenin özellikle erkek prepubertal farelerde genotoksitesinin daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Kateşol östrojen özellikle de 17- $\beta$  estradiol'ün 4-hidroksilli metabolitlerinin normal insan ve sıçan meme epitel hücre hatlarında östrojenin indüklediği karsinogenezden sorumlu oldukları bildirilmiştir (Zahid ve ark, 2010). Nelles ve ark (2011), tarafından yapılan derleme bir çalışmaya göre östrojenin, laboratuvar ve klinik kanıtlara göre insan prostat kanserinden sorumlu olabileceği kemirgenler gibi *in vivo* modeller ile yapılan çalışmalarda açık bir şekilde ortaya konmuştur. Bu etkinin yanı sıra epigenetik modifikasyonlar, direk genotoksite, hiperprolaktinemi, inflamasyon ve immünojik değişikliklere de yol açabileceği belirtilmektedir. Başka bir çalışmada (Okoh ve ark, 2011), fizyolojik östrojen ve östrojen metabolitlerinin reaktif oksijen türlerini (ROT) üretebileceğini, bu türlerin hücre döngüsünü çeşitli aşamalarda etkilediği saptanmıştır. Bu araştırmacılar sonuç olarak uzun süre östrojen muamelesine maruz kalmanın meme kanseri için temel risk faktörlerinden birisi olduğunu belirtmişlerdir. Magkoufopoulou ve ark (2011)'nın, yanlışı pozitif genotoksin olarak quarsetin, gerçek genotoksin ve genotoksin olmayan 8-hidroksi quinolin ve 17-beta-estradiolün indüklediği hücre sel mekanizmayı tanımlamak için HepG2 (hepatoselüler karsinoma) hücreleri ile yaptıkları çalışmada quarsetin gerçek bir genotoksine benzer fenotipik etkileri uyarmıştır. Ancak 17-beta-estradiolünde dâhil olduğu diğer iki bileşik ise fenotipik ve transkriptomik düzeyde gerçek bir genotoksinle benzerlik göstermemiştir.

### 2.3. Progesteron İle Yapılmış Genotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları

Koopman ve ark (1981) erkeklere ait *in vitro* monositlerle yaptıkları bir çalışmada, östrojen ve progestajenlerin sitotoksik aktivite üzerine herhangi bir etkisi olmadığını ortaya çıkarmışlardır. Başka bir çalışmada ise (Szekeres-Bartho ve ark, 1983), erken doğum tehdidi altında bulunan kadınlara herhangi bir tedavi uygulanmadan alınan kanlarında sitotoksik aktivite ve progesteron bağlama kapasitesi test edilmiş olup tedavi başlangıcını takiben lenfositlerin progesteron bağlama kapasitesi önemli seviyede artarken sitotoksik aktivite önemli ölçüde azalmıştır. Parádi (1981)'ye göre üç progestin (ethynodiol diacetate, norethynodrel ve norgestrel) ve iki östrojen (ethinyloestradiol and mestranol) kombinasyonu ile beslenen Oregon-R (*Drasophila Melanogaster*) meyve sineği larvalarında hiçbir steroid, X'e bağlı resesif letal mutasyonu indüklememiştir. Bir başka çalışmada Hill ve Wolff (1983), eksojen kadın hormonlarının (estradiol, estriol ve progesteron) dietilstilbestrol (DES)'ün indüklediği KKD frekansında değişiklik yapıp yapmadığını inceleme için yaptıkları çalışmada, DES tarafından indüklenen KKD frekansı anılan hormonların muamelesi sonucu herhangi bir değişikliğe uğramadığını gözlemişlerdir. Lukić ve Barjaktarović (1987), hamilelik sırasında progesteron tedavisi uygulanmış kadınların çocuklarıyla kontrol grubu çocukların kromozomlarındaki KKD frekansları karşılaştırdığında tedavi uygulanan annelerin çocuklarında küçük ancak önemli bir KKD frekansı artışı olduğunu belirtmişlerdir. Becher (1988), meme kanseri tedavisinde kullanılan yarı sentetik progestin olan medroxyprogesterone acetate alan 11 hasta üzerinde yaptığı incelemelerde bu ilacın KKD frekansına önemli bir etki yapmadığını saptamıştır. Furuya ve ark (1991) yaptıkları çalışmada adet döngüsüne bağlı olarak ortaya çıkabilecek kromozom kırıklarını ve KKD frekanslarının diğer fazlara nazaran en yüksek KA oluşumunun luteal fazda ortaya çıktığını tespit etmişler ve KKD frekansında ise istatistiksel olmayan varyasyonlara sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Feinberg ve ark (1992), estradiol ve progesteronun sitotoksisiteyi doza bağlı şekilde baskıladığını saptamışlardır. Medroxyprogesterone acetate, menopoz sürecinde hormon takviyesi olarak kullanılır ve ayrıca meme kanseri tedavisinde kullanılmakta olup bir kimyasal olup bu maddenin mutajenik

potansiyeli hakkında herhangi bir bulgu belirlenmemiştir (Herzog ve Leuschner, 1995). Dhillon ve Dhillon (1996)'nın yatıkları *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda sık kullanılan bir progesteron olan norethisterone acetate'nin klastojenik potansiyelini KA ve KKD testleriyle S9 varlığında ve yokluğunda açık bir şekilde göstermişlerdir. Ancak aynı test maddesi Ames Salmonella deneyinde His+ revertant sayısını kontrole göre ne artırmış ne de azaltmıştır. Benzer başka bir çalışmada gebelikten korunma için kullanılan yaygın iki sentetik progesteron (norgestrel ve norethindrone) *in vitro* insan lenfositlerinde KA ve KKD testlerinin kullanılarak genotoksitesini araştırılmıştır (Ahmad ve ark, 2001). Sonuç olarak norethindrone bütün konsantrasyonlarında ve S9 mix'e bağlı olmaksızın genotoksik olmadığı tespit edilmiş ancak diğer ilacın (norgestrel) KA ve KKD'yi önemli seviyede indükleyerek genetik materyali etkilediği saptanmıştır. Başka bir çalışmada (Boada ve ark, 2002), sıçanların karaciğer hücrelerine günlük 60 mg/kg progesteronun 1, 5 ve 10 gün boyunca uygulanmasının hücre proliferasyonu ve iğ ipliği karışıklıklarını indükleyebilme kapasitesine sahip olduğu halde sitotoksik olmadığı rapor edilmiştir. Martelli ve ark (2003), içinde progesteronunda dâhil olduğu dokuz adet, cinsiyet steroidinin kültüre edilmiş insan ve sıçan hepatositlerindeki DNA tamir mekanizmasını uyarıp uyarmadığını test etmek için yaptıkları çalışmanın sonucunda anılan kimyasalların sıçan hepatositlerindeki DNA tamirini açıkça uyardıkları halde insan hepatositlerinde benzer sonucu saptamamışlardır. Bunun üzerine araştırma ekibi steroidlerin genotoksitesini ve DNA tamirini uyarma yeteneklerinin sıçan ve insan hepatositlerinde farklı davranışlar sergileyebileceğine dikkat çekmişlerdir. Vares ve ark (2004)'nin yaptıkları bir çalışmanın sonuçlarına göre progesteronun, radyasyonun neden olduğu apoptozun inhibisyonunu ve DNA hasarına bağlı hücre proliferasyonu uyarması gibi nedenlerden ötürü, daha sonra hücrede kötü huylu dönüşüme (transformasyon) yol açabileceği önerilmiştir. *In vitro* periferik lenfositler ile yapılan çalışmada (Siddique ve ark, 2006), medroxyprogesterone acetate'ın sadece NADP'li metabolik aktivasyonun (S9 mix) varlığında genotoksik olduğu gösterilmiştir. Baeyens ve ark (2005)'nin yaptığı çalışmada sağlıklı kadınların kan örneklerinde estradiol ve progesteron seviyeleri radyasyonun uyardığı MN oluşumunu etkilememiştir. Murdoch (2005), yaptığı çalışmada vitamin E ve

progesteronun ovaryum metaplazisine karşı koruyucu etki gösterdiğini rapor etmiştir. Kayani ve Parry (2008), tarafından yapılan *in vitro* sitokinez bloklama metoduna göre icra edilen mikronukleus testinde, 17-beta-oestradiol, diethylstilboestrol, progesterone and testosterone'nun genotoksik olduğu ve non-disjunction yoluyla aneuploidiye yol açtığı hâlbuki trenbolonenü bir klastojenik mekanizmayla genotoksisite gösterdiği belirtilmiştir. Ancak melengesterol acetate ve zearanol'ün *in vitro* şartlarda genotoksik olmadığı kanıtlanmıştır.

#### **2.4. Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) ve Luteinleştirici Hormon (LH) İle Yapılmış Genotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları**

Van Buul ve Goudzwaard (1982), tarafından yapılan bir çalışmada FSH uygulanan farelerin kemik iliği hücrelerinde ve spermatogonyum kök hücrelerinde kromozom aberasyonu gözlenmemiştir. Başka bir çalışmada (Joseph-Lerner ve ark. 1993) testosteron ve FSH düzeyleri ile KKD oluşumu arasında pozitif bir ilişkinin varlığı vurgulanmıştır. Baltacı ve Zeyneloğlu (2004)'nin yaptığı çalışmada ise KKD artışının estradiol ile bağlantı olduğu halde bu ilişki FSH ile kurulamamıştır. KKD frekansı ovulasyon fazındaki kadında doğal olarak artmış olup bu artış, FSH alan kadınlardan önemli seviyede düşük bulunmuştur.

#### **2.5. Adet Döngüsüne Bağlı Olarak Yapılmış Genotoksisite ve Kanserojenite Çalışmaları**

Littlefield ve ark (1975)'nin yaptığı çalışmada İlaçla doğum kontrolü (İDK) uygulayan kadınların kan kültürlerinde kromozom kırıklarının artmadığı ve ortaya çıkan kromozom hasarlarının İDK için kullanılan yapay hormonların kullanım süresi ya da dönemi arasında bir ilinti olmadığı saptanmıştır. İyi huylu ve kötü huylu meme kanserli hastalardan alınan periferik kan örnekleri natural killer (NK) sitotoksik aktiviteleri yönünden değerlendirilmiş (White ve ark, 1982), ve iyi huylu meme kanserli kadınlarda NK aktivitesi adet döngüsü statüsüne bakılmaksızın kontrol ile arada fark bulunmamıştır. Kontrol grubu kadınlarda adet döngüsünün ilk yarısında,

NK aktivitesi ikinci yarıdaki aktiviteye göre önemli ölçüde düşük bulunmuştur. Benzer şekilde adet döngüsünün NK hücreleri aktivitesi üzerine etkilerini araştıran bir çalışmada (Sulke ve ark, 1985), preovulasyon evresindeki kadınların NK aktivitesinde erkek gönüllülere göre önemli bir düşüş saptanmıştır. D'Souza ve ark. (1988)'nın kadınlarla yaptıkları bir çalışmada ovulatuvar ve östrojenik safhalar(foliküler evre) , progesteronik safhaya (luteal evre) oranla daha yüksek KKD frekansı ve KA oluşumuna neden olmuştur. Bu çalışmada, spesifik hormona döngünün biyolojik ritminden etkilendikleri genetik hasarın daha çok adet döngüsünün ovulatuvar/östrojenik döneme denk geldiği saptanmıştır. Yapılan başka bir çalışmaya (Landi ve Barale, 1999), göre üreme çağı kadınları ile İDK uygulayan kadınlar ve menopoza karşılaştırıldığında KKD, KA ve MN frekansı yönünden önemli istatistiksel farklar gözlenmemiştir. Ayrıca İDK uygulayan ve menopozlu kadınlar hariç tutularak cinsiyet hormonlarındaki doğal varyasyonların KKD ve KA frekansının referans değerlerinde modülasyonlara neden olabileceği bildirilmiştir. Shakhari ve ark. (2000)'nin yaptığı bir çalışmada adet döngüsünün çeşitli evrelerinde olan kadınlar, İDK uygulayan kadınlar ve normal erkeklerin NK aktivitelerinin karşılaştırılmasında gruplar arasında temel NK aktivite seviyesi bakımından önemli farklar bulunmamıştır. Yovel ve ark. (2001)'nin yaptıkları çalışmada erkeklerin NK aktivitesi, düzenli adet döngüsü olan ya da İDK uygulayan kadınlardan daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca yine bu çalışmada adet döngüsünün NK hücrelerinin aktivite seviyeleri üzerinde önemli etkiye sahip olmadığı ancak preovulasyon fazı esnasında kanın mililitre başına NK hücre sayısının önemli ölçüde artmış olduğu bulunmuştur. Başka bir çalışmada (Souza ve ark, 2001), adet döngüsünün foliküler fazındaki kadınlarda NK sitotoksitesite luteal fazdakilerine oranla önemli seviyede yüksek olduğu saptanmıştır. NK aktivitesinin postmenopozal kadınlar ve erkeklerde foliküler fazdaki kadınlarınkine benzer olduğu bulunmuştur. İlâveten NK aktivitesi ile progesteron düzeyi arasında bir ilişki bulunmamıştır. Bajpayee ve ark (2005)'nin yaptığı bir komet deneyi çalışmasında gönüllü ve sağlıklı 18 Hindistanlı kadının adet döngülerine bağlı olarak ortaya çıkabilecek DNA hasarları araştırılmış olup sonuç olarak tam bir döngü esnasında küçük değişiklikler bulunmuştur. Sonuç olarak komet deneyi ile yapılan bu çalışmada kadınların lenfositlerinde, adet döngüsüne bağlı olan

önemli farklar tespit edilmemiştir. Başka bir çalışmada (Braz ve Salvadori, 2007), komet deneyi için düzenli adet döngüsüne sahip 12 sigara kullanmayan kadın, 12 sigara kullanan kadın, 12 sigara kullanmayan ve düşük dozda gebelik önleyici kullanan kadın ve son grup olarak da 12 sigara kullanmayan erkek (bu grup aynı zamanda İDK uygulamakta) seçilmiştir. Bu çalışmadaki kadınlardan döngünün üç ayrı safhasında (foliküler, ovulasyon ve luteal fazlarda), erkeklerden ise üç ayrı zamanda kan örnekleri alınmıştır. Sonuç olarak, DNA hasar düzeyi farkları bakımından fazlar arasında ve sigara kullanmayan ve kullananlar İDK uygulayanla diğerleri arasında önemli farklılıklar saptanmamıştır. Yine komet deneyi ile yapılan bir çalışmada (Braz ve Salvadori, 2007), İDK uygulayan ve uygulamayan kadınların tam kan ve lenfosit hücreleri arasında DNA hasarı bakımından herhangi bir önemli fark bulunmamıştır. Mahrous (2008), İDK için çeşitli hormon kombinasyonunu kullanan üç grup deney ve bir grup kontrolden ibaret bir çalışmanın sonucunda ilaç alan kadınlarda KKD ve KA yönünden önemli bir fark bulunmadığını saptamıştır.



### 3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada, materyal olarak üreme çağındaki kadınların her bir adet döngüsünün foliküler, ovulasyon ve luteal fazlarında olmak üzere 3 evrede alınan periferik kan örnekleri kullanılmış ve bu evrelerin mutajenlere olan hassasiyetini tespit etmek için ise, etkisi bilinen bir mutajen olan Mitomycin C ayrı ayrı 24 ve 48 saatlik süresince kullanılmıştır. Çalışmada kısa süreli genotoksisite testleri olarak bilimsel otoriteler tarafından geniş kabul gören kromozom anormalliği (KA) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testleri kullanılmıştır.

#### 3.1. Kullanılan Yöntem ve Deney Ekipmanları

Bu çalışma, üreme çağındaki kadınların aylık adet döngüsü evrelerindeki (foliküler evre, ovulasyon evresi ve luteal evre) endojen eşey hormonlarındaki periyodik değişimlere bağlı olarak ortaya çıkması olası kromozom hassasiyetlerini ve sitotoksik etkileri saptayabilmek için gerçekleştirilmiştir. Donörler dört sigara içmeyen ve dört sigara içen olmak üzere toplam sekiz adet yaşları birbirine yakın (23-28) sağlıklı, beden kitle indeksleri (BKI) normal ( $19-24,9 \text{ kg/m}^2$ ) olan, düzenli adet döngüsüne sahip, doğum kontrol hapı kullanmayan, alkol bağımlılığı olmayan, herhangi bir enfeksiyon ve kronik hastalığından ötürü ilaç kullanmayan gönüllü kadınlardan oluşmuştur. Adet döneminin 3 evresinde de her bir donörden adet kanamasının 4-6. günlerinde, 14-15. günlerinde ve 23-24. günlerinde birer olmak üzere üç defa kan örneği alım programı uygulanmıştır. Bu günlerde alınan periferik kanlar Ç.Ü.T.F. Balcalı Hastanesi ("JCI=Joint Commission International" tarafından akredite) merkez biyokimya laboratuvarında hormon (E2, FSH, LH ve progesteron) konsantrasyonları tespitine tabi tutulmuş olup aynı anda heparinize tüplere alınmış paralel örnekler ise Ç.Ü.F.E.F Biyoloji Bölümü Genetik Laboratuvarında genotoksisite çalışmalarında kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan kimyasallarla ilgili bilgiye geçmeden önce adet döngüsü hakkında detaylı bilgi vermek, çalışmaya daha fazla katkı sağlayacaktır.



### 3.1.1. Deneyde Çalışılan Gönüllü Kadın Donörler

#### 3.1.1.1. Kadınlardaki Normal Adet Döngüsü Periyodu

Giriş kısmında da kısaca değinildiği gibi, erişkin (üreme) çağında olan bir kadında periyodik olarak ortalama 28 günde bir tekrar eden sürece “adet döngüsü” adı verilir. Adet döngüsü veya siklus, son adet tarihinin ilk gününden bir sonraki adet tarihinin ilk gününe kadar geçen zamanı ve bu zaman içinde kadın vücudunda gerçekleşen olayları ifade eder. Bir adet döngüsü kadında genellikle 28 gün sürmekle birlikte 21 ile 35 gün arası normalin alt ve üst sınırlarıdır. Adet kanaması ortalama 4 gün devam eder ve 1 ile 7 gün arası normalin alt ve üst sınırları olarak kabul edilir. Adet kanamasını tarif etmek için dilimizde halk arasında farklı ifadeler kullanılmaktadır. Bunlar arasında en sık rastlanılanları “aybaşı olmak”, “adet olmak”, “adet görmek”, “regl olmak”, “menstruasyon kanaması görmek”, “mens olmak”, “kanama görmek”, “periyod” ve “hastalanmak” ifadeleridir (Ayhan, 2008).

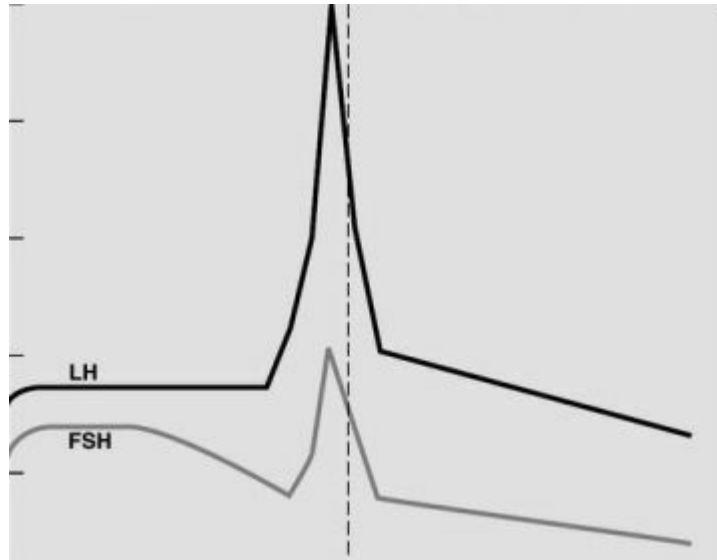
Adet döngüsü ergenlik döneminde kız çocuğunun ergenliğe ulaşması ile başlamaktadır ve bu ilk adete “menarş” denmektedir. Döngünün sona ermesi ise yumurtalıklarda olgunlaşabilecek yumurta hücrelerinin tümüyle tükendiği menopoz dönemine denk gelmektedir. Üreme çağındaki kadınlarda adet kanaması, gebelik döneminde ve emzirmenin devam ettiği sürenin büyük kısmında geçici olarak durur (Ayhan, 2008).

Adet kanaması rahim iç zarının (endometrium) hormonal değişiklikler sonucunda dökülmesidir. Bu dökülme gebelik olmamışsa gerçekleşmekte ve yukarıda da anıldığı gibi yaklaşık 28 günde bir kanama şeklinde olmaktadır. Adet kanamaları yumurtlama fonksiyonuna paralel bir şekilde, her ay düzenli olarak olmakta ve menopozla birlikte sona ermektedir. Adet kanamasının ilk günü adet periyodunun da ilk günüdür (Ayhan, 2008).

Adet döngüsü esnasında beyinde, yumurtalıklarda ve rahim iç tabakasında farklı olaylar meydana gelir. Beyinden salgılanan hormonların yumurtalıklardan birini uyararak başlayan süreç, uyarılan yumurtalıktan döllenmeye hazır bir yumurta hücresinin serbestleşmesine neden olur, bu esnada rahim iç tabakası da

kendini muhtemel bir gebeliğe hazırlar. Adet kanamasının amacı her adet döngüsünde oluşabilecek muhtemel bir gebeliğin yerleşebilmesi ve uygun şartlarda gelişebilmesi için rahim iç tabakasının "tazelenmesi" olarak değerlendirilebilir (Ayhan, 2008).

Adet kanamasının ilk günü beyin dokusunun derinlerinde yer alan hipotalamus adlı bölgeden salgılanan Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) adı verilen hormon, hipotalamusa yakın yerleşimli hipofiz adı verilen salgı bezinden folikül uyarıcı hormon (FSH) salgısını başlatır. FSH hormonu etkisiyle yumurtalıklardan birinde yeni bir yumurta hücresi, folikül adı verilen bir kesecik içinde olgunlaşmaya başlar. Bu olgunlaşma süreci tamamlandığında, olgun folikül içinde üretilen yüksek miktarlarda östrojen hormonu etkisiyle; bir yandan rahim iç tabakası gelişmeye başlar, öte yandan hipofiz bezinden luteinleştirici hormon (LH) adı verilen başka bir hormon salgılanır. LH hormonu yumurta hücresini barındıran folikülü "çatlatır" ve yumurta hücresini serbest bırakır. Yumurta hücresinin serbest kalmasına yumurtlama (ovulasyon) adı verilir (Ayhan, 2008).



Üstteki şekli ortadan ayıran kesikli çizgi yumurtlamanın olduğu anı, eğriler ise LH ve FSH hormonlarının kan seviyesini göstermektedir. Yumurtlamanın hemen öncesinde LH hormonunda keskin bir yükselme görülmektedir (Ayhan, 2008).



Normal bir adet periyodu, yumurta oluşumundaki değişikliğe bağlı olarak; “foliküler faz” ve “luteal faz” olmak üzere iki döneme ayrılabilir. Bu iki dönem, yumurtlama (ovulasyon) ile birbirinden ayrılır. Bu nedenle bir adet periyodu sırasıyla aşağıdaki evreleri içerir;

- § Foliküler faz (Östrojenik faz),
- § Ovulasyon fazı (Ovulatuvar faz),
- § Luteal faz (Progesteronik faz)

Foliküler faz adet kanamasının ilk günü ile başlar. Bu dönem boyunca salgılanan östrojen hormonu ile rahim iç zarı büyüyerek kalınlaşır. Daha sonra salgılanan östrojen hormonunun belirli bir düzeyi bulması ile yumurtlama gerçekleşir ve bu dönem sona erer. Foliküler faz denmesinin nedeni bu dönemde yumurta hücresinin yani folikül’ün gelişmesidir. Foliküler fazın ne kadar süreceği kadından kadına değişmekle beraber yaklaşık olarak 14 gün sürmektedir. Adet kanaması bir kadında ortalama olarak 3-7 gün sürmektedir. Gebelik olmazsa yumurtlama sonrasında luteal faz başlar ve bu dönem adet kanamasına kadar sürer (Ayhan, 2008).

Luteal faz genellikle sabit olup yaklaşık 14 gündür. Ovulasyon fazı ise foliküler faz ve luteal faz arasındaki dönemi kapsar. Eğer döllenme gerçekleşmezse yani gebelik oluşmazsa korpus luteumun fonksiyonunun bitmesiyle, progesteron

hormonunun 14 gün sonunda salgılanması durur ve gelişmiş olan rahim iç zarı bir kanama ile dışarı atılır, yani adet kanaması başlar (Ayhan, 2008).

Özetlenecek olursa:

Foliküler faz siklusun (kanamanın) ilk günü başlar 14 gün sürer (1-14 gün). Bu fazın sonunda östrojen hormonu artar.

Ovulasyon fazı siklusun 14. günün başlar 14-21. günleri kapsar. Bu fazın başında E2 (Estradiol) ani çıkış yapar. Bu fazın sonuna doğru LH ani çıkış yapar, yumurta çatlar atılır.

Luteal faz siklusun 21. günü başlar bir dahaki adete kadar devam eder. 21-28. günleri kapsar.

Bu dönemde E2 ile birlikte progesteron hormonu salgılanır. Progesteron hormonu bu dönemde ani çıkış yapar.

Normal bir adet periyodunda, endojen eşey hormonlarından, E<sub>2</sub>, FSH, LH ve progesteron rol oynar.

Bu hormonların kadın ve erkeklerdeki referans aralıkları aşağıdaki şekildedir\*:

**FOLİKÜLER FAZ:**

	KADIN
E <sub>2</sub> (ESTROJEN)	63-165 pg/ml
FSH	2,5-10,2 mIU/ml
LH	1,9-12,5 mIU /ml
Progesteron	0,15-1,4 ng/ml

**OVULASYON FAZI:**

	KADIN
E <sub>2</sub> (ESTROJEN)	146-526 pg/ml
FSH	3,4-33,4 mIU/ml
LH	8,7-76,3 mIU/ml
Progesteron	0,2-1,5 ng/ml

**LUTEAL FAZ:****KADIN**

E <sub>2</sub> (ESTROJEN)	33-150 pg/ml
FSH	1,5-9,1 mIU /ml
LH	15,9-54 mIU/ml
Progesteron	3,34-25,56 ng/ml

**BU HORMONLARIN ERKEKTEKİ DEĞERLERİ:****ERKEK**

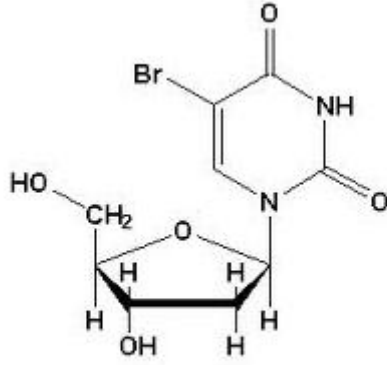
E <sub>2</sub> (ESTROJEN)	7,63-42,6 pg/ml
FSH	1,4-18,1 mIU /ml
LH	1,5-9,3 mIU/ml
Progesteron	0,2-1,4 ng/ml

\*Not: Yukarıda verilen hormon değerleri aralığı Ç.Ü.T.F. Balcalı Hastanesi merkez laboratuvarı verileri olup kurumdan kuruma varyasyonlar gösterebilir.

**3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler****3.1.2.1. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd) (Sigma)**

BrdUrd kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını belirleyebilmek amacıyla kullanılmıştır. BrdUrd eriyiği bidistile su içerisinde hazırlanmış, daha sonra 0.2 µm por çapındaki membran filtre (Sartorius marka) ile steril edilmiştir. Bu eriyikten 50 µl alınarak kültür tüplerine ilave edildiğinde kültür, son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde BrdUrd içermiştir.

<b>Kimyasal adı</b>	: 5'-Bromo-2'-deoxyuridine
<b>Kapalı formülü</b>	: C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> BrN <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
<b>Molekül ağırlığı</b>	: 307.10 g/mol
<b>Erime noktası</b>	: 191-194°C
<b>CAS No</b>	: 59-14-3
<b>Sigma No</b>	: B 5002



**5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd)**

### 3.1.2.2. Entellan (Merck)

Entellan, şeffaf, akıcı, kuruduktan sonra hava kabarcığı oluşturmayan, iyi kapanma sağlayan ve ksilenle temizlenebilen bir yapıştırıcı olup lam-lamel yapıştırmaya uygundur. Hazırlanan preparatları sürekli hale getirmek amacıyla kullanılmaktadır (Cat. No. 7961).

### 3.1.2.3. Fiksatif (Tespit Çözeltisi)

Fiksatifler; doku ve hücresel elemanları denatüre hale getirip otolizi durdurur, dokuyu daha sonra uygulanacak işlemlere uygun ve çevre etkenlere karşı dayanıklı hale getirir. Tüm amaçlar için uygun “en iyi” fiksatif yoktur. Amaca en uygun fiksatif veya fiksatifler ya da fiksatif kombinasyonları kullanılarak sonuca ulaşılmaya çalışılır. Çalışmamızda KKD ve KA’yı incelemek amacıyla yapılan preparasyonda hücrelerin tespitinde, 1 hacim glacial asetik asit’in 3 hacim metanol ile karıştırılması sonucu hazırlanmış alkol bazlı bir fiksatif kullanılmıştır.

Fiksatif kullanılmadan önce taze (iki saat önce) hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır. Her seferinde preparat yapım işleminden önce taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

#### 3.1.2.4. Giemsa (Merck)

Alman mikrobiyolog Gustav Giemsa tarafından ilk defa adlandırılan Giemsa solusyonu; malarya ve diğer parazitlerin histopatolojik tanısında ve sitogenetikte kullanılmaktadır (Giemsa, 1904). Giemsa DNA'daki fosfat grubu için spesifik olup DNA'nın adenin-timin yoğunluğu yüksek bölgelerine yoğun olarak bağlanır. Aynı zamanda kromozom bantlama (G-bantlama) uygulamalarında da kullanılmaktadır. Giemsa solüsyonu; metilen mavisi, eozin ve azure B'nin gliserol ve metanol içinde hazırlanmış bir karışımıdır.

Bizim çalışmamızda bu solüsyon Merck firmasından (Cat. No. 9204) temin edilmiştir. Sorensen tamponu içinde % 5'lik olarak hazırlanan boya eriyiği, filtre edilmiş ve kromozomları boyamak için kullanılmıştır.

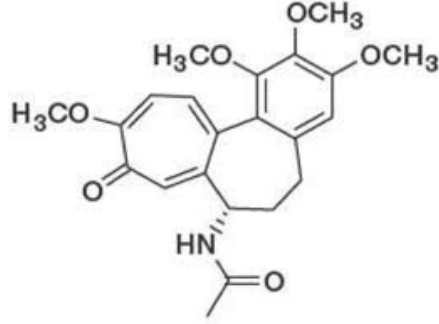
#### 3.1.2.5. Hipotonik Eriyik

% 0.4'lük KCI (Merck) hipotonik eriyik olarak kullanılmıştır. Eriyik bidistile su içerisinde stok halinde hazırlanıp, ağzı kapalı cam kap içerisinde buzdolabında (+4°C) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık bir saat önce yeterli miktarda hipotonik eriyik alınmış, inkübatör ile 37°C'ye kadar ısıtılarak kullanılmıştır. Bu çözeltinin yoğunluğu hücrenin plazmasından daha az olduğu için lenfositlerin su alarak şişmesini ve preparasyonun kaliteli olmasını sağlamaktadır.

#### 3.1.2.6. Kolkisin (Kolşisin) (Sigma)

Kolkisin saf kristal tuz halinde (Colchicine) (Sigma Cat. No. C9754), temin edilmiştir. Bu kimyasal *Colchicum autumnale* (Güz çiğdemi, acı çiğdem ) bitkisinden elde edilmiş bir alkaloid olup kromozom preparatlarının hazırlanmasında metafaz bloklayıcı mitotik bir zehir (iğ ipliği teşekkülünü engelleyici) olarak kullanılmaktadır. Kolkisin eriyiği saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom medyumunun her mililitresinde 0.06 µg olacak şekilde (0.06 µg/ml) 2.5 ml'lik

kromozom medyumuna ilave edilmiştir. Kolkisin'e ait ayrıntılı teknik özellikler aşağıda verilmiştir.



Kolşisinin yapısal formülü

**Ticari adı:** Kolşisin (Kolkisin)

**Kimyasal adı:** (S)-N-(5,6,7,9- tetrahydro-1,2,3,10-tetramethoxy-9-oxobenzol[ $\alpha$ ]heptalen-7-yl) acetamide

**Kapalı formülü:** C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>6</sub>

**Molekül ağırlığı:** 399.4

**Etil asetat içeriği:** %3.4

**Kloroform içeriği:** < %0.1

**Sigma No:** C-9754

### 3.1.2.7. Kromozom (Karyotip) Medyumunu

Bu çalışmada Gibco firmasının ürettiği PB Max. Kromozom medyumunu (cat. no. 12552-013) hücre kültürü için kullanılmıştır. PB Max medyumunu tam medyumdur. Fakat heparin içermemektedir.

Medyum formülasyonu aşağıdaki gibidir;

Gentamicin, 150 ml/L FBS ve 15 ml/L Phytohemagglutinin M içermektedir



Çizelge 3.1. Kromozom Medyum İçeriği

<b>Bileşenler</b>	<b>Moleküler Ağırlık</b>	<b>Konsantrasyon (mg/L)</b>	<b>mM</b>
<b>Amino Asitler</b>			
Glycine	75	10	0.133
L-Arginine	174	200	1.15
L-Asparagine	132	50	0.379
L-Aspartic acid	133	20	0.15
L-Cystine 2HCl	313	65	0.208
L-Glutamic Acid	147	20	0.136
L-Glutamine	146	300	2.05
L-Histidine	155	15	0.0968
L-Hydroxyproline	131	20	0.153
L-Isoleucine	131	50	0.382
L-Leucine	131	50	0.382
L-Lysine hydrochloride	183	40	0.219
L-Methionine	149	15	0.101
L-Phenylalanine	165	15	0.0909
L-Proline	115	20	0.174
L-Serine	105	30	0.286
L-Threonine	119	20	0.168
L-Tryptophan	204	5	0.0245
L-Tyrosine	261	29	0.111
disodium salt dihydrate			
L-Valine	117	20	0.171
<b>Vitaminler</b>			
Biotin	244	0.2	0.00082
Choline chloride	140	3	0.0214
D-Calcium pant.	477	0.25	0.000524
Folic Acid	441	1	0.00227
Niacinamide	122	1	0.0082
P-Aminobenzoic Acid	137	1	0.0073
Pyridoxine hydrochl.	206	1	0.00485
Riboflavin	376	0.2	0.000532
Thiamine hydrochl.	337	1	0.00297
Vitamin B12	1355	0.005	0.0000037
i-Inositol	180	35	0.194
<b>İnorganik Tuzlar</b>			
Calcium nitrate (Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O)	236	100	0.424
Magnesium Sulfate (MgSO <sub>4</sub> ) (anhyd.)	120	48.84	0.407
Potassium Chloride (KCl)	75	400	5.33
Sodium Bicarbonate (NaHCO <sub>3</sub> )	84	2000	23.81
Sodium Chloride (NaCl)	58	6000	103.45
Sodium Phosphate dibasic (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) anhydrous	142	800	5.63
<b>Diğer Bileşenler</b>			
D-Glucose (Dextrose)	180	2000	11.11
FBS		0	∞
Gentimicin Sulfate		35	∞
Glutathione (reduced)	307	1	0.00326
Phenol Red	376.4	5	0.0133

Bu medyum (-5 ila -20 °C'de muhafaza edilir) kültür yapımından önce çözülerek steril bir ortamda her bir tüpe 2.5 ml olacak şekilde paylaştırılmış ve deneylerde bu ölçülerde kullanılmıştır.

### 3.1.2.8. Mitomycin C (MMC)

Mitomisin'lerin *Streptomyces caespitosus* kültür filtratı içinde bulunduğu, 1955'te Kitasato Araştırma Laboratuvarında, Hata ve arkadaşları tarafından keşfedilen bir antineoplastik ilaçlar serisidir. Bu antibiyotikler arasında farklılık gösteren Mitomisin C 1956 yılında diğerlerinden ayrılarak saflaştırılmıştır.

Mitomycin C Kyowa geniş antikanser spektrumu ve güçlü antitümöral etkinliği bulunan Mitomisin C'nin enjeksiyonluk kullanım için hazırlanmış preparatıdır. Bu ajanın gastrointestinal kanserler, akciğer kanseri, uterus kanseri, baş-boyun kanserleri, mesane kanseri ve kronik lösemilere karşı etkili olduğu bilinmektedir.

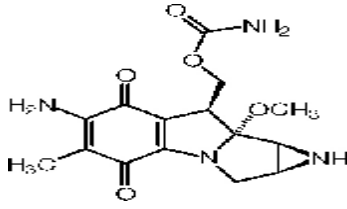
Mitomisin C'nin, tümör hücrelerinde DNA'ya bağlanarak ve DNA çift sarmalının iki ipliği arasında çapraz bağlar oluşturmak suretiyle DNA replikasyonunu önleyerek antitümöral etki gösterdiği sanılmaktadır. Mitomisin C'ye duyarlılığın DNA'nın geç G1 fazında DNA sentezinin erken S fazı boyunca yüksek olduğu ispatlanmıştır (<http://www.ilacabak.com/prosp.php?Id=4814>).

Mitomycin C (Sigma), bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Stok Mitomycin C steril saf suda çözülerek elde edilmiş olup, kültürde son hacmi 0.25 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir.

**Kimyasal adı:** 6-Amino-1,1a,2,8,8a,8b-hexahydro-8-(hydroxymethyl)-8a-methoxy-5-methyl-azirino[2',3':3,4] pyrrolo[1,2-a]indole-4,7-dione carbamate (ester)

**Kapalı formülü:** C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>

**Açık formülü:**



**Molekül ağırlığı:** 334.33 g/mol

**Erime noktası:** >360°C

**CAS No:** 50-07-7

### 3.1.2.9. Nitrik Asit (HNO<sub>3</sub>)

Nitrik asit, bileşiminde üç oksijen, bir hidrojen ve bir azot bulunan kuvvetli bir asittir. HNO<sub>3</sub> formülüyle gösterilir. Konsantrasyonu arttıkça daha tehlikeli olur. Sitogenetik çalışmalarında lamları temizlemek amacıyla 1 N çözelti olarak hazırlanmaktadır. Laboratuvarda kapalı plastik bir kapta saklanarak her defasında tekrar tekrar kullanılmıştır.

### 3.1.2.10. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer)

Ortamın pH dengesini ayarlamak için kullanılan bu tampon KKD'ni incelemek amacıyla preparat yapımı sırasında preparatlar tampon karışımı içerisinde UV lambası ile ışınlandırılmıştır. Ayrıca bu tampon %5'lik Giemsa boyası hazırlanmasında da kullanılmıştır.

Bu tampon eriyik tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış olup bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanılmıştır.

#### **Hazırlanışı:**

Tampon A:11.34 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 250 ml saf su içinde eritilmiştir (pH=4.8).

Tampon B:14.83 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O 250 ml saf su içinde eritilmiştir (pH=9.3).

### 3.1.2.11. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği

11.05 gr tri sodyum sitrat ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ) tartılarak bir miktar saf su içerisinde eritilmiştir. Daha sonra 21.9 gr NaCl tartılarak yine saf su içerisinde ancak ayrı bir kapta eritilmiştir. İki eriyik, bir şişeye dökülerek iyice karıştırılmış ve üzerine 500 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir. Hazırlanan bu stok eriyik  $5 \times SSC$ 'dir ve bu eriyik buzdolabında saklanmıştır. KKD'yi incelemek için deney yapılırken bu stoktan 20 ml alınarak üzeri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanmış ve elde edilen  $1 \times SSC$  eriyiği kullanılmıştır.

### 3.1.3. Kullanılan Deney Ekipmanları

#### 3.1.3.1. Flow Kabin (Steril Kabin)

Hücre kültürü tüplerine kromozom medyumu konulması, kan ekiminin yapılması, test eriyikleri hazırlanması ve kültür tüplerine ilave edilmesi sırasında steril bir ortam olarak, % 99.9 partikül tutma özellikli filtreye sahip, 1500 m<sup>3</sup>/h emiş kapasiteli, UV ve floresan ampülü olan ve çalışma alanı şeffaf cam paravanla sınırlandırılmış LABORMED marka flow kabin kullanılmıştır.

#### 3.1.3.2. Hassas Terazı

Hava akımlarına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0.0001 gr hassasiyetindeki GEC AVERY marka terazı katı kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

#### 3.1.3.3. Heparinli Deney Tüpleri

.Ü. Balcalı Hastanesi Merkez Biyokimya laboratuvarında adet dögüsü hormon konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla yönelik olarak periferik kanın bir kısmının özel tüplere alımının ardından kanın kalan kısmı heparinli tüplere

(Vacutainer® LH 170 I.U. Ref. 367526) alınarak genetik laboratuvarına getirilmiştir. Donoöler için toplam 24 adet heparinli tüp kullanılmıştır.

#### **3.1.3.4. Hormon Testi için Kullanılan Ekipman ve Yöntem**

Endojen eşey hormonları (FSH, LH, Estradiol (E2), Progesteron ), Ç.Ü. Balcalı Hastanesi Merkez Labaratuvarında, Roche Modüler marka E170 model cihazda, elektrokemilimünesan yöntemi ile çalışılmıştır.

#### **3.1.3.5. İnkübatör**

Hücre kültürünün yapılmasında ve bazı eriyiklerin 37 °C'ye kadar ısıtılıp muhafazasında Incucell marka 0°C -100°C ayarlanabilir inkübatör kullanılmıştır.

#### **3.1.3.6. Mikroskop**

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan OLYMPUS (CX21) marka binoküler ışık mikroskobu preparat incelemeleri sırasında kullanılmıştır. Fotoğraflar ise yine aynı marka mikroskopta dijital olarak çekilmiştir.

#### **3.1.3.7. Santrifüj**

Çalışmada kanın şekilli elemanlarını çöktürebilmek için rotor çapı 21 cm olan ve 4000 rpm'e kadar yükselebilen devir hızı, 99 dk.'lık zaman ayarlayıcı, açılabilir başlığa sahip ve 28 tüp kapasiteli HETTICH UNIVERSAL marka santrifüj kullanılmıştır.

### 3.1.3.8. Su Banyosu

Hücre kültürü preparatları hazırlandıktan sonra, kardeş kromatidlerin farklı boyanmasında kullanılan SSC eriyiğinin 58-60°C'de sabit kalmasını sağlamak amacıyla BM 302 NÜVE marka 0-60°C ayarlanabilir su banyosu kullanılmıştır.

### 3.2. Lamların Temizlenmesi

Kültür süresinin bitiminden iki gün önce etiketli olan lamlar şaleye dizilerek üzerlerini iyice örtecek şekilde 1 N nitrik asit konmuştur. Şalenin ağzı kapatılarak bu şekilde 24 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde lamlar yarım saat akan çeşme suyunda iyice yıkanmıştır. Lamlar 3-4 defa saf sudan geçirildikten sonra şale saf su ile doldurularak buzdolabında (+4 °C) saklanmıştır.

### 3.3. Sterilizasyon

#### 3.3.1. BrdUrd Eriyiğinin Sterilizasyonu

BrdUrd eriyiği steril bir erlen içinde bulunan ve steril olan saf su içinde 5'-bromo-2'-deoxyuridine maddesinin eritilmesiyle hazırlanmıştır. Bu eriyik steril şartlarda por çapı 0.2 µm olan bakteri filtresinden (Sartorius, membran filtre) geçirilerek steril edilmiştir. Sonra vida kapaklı steril cam kültür tüplerine konulan bu eriyik, etrafı alüminyum folyo ile kapatılarak buzdolabında (+4 °C) saklanmıştır.

#### 3.3.2. Saf Suyun Sterilizasyonu

Bazı stok çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan steril suyun hazırlanması için temiz bir vida kapaklı 100 ml'lik kültür şişesine saf su doldurularak şişenin ağzı pamukla iyice kapatılmıştır. Sterilizasyon esnasında otoklavdaki buhardan pamuğun ıslanmaması için üzeri alüminyum folyo ile örtülmüştür. Şişedeki saf su otoklavda 1.2 atm buhar basıncında ve 121°C'de 20 dk. steril edilmiştir.

### **3.4. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) (Sister Chromatid Exchange= SCE) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) (Chromosome Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İnceleme**

İnsanlarda genotoksik etkiye sahip olabilecek mutajenlerin ve kanserojenlerin genotoksik etkilerinin saptanması başta KKD, KA ve MN testleri yardımıyla olabilmektedir. Bu tür çalışmalar planlanırken, uygulanırken ve yorumlanırken uluslararası yönergelerle uygun hareket edilmesi zorunluluğu bulunmaktadır. Bu yönergedeki esaslar göz önünde bulundurularak adet döngüsünün belirli evrelerinde alınıp in vitro şartlarda kültüre edilen insan periferik lenfositlerinde mutajen tarafından indüklenen KKD frekanslarının, o dönemde mevcut endojen eşey hormonları tarafından büyük ölçüde değiştirildiği Cocchi ve ark (2005), tarafından yayımlanan çalışma referans alınmıştır.

#### **3.4.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması**

##### **3.4.1.1. KKD ve KA Yöntemi**

Bu çalışmada KKD ve KA'ni saptamak amacıyla hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanması Evans (1984), Perry ve Thompson (1984)'un metotlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada sigara içmeyen ve sigara içen olmak üzere toplam sekiz adet (4 sigara içmeyen ve 4 sigara içen) yaşları birbirine yakın (23-28) üreme çağında sağlıklı, düzenli adet döngüsüne sahip, doğum kontrol hapı kullanmayan, alkol bağımlılığı olmayan, herhangi bir enfeksiyonu ve kronik bir hastalığı olmayan gönüllü kadınlardan oluşan gruplar oluşturulmuştur. Bu gruplardan, döngünün foliküler, ovulasyon ve luteal fazlarında alınan periferik kanlarının bir kısmından, Ç.Ü. Merkez Biyokimya Laboratuvarında hormon (E<sub>2</sub>, FSH, LH ve progesteron) konsantrasyonları tespit ettirilmiştir. Paralel olarak bu kanların 0,2 ml'si (6 damla)

steril şartlarda 2.5 ml kromozom medyumuna (PB Max. (Gibco) cat. No. 12552-013) ekilmiştir.

Kanın ilavesinden hemen sonra 10 µg/ml steril 5-bromo-2-deoksiuridin ilave edilip kültür 37 °C'deki inkübatörde 72 saat inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol test maddesi (Mitomycin C, 0,25 µg/ml olarak) ayrı tüplerdeki besi yerlerinin bir grubuna kültürün başlangıcından 24 saat sonra, öteki grubuna ise 48 saat sonra ilave edilmiştir.

İnkübasyonun 70. saatinde her kültür tüpüne 0.06 µg/ml olacak şekilde mitozu keş vuruğu bir madde olan colchicine (kolkisin) eriyiğı ilave edilip, kültürler 2 saat daha inkübe edilmiştir. 72. saatte kültür tüpleri santrifüj edilerek (2000 devir/dk., 5 dk.), süpernatant (santrifüj sonunda dibe çöken hücrelerin üst kısmında kalan sıvı) bir pipet yardımıyla alınıp atılmış ve tüpün dip kısmında 0.5-0.7 ml hücreleri içeren sıvı bırakılmıştır. Sonra bu hücreler pipetaj yapılarak dağıtılmış ve önceden 37°C'ye ısıtılmış hipotonik eriyik (%0,4 KCl) hücre süspansiyonuna ilave edilmiştir.

Hazırlanan hücre süspansiyonu hipotonik eriyikte 37°C'deki inkübatörde 6 dakika muamele edilmiştir. Hipotonik eriyik ile muameleden sonra hücre kültürü santrifüj edilerek (1200 devir/dk., 10 dk.) süpernatant atılmıştır. Sonra hipotonik eriyik ilavesinde olduğu gibi yavaş ve karıştırılarak tüpe 10 ml soğuk fiksatif (1/3 = Glasiyal asetik asit/metanol) ilave edilmiş ve hücreler oda sıcaklığında 20 dakika fiksatif ile muamele ve devamında santrifüj edilmiştir (1200 devir/dk., 10 dk.). Bu şekilde fiksatif muamelesi üç kere tekrarlanmıştır. Son santrifüjden sonra tüpün dibinde 0,5–0,7 ml hücre içeren sıvı kalacak şekilde süpernatant alınarak atılmıştır. Tüpün dibinde toplanmış olan hücreler pastör pipeti ile karıştırılarak homojenize edilmiştir. Bu homojen sıvıdan pastör pipetine 4–5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekilerek özel olarak hazırlanmış olan düzeneğe tutturulmuştur. Bu şekilde pastör pipetinden daha önce kimyasal olarak temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanan lamın üzerine yaklaşık 60 cm yükseklikten farklı alanlara birer damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak preparatlar hazırlanmıştır. Hazırlanan preparatlar kurumak üzere kapalı bir alanda oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir.



### 3.4.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması

Bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını (Sister Chromatid Differentiation = SCD) sağlamak amacıyla Speit (1984), Speit ve Haupter'in (1985) geliştirdikleri metod modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla bir günlük preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri bir film tabakası Sorensen tamponu ile örtülecek şekilde kapatılmıştır. Işınlama eriyiği 5 ml Sorensen Tampon A, 5 ml Sorensen Tampon B alınıp bu karışımın su ile 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır (pH=6.8). Işınlama eriyiğinin az ya da fazla olmasının kardeş kromatidler arasındaki zıtlık farkını önemli derecede etkilediği görülmüştür.

Bu şekilde ince bir tabaka halinde ışınlama eriyiği ile örtülen preparatlar, karanlıkta 15 cm yükseklikten 30 W'lık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen tek ultraviyole lambası ile 30 dk. ışınlandırılmıştır. Işınlama bitiminde preparatlar 1×SSC eriyiği içerisinde 60°C (±2 °C)'de 60 dk. inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitmeden 15 dk. önce % 5'lik Giemsa boya eriyiği hazırlanmıştır.

**% 5'lik Giemsa boyasının hazırlanması:** 4 ml tampon A, 4 ml tampon B ve 4 ml Giemsa karıştırılarak üzerine 80 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir (pH=6.72). Sonra bu boya dik bir şale içerisine filtre kâğıdı yardımıyla süzümüştür.

İnkübasyon süresinin sonunda preparatlar 1×SSC eriyiğinden alınarak doğrudan boya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 40 dk. boya içerisinde bekletilmiştir (kardeş kromatidler arasındaki en iyi zıtlık farkı bu sürenin sonunda elde edilmiştir). Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarılmış ve üç ayrı kaptaki saf sudan geçirilerek preparatların üzerindeki fazla boyanın akması sağlanmıştır. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette kurumaya bırakılmıştır.

Boyanmış preparatlar kuruduktan sonra üzerlerine entellan ile lamel kapatılarak daimi hale getirilmiştir.

KA preparatlarını boyamak için bir günlük preparatlar herhangi bir ön işlemten geçirilmeksizin Sorensan tamponunda hazırlanmış %5'lik Giemsa ile 10-12 dk. boyanır. Boyama sonu işlemler KKD ile aynıdır.

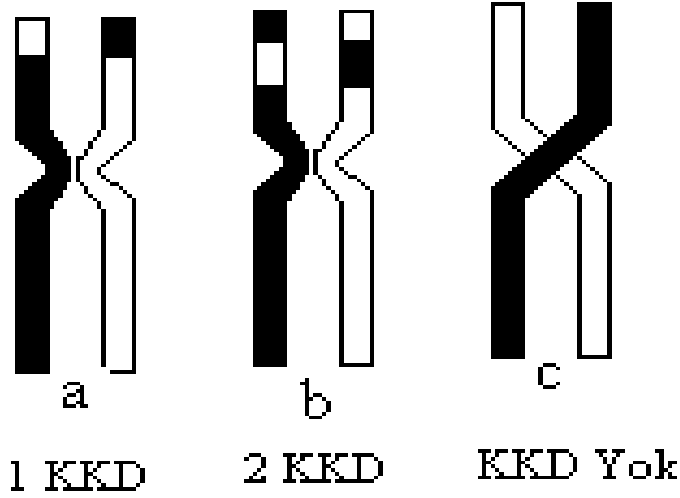
### 3.4.3. Daimi Preparatlarda Mikroskopik İnceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar OLYMPUS CX21 marka ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir ( $10 \times 100 = 1000$  büyütmede). Bu incelemeler sırasında kardeş kromatid değişimi sayısı (KKD) ve kromozomal anormallikler (KA) belirlenmiştir. Aynı preparatlarda birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı ve toplam hücre içerisinde mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı saptanmıştır. Bu incelemeler sonucunda da proliferasyon indeksi (PI) ve mitotik indeks (MI) saptanmıştır.

### 3.4.4. KKD Sayısının ve Proliferasyon İndeksinin (PI) (Replikasyon İndeksi=RI) Saptanması

#### 3.4.4.1. KKD Sayısının Saptanması

KKD sayısı, her kişinin kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 25 hücrede (sigara kullanmayan ve kullanan grupların her birinden toplam 100'er hücre) saptanmıştır. KKD sayısı bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla belirlenmiştir. Uçtan parça değişimi olmuş ise bu bir KKD olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.1.a). Ortadan bir parça değişimi olmuş ise bu da iki KKD olarak sayılmıştır (Şekil 3.1.b). Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekir. Bu durumda kromozomlarda KKD yoktur (Şekil 3.1.c).



Şekil 3.1. Kardeş Kromatid Değişiminin Olduğu ve Olmadığı Durumun Şematik Olarak Gösterilmesi (Topaktaş ve Speit, 1990)

#### 3.4.4.2. Proliferasyon İndeksi (PI) (Replikasyon İndeksi=RI)'nin Saptanması

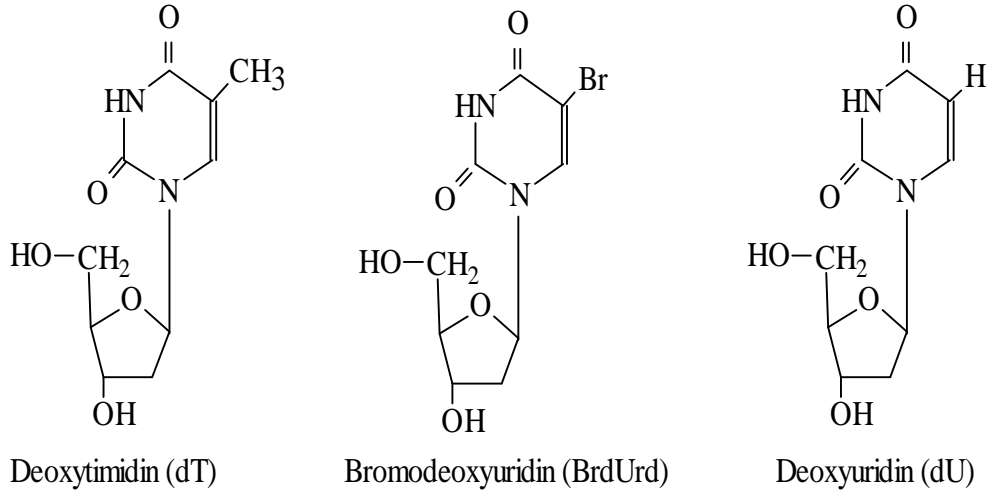
Mitomycin C'nin farklı adet döngülerinde DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla PI bulunmuştur. Her kişinin kan kültüründen yapılan preparatlardan tesadüfi seçilmiş 100 hücrenin incelenmesiyle PI belirlenmiştir. Bu incelemeler sırasında gözlenen birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreler sayılmıştır. Bu verilerden yola çıkılarak her bir kişinin kan kültüründeki PI değeri şu şekilde hesaplanmıştır:

$$PI = \frac{1 \times (M1) + 2 \times (M2) + 3 \times (M3)}{100}$$

*M1*: Birinci mitozu geçiren hücrelerin sayısı  
*M2*: İkinci mitozu geçiren hücrelerin sayısı  
*M3*: Üçüncü mitozu geçiren hücrelerin sayısı

Birinci, ikinci ve üçüncü metafaz plakları şu şekilde ayırt edilmiştir (Topaktaş ve Speit, 1990):

BrdUrd, deoxytimidin (dT) ve deoxyuridin (dU) birbirlerinin analogu olan bileşiklerdir. BrdUrd, dT ve dU arasındaki tek fark taşıdıkları heterosiklik benzen halkasındaki beşinci C atomuna bağlanan grupların farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Beşinci C atomuna bağlanan grup dT’de CH<sub>3</sub>, BrdUrd’de Br ve dU’de H atomudur (Şekil 3.2).

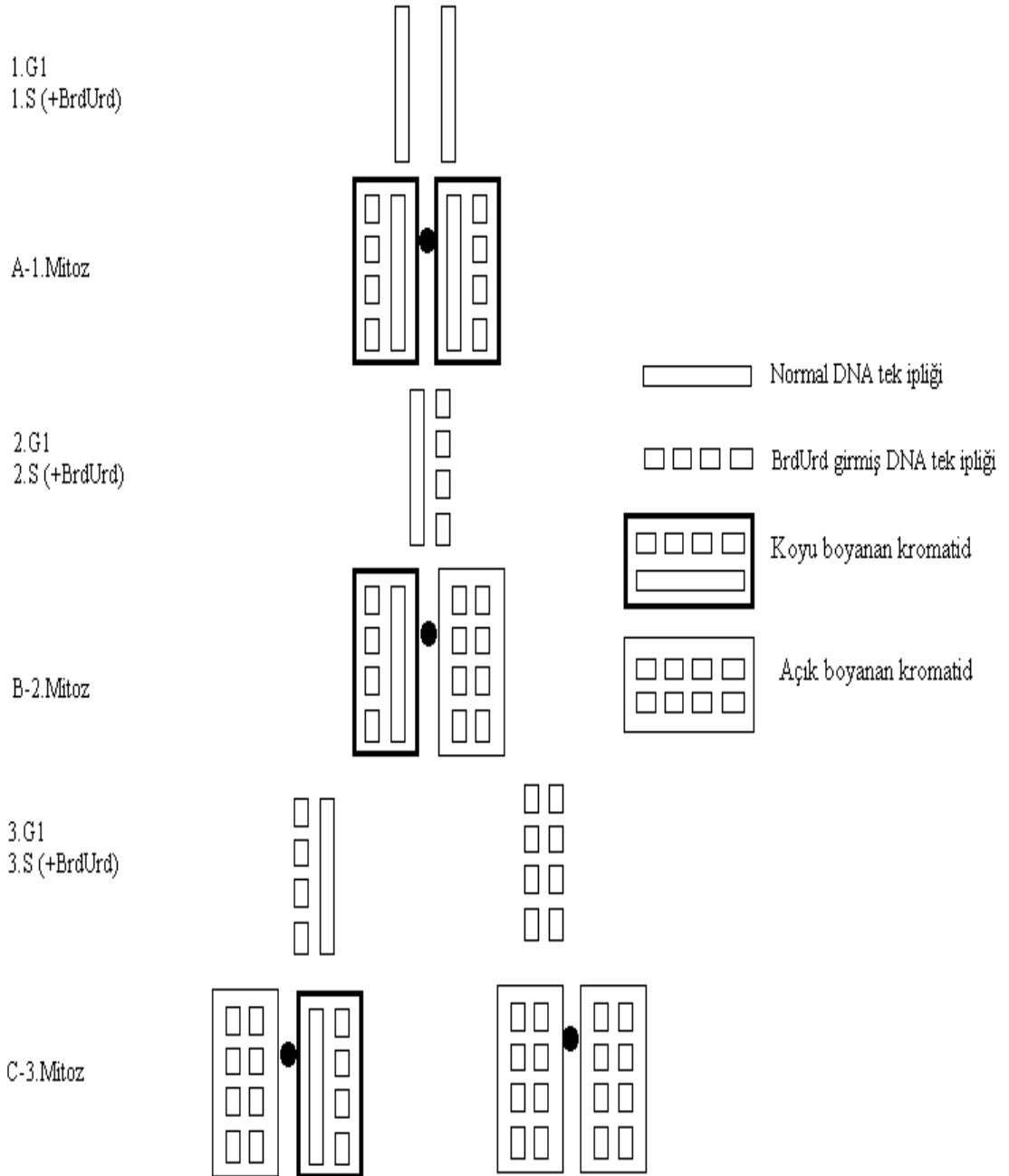


Şekil 3.2. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin(dU)’in kimyasal yapıları.

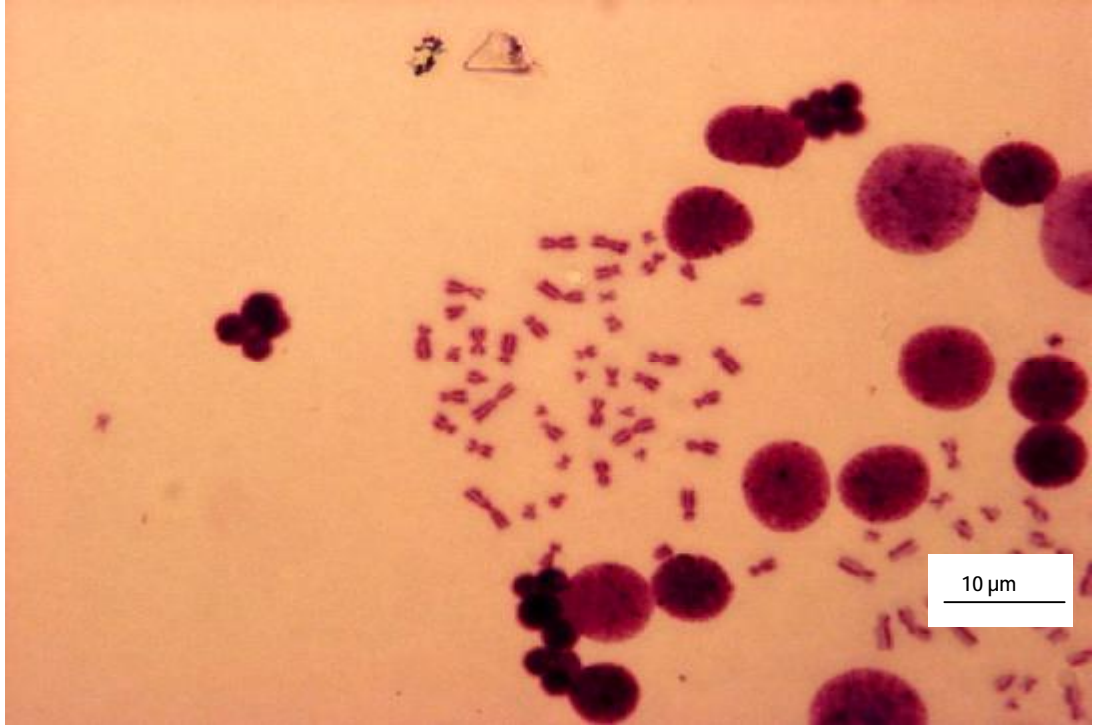
BrdUrd, DNA’nın yapısında bulunan timin bazlarının analogu olduğundan kültür ortamına BrdUrd eklendiğinde hücreler DNA’larını replike ettikleri esnada (birinci S fazında) yeni sentezlenen polinukleotid ipliği içine timinin yerine ortamda bulunan BrdUrd girecektir. Böyle hücrelerin kromozomları boyandığında bir kromozomun her iki kromatidi de (BrdUrd/dT // dT/BrdUrd) homojen koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.3 A ve Şekil 3.4). Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden meydana gelen yavru hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd’ li ortamda ikinci S fazı) timin içeren polinukleotid ipliğine komplementer olarak sentezlenen yeni DNA ipliğinde BrdUrd yer alacaktır.

Bu iki polinukleotid ipliği bir kromozomun koyu boyanan kromatidini (BrdUrd/dT) oluşturacaktır. BrdUrd içeren ipliğe komplementer olarak sentezlenen yeni ipliğe de BrdUrd girecektir ve bir kromatidi oluşturan her iki polinukleotid

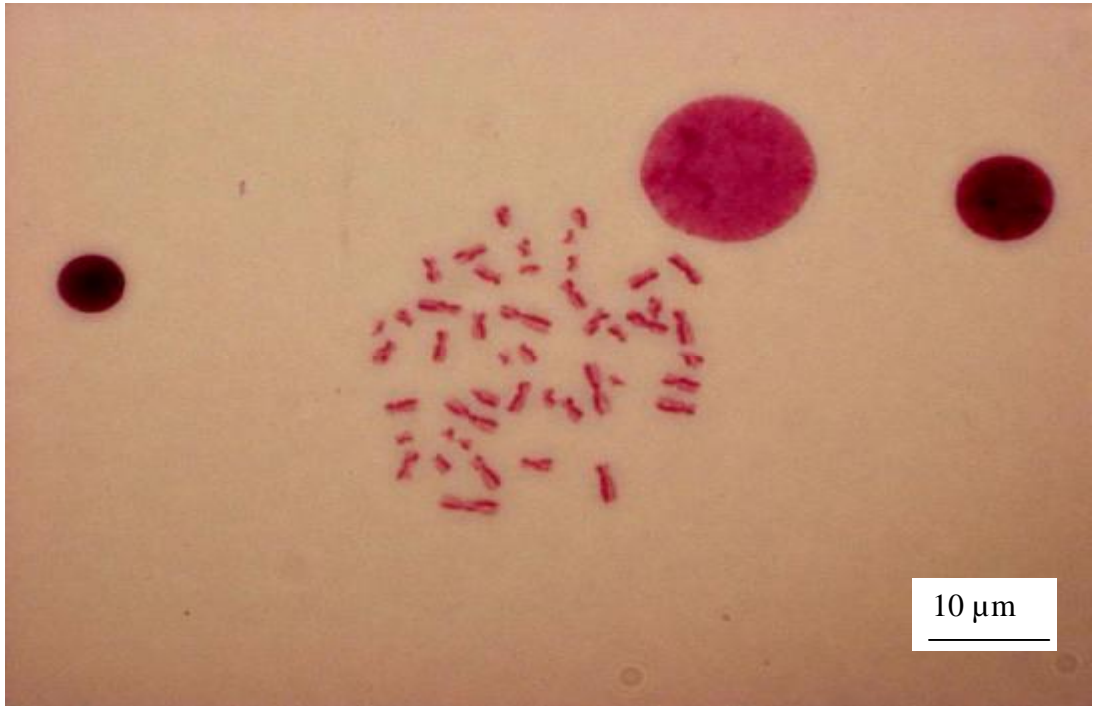
ipliği de BrdUrd içereceğinden (BrdUrd/BrdUrd) bu kromatid, aynı kromozomun açık boyanan kromatidini oluşturacaktır (BrdUrd/BrdUrd). İşte bu hücrenin metafaz devresinde kromozomlar boyandığında tüm kromozomların kromatidlerinden birisi koyu diğeri açık renkte boyanacaktır (BrdUrd/dT (koyu renkli) // BrdUrd/BrdUrd (açık renkli)). Bunlarda ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.3 B ve Şekil 3.5). Bu hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd'li ortamda üçüncü S fazı) ikinci mitozda açık boyanan kromatidden (BrdUrd/BrdUrd) tüm polinukleotid ipliklerine BrdUrd girmiş olan bir kromozom meydana gelecektir ve bu kromozomun her iki kromatidi de açık boyanacaktır (BrdUrd/BrdUrd // BrdUrd/BrdUrd). İkinci mitozda koyu boyanan kromatidden ise (dT/BrdUrd), bir kromatidin her iki ipliği BrdUrd'li ve diğeri kromatidinin bir ipliği timinli diğeri ipliği BrdUrd'li olan bir kromozom (BrdUrd/BrdUrd // dT/BrdUrd) oluşacaktır. Bu kromozom da boyandığında bir kromatidi koyu renkte, diğeri kromatidi açık renkte olacaktır. İşte böyle hücrenin metafaz devresinde preparat yapıldığında bazı kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık diğeri kromatidi koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler de üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.3 C ve Şekil 3.6). İşte bu şekilde birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreler ayırt edilmiş, 100 hücre içinde bu hücrelerin sayısı saptanmış ve elde edilen veriler kullanılarak yukarıdaki formüle göre PI hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. BrdUrd'nin DNA Yapısına Girmesi ile Birinci, İkinci ve Üçüncü Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Ayırt Edilmesinin Şematik Olarak Açıklanması (During, 1985'e göre Topaktaş ve Speit, 1990'dan).



Şekil 3.4. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000)



Şekil 3.5. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).



Şekil 3.6. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları(X1000).

#### 3.4.4.3.Kromozom Anormallikleri (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

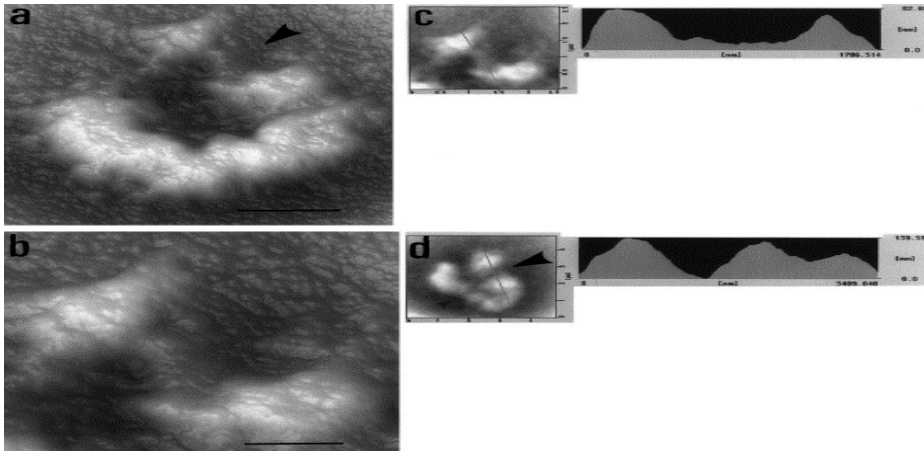
##### 3.4.4.3. (1).Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması

Her bir kişiden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış kromozomlara sahip toplam 100 metafaz (sekiz kişiden toplam 800 metafaz) KA'yı saptamak amacıyla incelenmiştir. Bu hücrelerdeki kromozomlarda gözlenen yapı ve sayı anormallikleri kaydedilmiştir.

KA'lı hücrelerin yüzdelerinin hesaplanmasında sadece yapısal kromozom aberasyonları göz önünde bulundurulmuştur. İncelenen bu 100 hücre içinde anormallik taşıyan hücrelerin yüzdesi ile toplam KA sayısı hesaplanmıştır. Toplam KA sayısı incelenen hücre sayısına bölünerek hücre başına düşen KA sayısı (KA/Hücre) saptanmıştır. Bu çalışmada gap'lar anormallik olarak değerlendirilmemiştir. Gap'lar ile kromatid ve kromozom tipi kırıkları arasındaki farklar şu şekilde ayırt edilmiştir (Preston, 1987'e göre; Kauderer ve ark. 1991'den):



Gap'larda, kromatidin birinde (kromatid tipi gap) veya kromatidin her ikisinde (kromozom tipi gap) görülen boyanmamış bölge bir kromatidin kalınlığından daha azdır. Kırıklarda bir kromatiddeki (kromatid tipi kırık) veya her iki kromatiddeki (kromozom tipi kırık) boyanmamış bölge bir kromatidin kalınlığından daha fazladır. İşte bu ölçülere göre gap ve kromatid kırıkları birbirinden ayırt edilmiştir. Mace ve ark (1978), ise gap bölgesinde DNA ipliğinde kırık olmadığını elektron mikroskobu fotoğraflarında göstermişlerdir.



Şekil 3.7. Atomik güç mikroskobu (AFM) ile elde edilmiş kromatid gap görüntüleri (Murakami ve ark. 2001).

Bu çalışmada kromatid kırığı ve tek kol birleşmesi gibi anormallikler kromatid tipi anormallik olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca kromozom kırığı, kardeş kromatid birleşmesi, kromatid değişimi, halka kromozom, fragment ve disentrik kromozom oluşumu gibi anormallikler de kromozom tipi anormallikler olarak değerlendirilmiştir.

#### 3.4.4.3.(2).Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

Mitomycin C'nin mitoz bölünme üzerine etkilerini belirlemek ve adet döngüsünün her bir fazında görülen dalgalanmaları belirlemek amacıyla (24 saat ve 48 saat Mitomycin C ile muamele edilmiş hücrelerde) MI'ler saptanmıştır. MI'yi belirlemek için her bir kişiye ait preparatlarda toplam 3000 hücre incelenmiş ve bunlar arasında mitoz bölünme geçiren hücrelerin sayısı kaydedilmiştir. 3000 hücre

içinde mitoz bölünme geçiren hücrelerin oranı yüzde cinsinden hesaplanarak MI saptanmıştır.

### **3.5.Mikroskopta Fotoğraf Çekme**

Fotoğraf çekme işlemi OLYMPUS marka trinoküler mikroskoba bağlı dijital fotoğraf makinasında 1000 büyütmede yapılmıştır (Olympus CX31RTSF, 7.1 Megapixel). 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin, sık rastlanan ve ilginç olan KA'ların fotoğrafları çekilmiştir.

### **3.6.İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi**

Mikroskobik inceleme sonucunda elde edilen KA, KKD, MI ve PI parametrelerine ait veriler için her bir grubun ortalamaları ile kontrol kültürlerinin ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığı t-testi ile kontrol edilmiştir.

Mikroskobik incelemeler sonucunda elde edilen bulgular çizelge halinde verilmiştir.



## 4.BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1.Bulgular

#### 4.1.1.Donörlerin Hormon Değerleri

Donörlere ait ve bu çalışmada seçilen hormon değerlerinde, daha önce de bilindiği üzere adet döngüsü süreçlerine bağlı olarak bariz dalgalanmaların olduğu ortaya çıkmıştır. Hormonlar için farklı tanı laboratuvarları farklı referans aralıkları kullandığı için birkaç istisna hariç genel olarak bu çalışmada deneklerin tümünde saptanan değerler referans aralık sınırları içerisinde kalmıştır (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1.Sigara kullanmayan (NS) ve Sigara kullanan (S) Donörlerden Farklı Zamanlarda Alınmış Periferik Kanlara Ait Hormon Değerleri Ortalamaları.

<b>Sigara Kullanmayan (NS)</b>	E2 (pg/ml)	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	Prog. (ng/ml)
Foliküler Evre	38.00±2.76	5.93±0.48	7.47±1.20	0.73±0.22
Ovulasyon Evre	208.93±105	8.01±3.23	30.70±18.20	1.32±0.49
Luteal Evre	113.14±11.5	2.69±0.47	6.20±3.29	4.97±1.00

<b>Sigara Kullanan (S)</b>	E2 (pg/ml)	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	Prog. (ng/ml)
Foliküler Evre	48.46±8.55	5.58±0.64	5.56±0.48*	0.64±0.08
Ovulasyon Evre	71.94±43.10*	5.82±0.53*	16.72±3.73*	0.67±0.09**
Luteal Evre	161.30±37.20	6.20±1.46	25.04±13.3	2.72±2.04

\*: P<0.05

\*\* : P<0.01

Estradiol (E2) hormonunu incelediğimizde hem sigara kullanmayan (NS), hem de kullananlarda (S) periferik kandaki en düşük değer foliküler evrede ortaya çıktığı gözlenmektedir. Aynı hormonun ovulasyon evresindeki değeri ise S ve NS grupları arasında oldukça belirgin bir fark ortaya çıkmış olup yüksek standart hata

olarak görüldüğü gibi bireyler arasında da belirgin farklar gözlenmiştir. Ovulasyon evresinde E2 değeri, sebebi bilinmemekle beraber NS grubunda yüksek bir ortalamayla seyrederken S grubunda ise sigara alışkanlığı ile bağlantılı olabileceğini tahmin ettiğimiz belirgin olarak düşüğe uğramıştır. Luteal evrede ise hem NS grubunda hem de S grubunda yakın değerler bulunmuştur (Çizelge 4.1.).

Eldeki veriler, folikül uyarıcı hormon (FSH) bulgusu yönünden değerlendirilecek olursa; NS grubunda en düşük luteal evre en yüksek ovulasyon evresinde bulunmuş olup S grubunda ise değerler ilginç bir şekilde birbirlerine yakın bulunmuş olup en yüksek değerler; NS grubunun tam aksine luteal evrede saptanmıştır. Bu bulgular yönünden E2 ile benzerlikler göstermektedir. NS ve S grubuna ait FSH verilerine bakıldığında NS grubu bulguları heterojen bir dağılım gösterirken S grubu verileri homojen olarak dağılım göstermiştir. (Çizelge 4.1.).

Çizelge (4.1.) LH hormonu yönünde incelendiğinde NS ve S gruplarındaki en yüksek LH değeri, NS grubunda ovulasyon evresinde, S grubunda ise luteal evrede saptanmıştır. En düşük LH değerleri ise NS grubunda luteal evrede, S grubunda foliküler evrede saptanmıştır. En düşük LH değerlerinin görüldüğü evreler bakımından LH ile FSH birbirine benzemektedir (Çizelge 4.1.).

Bu çalışmada dikkate alınan son hormon olan progesteron değerlerinin incelenmesi sonucunda NS ve S grubunun her ikisinde de en düşük hormon konsantrasyonu foliküler evrede tespit edilmiştir. Her iki grupta ise luteal evre bu hormon konsantrasyonunun yükseldiği ortak safhadır. Ayrıca progesteron değeri sigara kullananlarda her üç evrede de belirgin düşüşler göstermiştir (Çizelge 4.1.).

Çalışmada saptanan hormon değerlerine fazlar çerçevesinde bakıldığında sigara kullanan bireylerin hormon değerlerinde birkaç istisna hariç genel bir düşüş gözlenmekte beraber bu düşüş, özellikle ovulasyon evresinde anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.1.).

#### 4.1.2. Aylık Adet Döngüsünün KKD Frekansı Üzerine Etkisi

DNA hasarı ve devamındaki onarım olgusunun gösterilmesinde indikatör olarak kullanılan KKD testi ile elde edilen bulgular irdelendiğinde sigara kullanmayan donörlerin kontrollerindeki en yüksek KKD frekansının foliküler evrede ortaya çıktığı ( $5.25\pm 0.40$ ) görülmektedir (Çizelge 4.2). En düşük değer ise son safha olan luteal fazda gözlenmiş olup burada saptanan KKD seviyesi ( $4.32\pm 0.26$ ), foliküler evredeki eşdeğerine göre istatistiksel olarak önemli seviyede düşük bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Yine bu grupta her üç fazda da 24 ve 48 saatlik mitomycin C (MMC) muamelesi KKD sıklığını kontrole göre bariz ve anlamlı bir şekilde artırmıştır. Döngü içindeki fazlar karşılaştırıldığında ovulasyon fazındaki 24 saatlik MMC uygulaması foliküler fazdaki eşdeğerine göre anlamlı seviyede düşük çıkmış ancak 48 saatlik MMC uygulamasında ise foliküler evredeki eşdeğerinden önemli oranda daha yüksek saptanmıştır. Bunlardan başka luteal fazdaki 48 saatlik MMC uygulamasında saptanan KKD frekansı ovulasyon fazındaki eşdeğerine göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Çizelge 4.2.).

Sigara kullanan gruptaki KKD frekansları ise; kontrol grupları üç fazda da birbirine çok yakın değerler olarak bulunmuş olup aralarında anlamlı olmayan küçük varyasyonlar mevcuttur. Bu grupta da ovulasyon fazının 24 saatlik MMC uygulaması hariç bütün MMC uygulamaları KKD frekansını kontrole göre önemli seviyede artırmışlardır. Ayrıca foliküler fazdaki 24 saatlik MMC uygulaması KKD frekansını, ovulasyon ve luteal fazdaki eşdeğerlerine göre anlamlı seviyede yükseltmiştir. Benzer şekilde luteal fazdaki 48 saatlik MMC uygulaması KKD sayısı ovulasyon evredeki muadilinde gözlenen KKD sayısından anlamlı seviyede düşük bulunmuştur (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. Sigara Kullanmayan ve Kullanmaların Adet Döngüsünün Çeşitli Aşamalarında Alınan Periferik Kanlardaki KKD Üzerine MMC'nin Etkisi

Aylık Periyot	Muamele			Sigara Kullanmayan			Sigara Kullanan		
	Çeşit	Kons.	Süre (Saat)	Min.-Max.	KKD/Hücre ±SH	PI±SH	Min.-Max.	KKD/Hücre ±SH	PI±SH
Fol. Faz	Kontrol	-	-	1-14	5.25±0.40	1.80±0.12	1-13	5.21±0.46	2.13±0.08 d <sub>1</sub>
"	MMC	+	24	1-20	10.26±1.07 a <sub>1</sub>	1.63±0.05 a <sub>1</sub>	3-28	12.29±1.40 a <sub>1</sub>	1.74±0.09 a <sub>1</sub>
"	MMC	+	48	5-39	17.06±2.06 a <sub>1</sub>	1.57±0.14	2-37	18.52±2.46 a <sub>1</sub>	1.67±0.09 a <sub>1</sub>
Ovu. Faz	Kontrol	-	-	1-15	4.88±0.26	1.84±0.09	1-19	5.41±0.51	1.86±0.07 b <sub>1</sub>
"	MMC	+	24	3-21	8.79±0.23 a <sub>3</sub> b <sub>2</sub>	1.70±0.03 a <sub>1</sub>	2-21	8.13±1.04 b <sub>1</sub>	1.60±0.14
"	MMC	+	48	5-41	21.68±3.44 a <sub>2</sub> d <sub>2</sub>	1.69±0.11	6-31	16.58±0.86 a <sub>3</sub>	1.47±0.07 a <sub>1</sub>
Lut. Faz	Kontrol	-	-	1-15	4.32±0.26 b <sub>1</sub>	1.77±0.13	1-14	4.95±0.40	1.90±0.10
"	MMC	+	24	2-17	8.33±0.83 a <sub>1</sub>	1.62±0.11	2-19	7.76±0.44 a <sub>2</sub> b <sub>1</sub>	1.67±0.14
"	MMC	+	48	3-35	13.06±2.25 a <sub>1</sub> c <sub>1</sub>	1.63±0.06	5-27	12.26±1.06 a <sub>2</sub> b <sub>2</sub> c <sub>1</sub>	1.65±0.02 a <sub>3</sub> c <sub>2</sub>

a: Kendi kontrolüne göre önem

b: Foliküler evredeki eşdeğerine göre önem

c: Ovulasyon evresindeki eşdeğerine göre önem

d: Sigara kullanma ve kullanmamaya göre önem

a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>c<sub>1</sub>d<sub>1</sub>: P<0.05

a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>c<sub>2</sub>d<sub>2</sub>: P<0.01

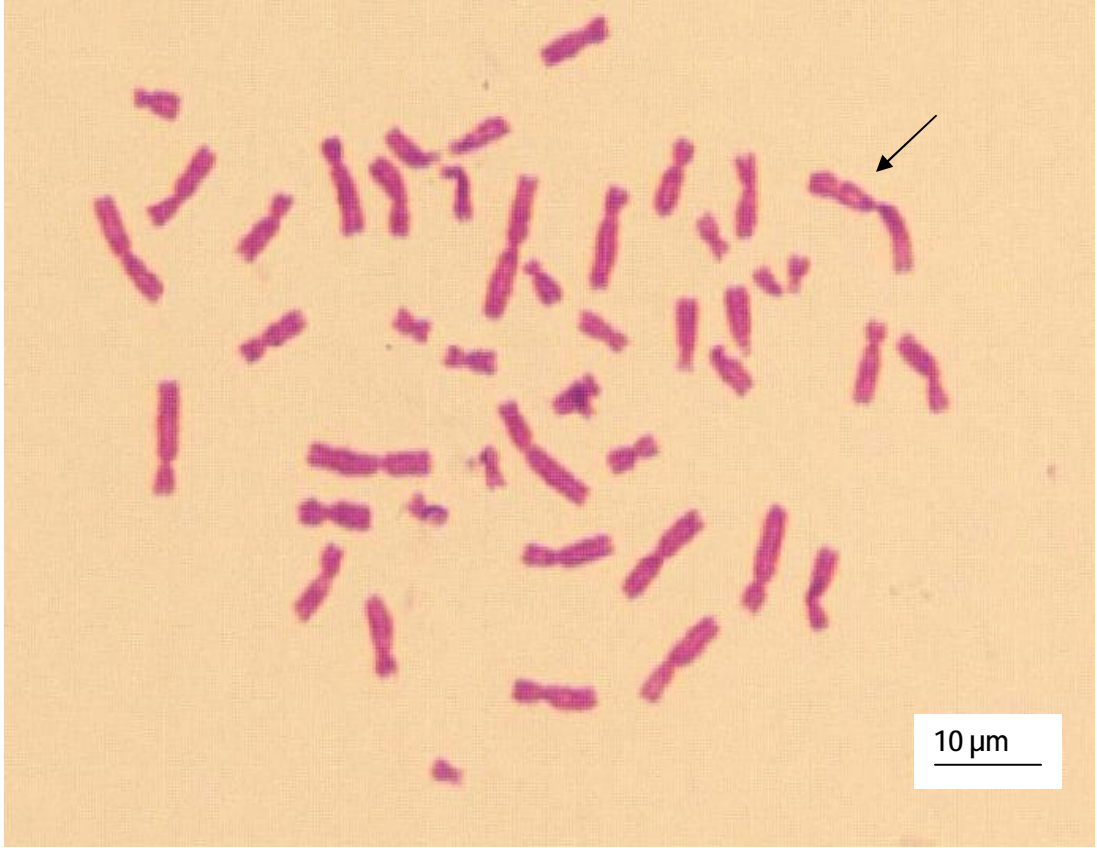
a<sub>3</sub>b<sub>3</sub>c<sub>3</sub>d<sub>3</sub>: P<0.001

Sigara kullanmayan ve kullananlarda kontrollerine bakıldığında sigara kullananların foliküler faz hariç diğer evrelerinde önemli olmayan düzeyde bir KKD frekansı artışı gözlenmiştir. Sigara kullanmayan ve sigara kullanan donörlerde ortaya çıkan genel KKD frekansları karşılaştırıldığında sadece sigara kullanmayanların ovulasyon fazındaki 48 saatlik MMC uygulaması ( $21.68\pm 3.44$ ) sigara kullanan eşdeğerine göre anlamlı seviyede daha yüksek ( $P<0.05$ ) bulunmuştur. Diğer değişkenler arasında sigara kullanımı yönünden anlamlı bir KKD frekans farkı ortaya çıkmamıştır (Çizelge 4.2.). Bu bilgilere ilaveten en düşük ve en yüksek KKD frekansı 1-41 aralığında çıkmış olup en yüksek frekans NS grubunda ovulasyon fazının 48 saat MMC uygulamasında saptanmıştır.

#### **4.1.3. Aylık Adet Döngüsünün Kromozom Anormalliği Oluşumu Üzerine Etkisi**

Aylık döngünün çeşitli evrelerine ait kromozom anormallikleri ve hücre başına düşen kromozom anormalliği tablosu (Çizelge 4.3.) incelendiğinde en fazla ortaya çıkan anormallik kromatid kırığı (B') olarak göze çarpmaktadır (Şekil 4.1., Şekil 4.2.). Fazla çıkan diğer bir anormallik çeşidi ise kromozom kırığı (B'') olup net şekilde fotoğraflanan bazı anormalliklere ait görseller metnin devamındadır (Şekil 4.3., Şekil 4.8.). Bu iki parametrenin yüksek çıkması olası klastojenik etkiyi akla getirmekle beraber aneujenitenin göstergelerinden birisi olan poliploidi sayısı ise görece az bulunmuştur.

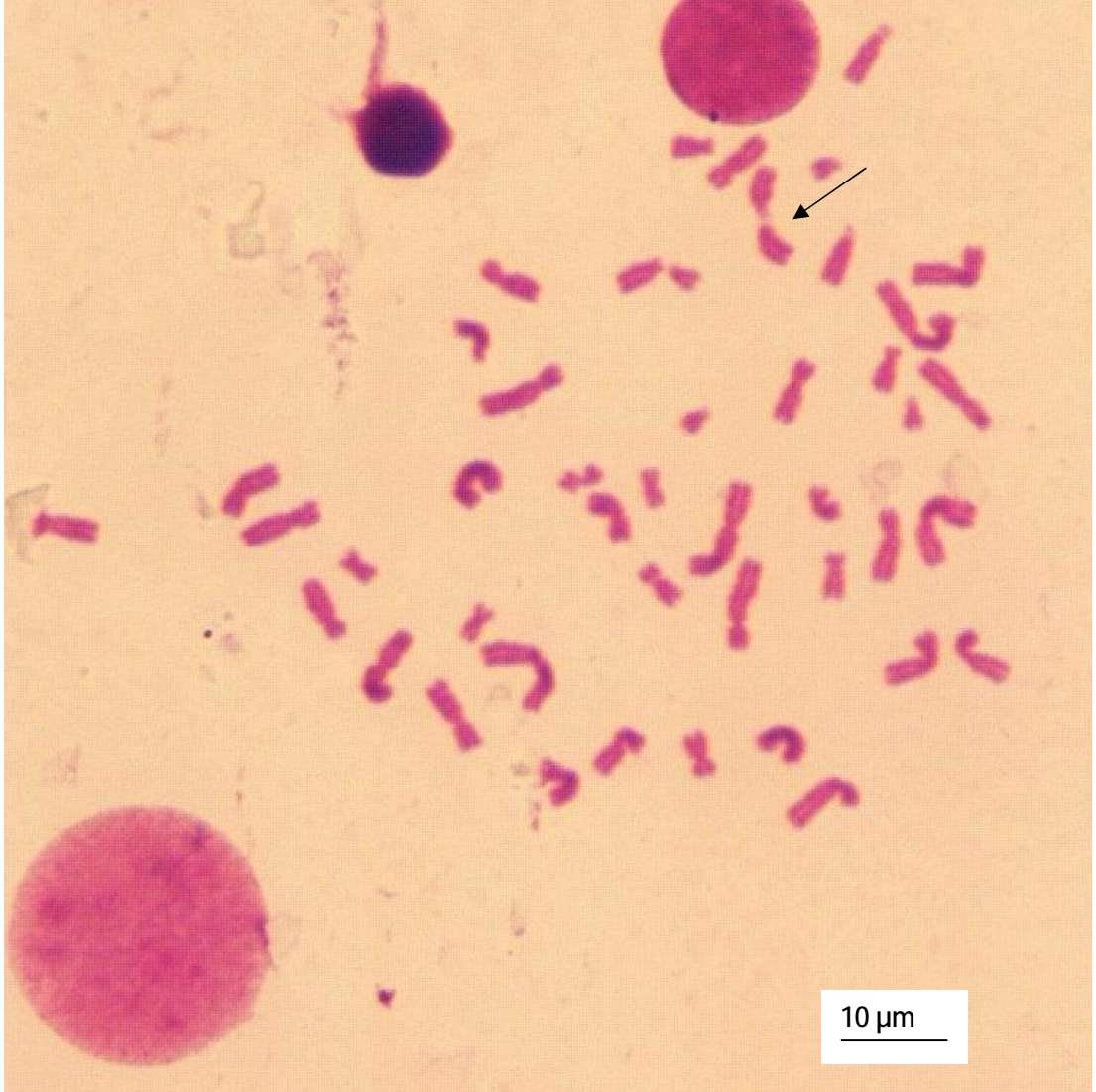




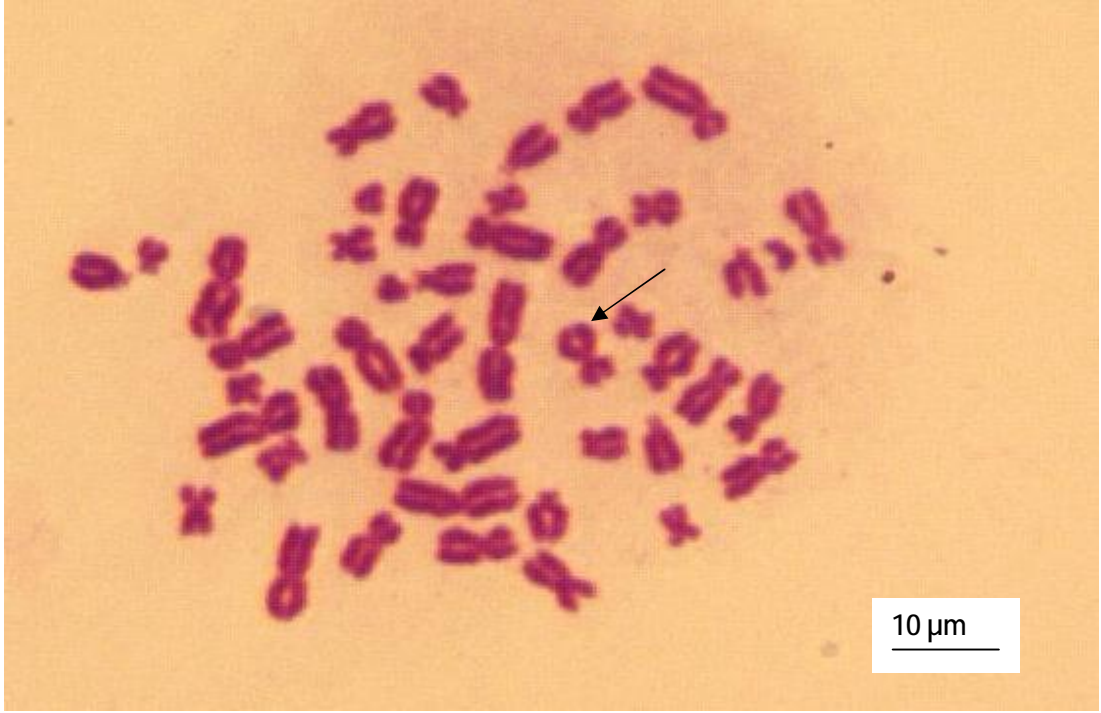
Şekil 4.1. Foliküler evrede alınan kan örneklerinde 48 saatlik MMC muamelesi sonucu ortaya çıkan kromatid kırığı (B')

Sigara kullanmayanlarda aylık döngünün üç fazındaki muamelesizlerin karşılaştırılması sonucunda en az sayıda kromozomal anormallik taşıyan hücre yüzdesi luteal evrede bulunmuş olup bu değer (3.75±0.47<sub>b2c1</sub>) önceki evrelerdeki eşdeğerlerinden anlamlı ölçüde (P<0.05) daha düşük olduğu saptanmıştır. Bu grupta en yüksek KA frekansı ise foliküler evrede (7.75±0.47) saptanmıştır. MMC bütün uygulamalarda kromozomal anormallikleri artırmış (p<0.05) ancak kontrole göre en fazla artış luteal fazda ve foliküler fazın 48 saatlik MMC uygulamasında (p<0.01) saptanmıştır. Çizelge 4.3'te görüldüğü gibi en yüksek anormal hücre yüzdesi foliküler fazda, en düşük oranlar ise luteal fazda bulunmuştur. Bulgular hücre başına düşen anormallik oranları (KA/hücre) bakımından irdelendiğinde ise genelde benzer sonuçlar göstermekle birlikte küçük varyasyonlar mevcuttur. Bu parametre açısından da yine foliküler evre en yüksek, luteal evre de en düşük KA/hücre frekansını ortaya çıkarmıştır. Sigara kullanmayan grup için sonuçlar özetlenecek olursa kromozom

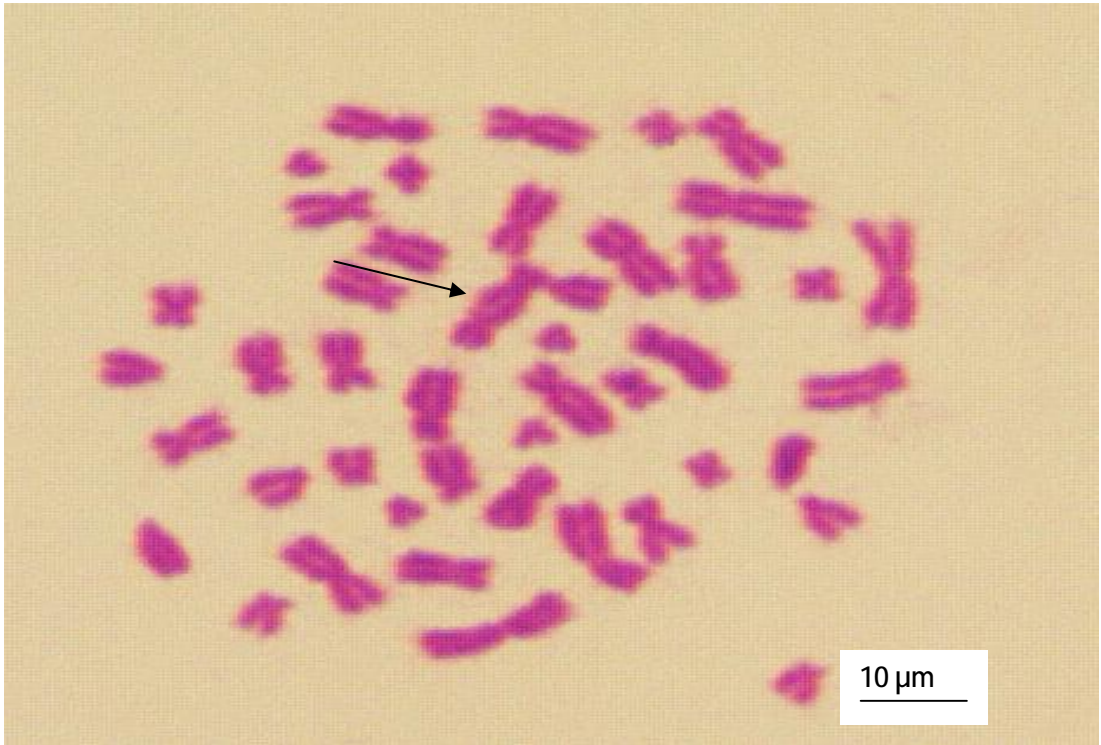
anormalliği yönünden en yüksek frekansları foliküler evre, en düşük frekansları ise luteal evre göstermektedir.



Şekil 4.2. Foliküler evrede alınan kan örneklerinde 24 saatlik MMC muamelesi sonucu ortaya çıkan kromozom kırığı (B'')

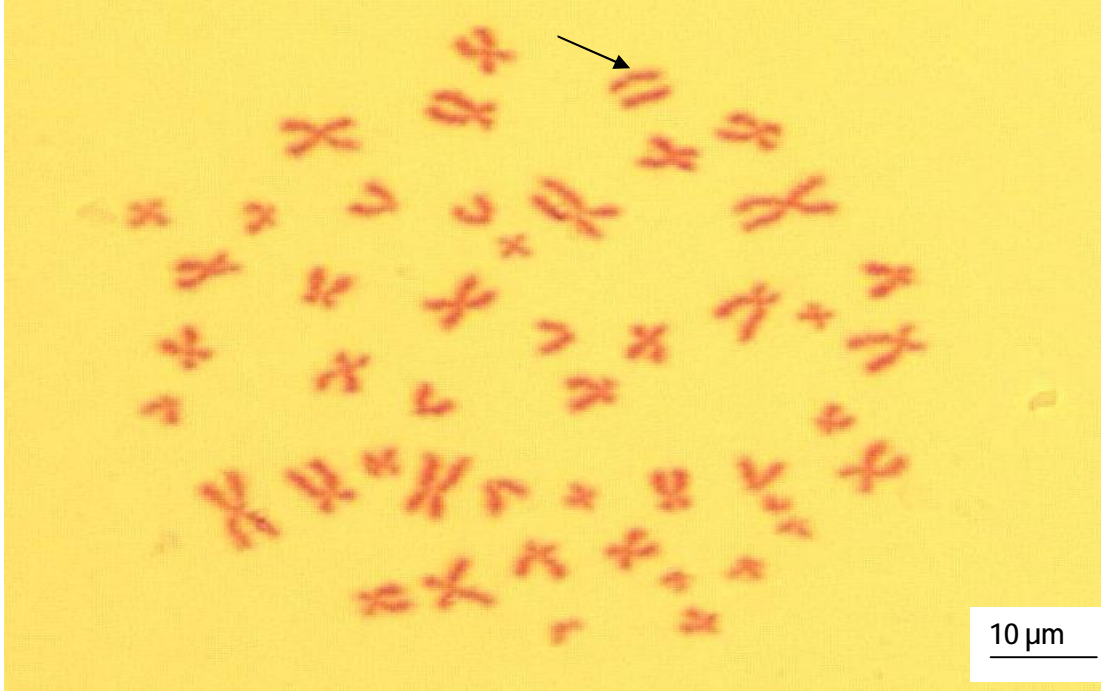


Şekil 4.3. Foliküler evrede alınan kan örneklerinde 24 saatlik MMC muamelesi sonucu ortaya çıkan kardeş kromatid birleşmesi (SU)



Şekil 4.4. Foliküler evrede alınan kan örneklerinde 24 saatlik MMC muamelesi sonucu ortaya çıkan disentrik kromozom (DS)

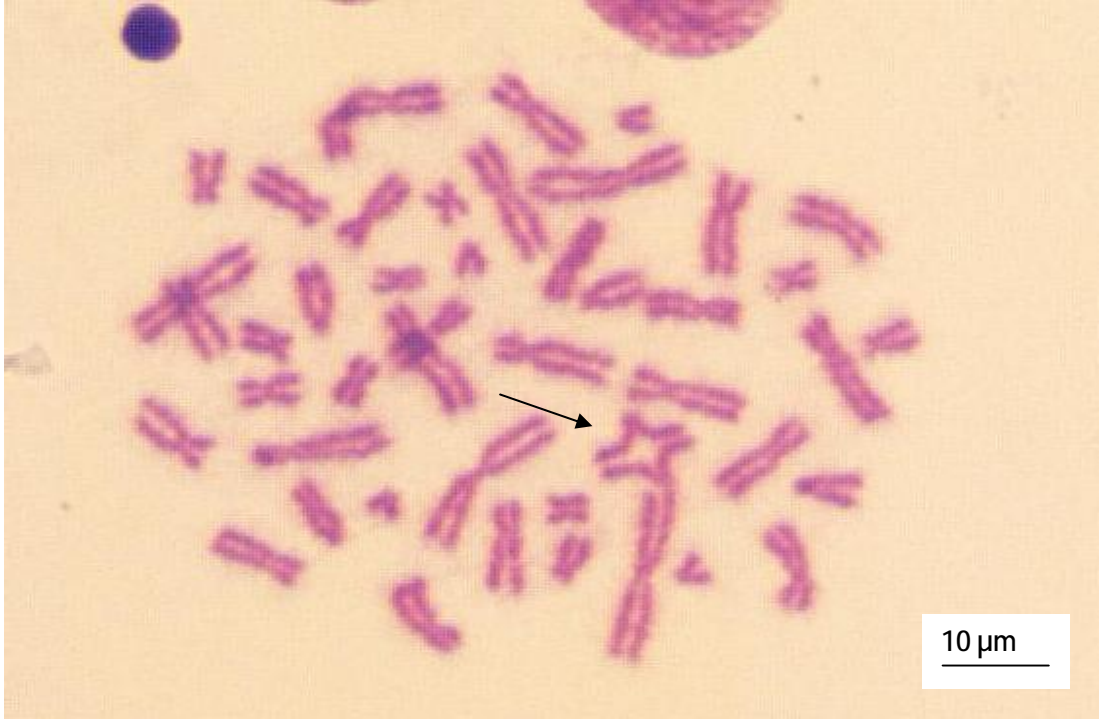




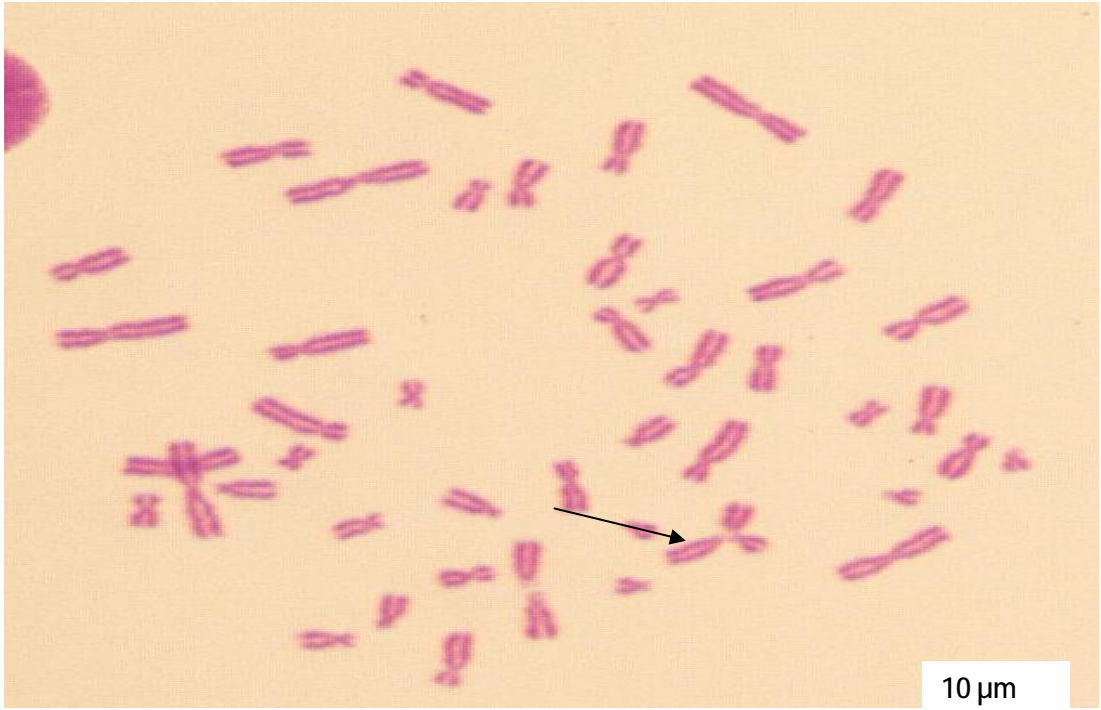
Şekil 4.5. Foliküler evrede alınan kan örneklerinde kontrol grubunda ortaya çıkan fragment (F)



Şekil 4.6. Luteal evrede alınan kan örneklerinde 48 saatlik MMC muamele  
ortaya çıkan kromatid değişimi (KD)



Şekil 4.7. Ovulasyon evresinde alınan kan örneklerinde 48 saatlik MMC muamelesi sonucu ortaya çıkan kromatid değişimi (KD)



Şekil 4.8. Luteal evrede alınan kan örneklerinde 24 saatlik MMC muamelesi sonucu ortaya çıkan kromatid değişimi (KD)

Çizelge 4.3. Sigara Kullanmayanların Adet Döngüsünün Çeşitli Aşamalarında Alınan Periferik Kanlardaki Kromozom Anormallik Çeşitleri. Anormal Hücre Yüzdesi ve KA/Hücre oranı

Aylık Periyot	Muamele		Sigara Kullanmayan										MI+SH						
	Çeşit	Süre (Saat)	Toplam Anormallikler																
			B'	B''	F	T	DS	K	D	KKB	P	Anormal Hücre Oranı (%) +SH		KA/Hücre+SH					
Fol. Faz	Kontrol		27	4	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0875±0.01	4.55±0.18
“	MMC	24	32	9	2	0	1	4	7	0	0	0	0	0	0	0	0.1375±0.02	4.32±0.14	
“	MMC	48	16	11	5	0	0	8	7	2	0	0	0	0	0	0	0.1225±0.01	4.27±0.04 a <sub>2</sub>	
Ovu. Fazı	Kontrol		20	2	1	0	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0.0650±0.01 b <sub>1</sub>	4.77±0.23	
“	MMC	24	26	7	0	0	0	4	5	2	0	0	0	0	0	0	0.1100±0.01	4.44±0.14	
“	MMC	48	27	7	5	0	0	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0.1225±0.01 a <sub>1</sub>	4.25±0.21	
Lut. Faz	Kontrol		13	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0.0375±0.01 b <sub>2</sub> c <sub>1</sub>	5.20±0.18 b <sub>1</sub>	
“	MMC	24	16	7	3	0	0	4	1	2	0	0	0	0	0	0	0.0825±0.01 a <sub>1</sub> b <sub>2</sub>	4.66±0.23	
“	MMC	48	21	4	1	0	1	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0.0775±0.01 a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>1</sub>	4.26±0.10 a <sub>2</sub>	

B': Kromatid kırığı, B'': Kromozom kırığı, F: Fragment, T: Translokasyon, DS: Disentrik kromozom, KD: Kromatid değişimi, KKB: Kardeş kromatid birleşmesi (Sister Union), P: Poliploidi.

a: Kendi kontrolüne göre önem

b: Foliküler evredeki eşdeğerine göre önem

c: Ovulasyon evresindeki eşdeğerine göre önem

d: Sigara kullanma ve kullanılmaya göre önem

a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>c<sub>1</sub>d<sub>1</sub>: P<0.05

a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>c<sub>2</sub>d<sub>2</sub>: P<0.01

a<sub>3</sub>b<sub>3</sub>c<sub>3</sub>d<sub>3</sub>: P<0.001

Çizelge 4.4. Sigara Kullananların Adet Döngüsünün Çeşitli Aşamalarında Alman Periferik Kanlardaki Kromozom Anormallik Çeşitleri. Anormal Hücre Yüzdesi ve KA/Hücre oranı

Aylık Periyot	Muamele		Sigara Kullanan												
	Çeşit	Süre (Saat)	Toplam Anormallikler												
			B'	B"	F	T	DS	KD	KKB	P	Anormal Hücre Oranı (%) +SH	KA/Hücre+SH	MI+SH		
Fol. Faz	Kontrol		24	2	3	0	1	0	1	0	0	1	6.50±0.64	0.0775±0.01	5.06±0.08 d <sub>2</sub>
"	MMC	24	37	4	2	0	0	4	1	0	1	9.75±0.62 a <sub>1</sub>	0.1200±0.01	4.69±0.07 a <sub>1</sub> d <sub>1</sub>	
"	MMC	48	47	8	5	0	0	5	2	0	0	13.25±1.03 a <sub>2</sub>	0.1675±0.01 a <sub>2</sub>	4.55±0.17 a <sub>1</sub>	
Ovu. Fazı	Kontrol		35	1	1	0	0	0	0	0	0	7.50±0.50 d <sub>1</sub>	0.0925±0.01 b <sub>2</sub> d <sub>2</sub>	4.76±0.06 b <sub>1</sub>	
"	MMC	24	26	9	2	0	0	1	1	0	0	8.50±0.86	0.09750±0.01	4.58±0.12	
"	MMC	48	63	12	1	0	0	4	0	0	0	17.50±1.04 a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> d <sub>2</sub>	0.2000±0.01 a <sub>1</sub> d <sub>1</sub>	4.37±0.19	
Lut. Faz	Kontrol		29	4	1	0	0	2	1	0	0	8.00±0.40 b <sub>1</sub> c <sub>1</sub> d <sub>2</sub>	0.9250±0.01 b <sub>2</sub> c <sub>1</sub> d <sub>2</sub>	4.58±0.16 b <sub>1</sub> d <sub>1</sub>	
"	MMC	24	36	7	0	0	0	1	0	0	0	8.75±1.03 b <sub>1</sub>	0.1100±0.01 a <sub>1</sub> b <sub>1</sub>	4.24±0.13 b <sub>1</sub> d <sub>1</sub>	
"	MMC	48	57	6	0	0	0	2	0	0	0	12.25±0.85 a <sub>1</sub> c <sub>2</sub> d <sub>1</sub>	0.1625±0.01 a <sub>2</sub> c <sub>1</sub> d <sub>2</sub>	4.15±0.07 a <sub>2</sub> b <sub>1</sub>	

B': Kromatid kırığı. B'': Kromozom kırığı. F: Fragment. T: Translokasyon. DS: Disentrik kromozom. KD: Kromatid değışimi. KKB: Kardeş kromatid birleşmesi (Sister Union). P: Poliploidi.

a: Kendi kontrolüne göre önem

b: Foliküller evresindeki eşdeğerine göre önem

c: Ovulasyon evresindeki eşdeğerine göre önem

d: Sigara kullanma ve kullanmamaya göre önem

a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>c<sub>1</sub>d<sub>1</sub>: P<0.05

a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>c<sub>2</sub>d<sub>2</sub>: P<0.01

a<sub>3</sub>b<sub>3</sub>c<sub>3</sub>d<sub>3</sub>: P<0.001

Sigara kullanan gruptaki kromozom anormallikleri muamelesiz kontroller incelendiğinde sigara kullanmayanların tam aksine en yüksek anormallik luteal evrede ( $8.00\pm 0.40$ ) en düşük KA ise foliküler evrede ( $6.50\pm 0.64$ ) belirlenmiştir. Bununla birlikte MMC muamelesinin sonucuna bakıldığında sadece foliküler evrede hem 24 hem de 48 saatlik muameleler KA frekanslarını önemli düzeyde ( $P<0.05$ ) artırmıştır. Kalan diğer iki evrede ise sadece 48 saatlik muamelelerin sonuçları anlamlı bulunmuştur. Bu sonuç muhtemelen muamelesiz kontrollerdeki yüksek KA frekansından kaynaklanmaktadır. Zaten bunun böyle olduğu sigara kullanmayan gruptaki muamelesiz kontrollerle yapılan karşılaştırma göstermektedir. Hem ovulasyon fazının hem de luteal fazın muamelesiz kontrollerinde KA frekansları NS grubundaki muadillerinden önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Sigara kullananlarda ortaya çıkan bu sonuçlar oldukça manidardır. İlginç bir şekilde sigara kullananlarda luteal fazın etkilenmiş olduğu, ayrıca bununla bağlantısı olabileceğini düşündüğümüz progesteron hormonunda belirgin düşüşler gözlenmiştir. Luteal fazın hem muamelesiz kontrolü hem de 24 saatlik MMC uygulaması foliküler evreye göre anlamlı ( $P<0.05$ ) KA artışları ortaya çıkarmıştır. KA frekansı yönünden en yüksek frekans ovulasyon fazı 48 saatlik MMC uygulaması göstermişken en düşük olanı ise foliküler fazın muamelesiz kontrolü göstermiştir (Çizelge 4.4.)

Hücre başına düşen anormallikler (KA/Hücre) açısından ise küçük varyasyonlar olmakla birlikte benzerlikler saptanmıştır. Bu parametre açısından da en yüksek frekans yine luteal evrede saptanmıştır (Çizelge 4.4.).

#### **4.1.4. Aylık Adet Döngüsünün DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerine Etkisi**

DNA replikasyonu etkinliğini gösteren bir parametre olarak proliferasyon (replikasyon) indeksi (PI) incelendiğinde, sigara kullanmayanlarda kontrolleri irdelendiğinde her üç fazda da hemen hemen benzer bir değer ölçülmüştür. Bununla birlikte ovulasyon fazındaki PI değeri önemli olmayan bir seviyede artış göstermiştir. Burada ilginç olan bir başka durum ise MMC uygulamasının iki uygulama (foliküler ve ovulasyon fazının 24 saatlik MMC) hariç DNA replikasyonunu istatistiki önemde



düşürmediği konusudur. En yüksek proliferasyon indeksi ovulasyon fazının kontrolünde ( $1.84\pm 0.09$ ), en düşük PI değeri ise, ortaya çıkan KA frekansları ile tutarlı olarak, foliküler evrenin 48 saatlik MMC uygulamasında ( $1.57\pm 0.14$ ) saptanmıştır. Özetlenecek olursa en yüksek PI değerleri ovulasyon fazında hesaplanmıştır (Çizelge.4.2.).

Sigara kullanan donörlerden elde edilen PI değerleri ise daha açıklanabilir olarak değerlendirilmiştir. Kontroller açısından incelendiğinde en yüksek PI değeri, foliküler fazda bulunmuş olup ovulasyon fazındaki muadilinden önemli ölçüde ( $P<0.05$ ) yüksek bulunmuştur. MMC uygulaması bu grupta belirgin etkiler ortaya çıkarmıştır. Burada MMC iki uygulama hariç (ovulasyon ve luteal fazda 24 saatlik) PI değerlerini anlamlı düzeyde azaltmıştır (Çizelge 4.2.).

Sigara kullanan ve kullanmayan gruplara ait PI verileri irdelendiğinde (ovulasyon evresi MMC uygulamaları hariç) sigara kullananların PI değerleri sigara kullanmayanlara ait değerlerden daha yüksek bulunmuş olup foliküler evre kontrolleri arasında anlamlı bir fark ( $P<0.05$ ) saptanmıştır. (Çizelge.4.2.).

Sigara kullanmayanlardaki kontrollerdeki mitotik indeksler (MI) incelendiğinde ilk göze çarpan sonuç foliküler evrede en düşük MI değeri ( $4.55\pm 0.18$ ) en yüksek değer ise luteal fazda ( $5.20\pm 0.18$ ) hesaplanmış olup, bu durum ortaya çıkan KA frekansları ile tutarlıdır. MMC muamelesi MI değerini düşürmekle birlikte bu düşüşler sadece foliküler ve luteal fazdaki 48 saatlik muamelede kontrole göre önemli bulunmuştur (Çizelge.4.3.).

Sigara kullananlarda kontrollerdeki MI değerleri irdelendiğinde sigara kullanmayan gruptaki bulguların aksine ama KA frekansları ile tutarlı olarak en yüksek değer ( $5.06\pm 0.08$ ) foliküler fazda en düşük değer ise luteal fazda ( $4.58\pm 0.16$ ) hesaplanmıştır. Foliküler evrede hesaplanan bu değer diğer iki fazdaki bulunan değerlerden önemli ( $P<0.05$ ) derecede yüksektir. MMC bu grupta MI üzerine etkisini çok belirgin olarak ortaya çıkarmamış olup sadece foliküler evrede ve luteal evrenin 48 saatlik uygulamasında kontrole göre anlamlı düzeyde MI değerini azaltmıştır. Bu bilgilere ilaveten luteal fazdaki hesaplanan MI değerlerinin tamamı foliküler evrede hesaplananlardan önemli seviyede ( $P<0.05$ ) düşük bulunmuştur (Çizelge.4.4.).

Ayrıca sigara kullanan ve kullanmayan gruplarda bulunan MI değerleri açısından da anlamlı farklar bulunmuştur. Kısaca açıklamak gerekirse foliküler ve luteal evrelere ait kontrol ve 24 saatlik MMC uygulamaları iki grup (NS ve S) arasında önemli düzeyde farklılıklar bulunmuştur (Çizelge.4.4.).

## 4.2.Tartışma

### 4.2.1. Adet Döngüsü Evrelerinin İnsan Periferik Kan Lenfositlerinde Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) ve Kromozom Aberasyonu (KA) Üzerindeki Etkisi

Üreme çağındaki bazı memelilerde görülen adet döngüsü temel olarak yumurtanın döllenmesi ve oluşan zigotun uygun zemin bularak tutunup ontogenik gelişimi tamamlaması gibi süreçlerin hazırlanması sırasında ortaya çıkan yeniden düzenlemelerdir. Bu sürecin yönetiminde endojen cinsiyet hormonları (E2, FSH, LH ve progesteron gibi) öncül roller üstlenmektedirler. Önceki bölümlerde açıklandığı gibi adet döngüsü esnasında endojen cinsiyet hormonlarının konsantrasyonları, döngünün doğası gereği ve evreye bağlı olarak belirgin dalgalanmalar göstermektedir. Bu dalgalanmalar belirli sınırlar kapsamında cereyan etmekte olsa da bunların bireyin metabolizması üzerinde bariz etkilerinin olduğu yukarıda da vurgulanmıştır. Bu çalışmada dikkate alınan endojen cinsiyet hormonları yapısal olarak steroid grubu hormonlar sınıfına girmektedirler. Steroid hormonların sitolojik ve genetik etkilerini araştıran onlarca çalışma yapılmış ve bunların sonuçları literatüre girmiştir. Bu çalışmaların büyük çoğunluğu kontrollü hormon uygulamalarının hücreye ve genomuna olan etkilerini ortaya çıkarmayı hedefleyen çalışmalardır. Her ne kadar bu çalışmada önceki yapılanlardan farklı olarak adet döngüsüne bağlı olan normal hormon dalgalanmalarının olası kromozom ve mitotik hassasiyetlerin ortaya çıkarılmasını hedeflemiş olsa bile bu alana yeni katkılar sağlamaya adaydır. Böylece çalışma sonunda elde edilmiş verilerin kontrollü hormon muamelesine benzer etkiler gösterip göstermediği de irdelenmiştir. Bu çalışmada yapılan testlerin sonuçlarını tartışmaya başlamadan, daha önce yapılmış benzer

çalışmalara kısaca değinmek konunun anlam bütünlüğü daha iyi kavranması açısından çalışmaya önemli katkılar sağlayacaktır. Öncelikle literatürde en fazla göze çarpan endojen cinsiyet hormonlarından E2 daha sonra da diğer hormonların etkilerini tartışılan çalışmalara aşağıda değinilmiştir. Bundan başka burada anılan hormonların seviyelerini, adet döngüsünden bağımsız olarak etkileyen unsurlara da atıfta bulunmak yapılan çalışmanın hedefini daha da belirginleştirecektir. Ancak bu bilgilere geçmeden önce bazı eksojen etkilerin canlıdaki hormon profilini etkileyebileceği gösterilmiş olup örneğin sigara dumanına maruz bırakılan deney hayvanlarının (sıçan) periferik kanlarında progesteron seviyesi kontrol grubuna kıyasla oldukça yüksek bulunmuştur (Florek ve ark. 2008). Hormonların doğrudan transkripsiyon faktörü olduğu (Whitehead SA ve Nussey S., 2001) ve özellikle östrojenlerin hücre ölümüne karşı koruyucu davranış gösterdiği saptanmıştır (Cutolo et al (2005). Yani hormonlar bireyin fenotipi üzerine gen transkripsiyon düzeylerini değiştirerek epigenetik etkiler göstermektedir. Bundan başka hücre sayısında da bir artışa yol açarak kanser olma riskini yükseltir (Renato ve Paola 2010). Ayrıca östrojenlerin doğrudan gen mutasyonunu ya da aneuploidiyi uyararak genomik dengesizliği artırdığı belirtilmiştir ki bu oksidatif hasarın inisiyasyonu ile ilgili olan meme kanseri riskini de artırır (Welch 2009). Ovulasyon uyarıcı ilaç kullanan kadınlarda artmış bir KKD frekansı gözlenmiştir (Joseph-Lerner ve ark. 1993). Ksenoöstrojen uygulamasının hücrelerde birçok genotoksik ve sitotoksik riskleri beraberinde getirdiğini ortaya çıkartan birçok çalışma mevcuttur (Hiller-Sturmhöfel ve Bartke, 1998, Stellman et al 1998, Meek and Finch 1999, Ahmad ve ark. 2000, Liehr ve ark. 2000, Rudel et al 2001, Charlier and Plomteux 2002, Djelic ve Djelic, 2002, Travis ve Key 2003, Iwai et al 2005). Ayrıca çevresel kirleticiler de steroid hormonların etkilerini taklit ederek canlıları önemli ölçüde etkilemektedir (Adami et al. 1995, Kojima et al. 2005, Lee et al. 2012, Li et al 2012). Bunun sonucunda meme kanseri (Stellman et al 1998, Rudel et al 2001, Charlier and Plomteux 2002, Iwai et al 2005 ), endometrial kanser (Hiller-Sturmhöfel ve Bartke, 1998) ve testis germ hücre tümörleri (Meeks et al 2012) frekansları oldukça yükselmektedir. Çalışmamıza benzer bir araştırmada, adet döngüsüne bağlı olarak KKD ve KA frekanslarında önemli dalgalanmalar gözlenmiştir; KKD adet döngüsünün sonunda en yüksek

değerine ulaşırken ovulasyonda düşmüştür. Hâlbuki KA'lar, adet görmenin başından ovulasyon evresine kadar gittikçe artma eğilimindedir ve daha sonra kademeli olarak düşmüştür. Aynı çalışmada MN ise önemli seviyede dalgalanmamıştır (Landi ve Barale 1999). Bu çalışmada endojen cinsiyet hormon dalgalanmalarına bağlı genotoksisite bulgularında değişikliklerinin ortaya çıktığı vurgulanmış olup bizim çalışmamızda da benzer dalgalanmalar bariz şekilde görülmektedir. Ancak bu sonuç bizim bulgularımızın bir kısmı ile örtüşürken bir kısmı ile de çelişmektedir. Bizim çalışmamızda adet döneminde E2, FSH, LH ve progesteron hormonlarındaki belirgin dalgalanmalar gözlenmekte olup dalgalanmaların hücrelerde bir takım genetik ve/veya epigenetik etkilerinin olduğu önceki çalışmalardan da (Fowden ve Forhead 2009) bilinmektedir.

Çalışmamızda kontrol bulgularının önemi kadar MMC uygulamasına verilen hücresel tepki şiddetinin de son derece önemi vardır. Çünkü bu sonuçlar adet döngüsünün herhangi bir dönemde çevresel risk faktörlerine maruz kalmanın nasıl sonuçlar sergileyeceğini tahmin etmemize olanak vermektedir. Çalışmamızda mutajenitenin göstergesi olarak uygulanan testlere ait bulgular incelendiğinde, kontrollerde saptanan KKD frekansları foliküler evreden luteal evreye doğru bir azalma eğilimi göstermiştir. Ancak MMC uygulamasına verilen tepki bakımından ortalamalara bakılırsa saptanan en yüksek KKD değerleri ortalaması sigara kullanmayan grupta ovulasyon evresi, sigara kullananlarda ise en yüksek KKD frekansı foliküler evrede bulunmuştur. Her iki grupta da ortak olarak, luteal evrenin KKD frekansının en düşük saptandığı evre olduğu değerlendirilmiştir. Sonuçlar KKD bulgusu yönünden özetlenecek olursa MMC'ye adet döngüsünün en duyarlı dönemleri olarak foliküler ve ovulasyon evresi, en dayanıklı dönem ise luteal evre olarak karşımıza çıkmaktadır. Veriler KA'lı hücre yüzdesi ve KA/hücre yönünden değerlendirilecek olursa sigara kullanmayan donörlerde en yüksek anormallik ortalaması foliküler evre en düşük anormallik ortalaması ise luteal evre saptanmıştır. Sigara kullanan grubun kontrollerindeki KA'lı hücre yüzdeleri foliküler evreden luteal evreye doğru artma yönünde bir eğilim gösterse de MMC uygulamasına verilen tepkiler yönünden en yüksek kromozom anormalliği ovulasyon evresinde saptanmıştır. Bu sonuçlar KKD verileriyle karşılaştırılacak olursa şaşırtıcı bir şekilde

benzerlikler göstermektedir. KA yönünden de adet döngüsünün bilinen mutajenlere karşı en dayanıklı olduğu evrenin luteal evre olduğu söylenebilir. Sigara kullanımına ilaveten mutajen uygulamasının KA'lı hücre frekansını anlamlı düzeyde artırdığı görülmektedir. Sigara kullanımının progesteron değerinin düşmesine paralel olarak, hücre döngüsü kontrol noktalarını (checkpoint) engelleyerek daha fazla mutasyonlarla karşılaşmamıza ve PI ve MI'nın daha yüksek görülmesine yol açtığını değerlendirmekteyiz.

#### **4.2.2. Adet Döngüsü Evrelerinin Hücre Proliferasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerine Olan Etkisi**

Çalışmada DNA replikasyonu ve hücre siklusu verileri incelendiğinde adet döngüsüne özel dikkat çekici bulgulara rastlanmamıştır. Bireylerin hormon düzeyleri üzerine dışarıdan herhangi bir etkileme yapılmadığı için özellikle hücre siklusunda göze çarpan bir sonuç saptanmamıştır. Bununla birlikte hücreler MMC uygulamasına beklendiği gibi hem proliferasyon indeksini hem de mitotik indeksi düşürerek cevap vermişlerdir. İlaveten sigara alışkanlığının belki de hormon düzeylerini düşürerek proliferatif etkisi özellikle foliküler evrede gözlenmekte olup bu etki sigaranın kanserojen karakterine işaret etmektedir.

**5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER**

Bu çalışmada üreme çağındaki sağlıklı ve ilaçla doğum kontrolü uygulamayan sigara kullanmayan ve aynı ölçütlere sahip sigara kullanan kadınların periferik kanlarındaki cinsiyet steroidlerinin dalgalanmasına bağlı olarak ortaya çıkabilecek olası kromozom hassasiyeti ve sitotoksositeye yatkınlık davranışı araştırılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız testler kısa süreli genotoksitenin sitotoksitenin saptanmasında geniş çapta kabul gören sınaama ölçekleridir. Sonuçlar değerlendirildiğinde hassasiyetin genel anlamda en fazla arttığı evre foliküler evre en az etkilenilen evrenin ise luteal evre olduğunu rahatlıkla söyleyebiliriz. Luteal evre bu riskler bakımından en dayanıklı evredir denilebilir.

Çevresel kirleticilerin yanında çeşitli nedenlerle kullanılmak zorunda kalınan tedavi edicilerin (kemoterapötik ajanlar da dâhil) iyileştirici etkilerinin yanında mevcut yan etkilerinden dolayı risk faktörleri içerisinde sayılmalıdır. Bu tehlike ve risklerle karşı karşıya olan insan, kimyasalların toksik ve özellikle de genotoksik etkilerine belirgin şekilde maruz kalmaktadır. Bu gibi risklerle karşılaşma zamanını tam olarak ayarlayamadığımız yaşam süreci içinde olası dönemsel kromozomal hassasiyetler veya epigenetik mekanizmalar son derece önem kazanmaktadır. Bununla birlikte kadınlarda ilaç kullanım periyodunun kısmen ayarlanması bile varsa dönemsel kromozom duyarlılık sürecinin atlatılmasında çok önemli katkılar sağlayacaktır. Bu bilinçle olası risk faktörlerinden bireylerin kendini maksimum seviyede koruması önerilebilir. İşte bizim yaptığımız bu çalışma, hormon dalgalanmasına bağlı olarak mevcut bir kromozom duyarlılık periyodu veya periyodlarına bir nebze olsun ışık tutmaktadır.

Bununla birlikte bu çalışmanın tali ancak önemli sonuçlarından birisi de sigara alışkanlığının belki de hormon düzeylerinin düşürmesinden dolayı, proliferatif etkisi özellikle foliküler evrede gözlenmekte olup bu etki sigaranın genotoksik kanserojen karakterine işaret etmektedir.

Çalışma bulgularının tamamı özetlenecek olursa her iki grupta da MMC uygulamasına verilen KKD ve KA cevabı bakımından en duyarlı dönemin foliküler ve ovulasyon evreleri olduğu, en dayanıklı evrenin ise luteal evre olduğu belirgin bir

şekilde ortaya çıkmıştır. Bizim ve benzer çalışmaların bulguları doğrultusunda çevresel risk faktörlerinin adet döngüsünden bağımsız bir şekilde bilinen etkileri yanında kadınlarda adet döngüsüne bağlı olarak ortaya çıkması muhtemel genotoksisite bulguları dikkate alındığında hangi evrenin daha duyarlı ya da tersine hangi evrenin daha stabil olduğu bilgisi birey sağlığı açısından son derece önemli olup bu bilgiler önleyici sağlık tedbirler çerçevesinde değerlendirilebilir. Elde ettiğimiz bu bulgulara rağmen bu sonuçların benzer başka çalışmalar ve ilave test sistemleriyle de desteklenmesi gerektiği kanısındayız.

## KAYNAKLAR

- ADAMI, HO., LIPWORTH, L., TITUS,-ERNSTOFF, L., HSIEH, CC., HANBERG, A., AHLBORG, U., BARON, J., TRICHOPOULOS, D., 1995. Organochlorine compounds and estrogen-related cancers in women. *Cancer Causes Control*. Nov;6(6):551-66.
- AHMAD, M.E., SHADAB, G.G., HODA, A. and AFZAL, M., 2000. Genotoxic effects of estradiol-17beta on human lymphocyte chromosomes, *Mutat. Res.*, 466:109–115.
- AHMAD, M.E, SHADAB, G.G., AZFER, MA., AFZAL, M., 2001. Evaluation of genotoxic potential of synthetic progestins-norethindrone and norgestrel in human lymphocytes in vitro. *Mutat Res.*, Jul 25; 494(1-2):13-20.
- ALBERTINI, R. J., ANDERSON, D., DOUGLAS, G. R., HAGMAR, L., HEMMINKI, K., MERLO, F., NATARAJAN, A. T., NORPPA, H., SHUKER, D. E. G., TICE, R., WATERS, M. D. and AITIO, A., 2000. IPCS Guidelines for The Monitoring of Genotoxic Effects of Carcinogens in Humans. *Mutat. Res.*, 463:111-172.
- ANDERSON, D., 1988. Human Biomonitoring. *Mutat. Res.*, 204:353-541.
- AYHAN, A., 2008. Temel Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi Menstrüel Döngü Güneş Kitabevi 2.Baskı Chapter:1489-1497.
- BAEYENS, A., VANDERSICKEL, V., THIERENS, H., RIDDER LD., VRAL A., 2005. Effects of estradiol and progesterone on the variability of the micronucleus assay. *Mutat Res.*, Oct 15;578(1-2):308-16. Epub 2005 Jul 11.
- BAJPAYEE, M., PANDEY, AK., PARMAR, D., MATHUR, N., SETH, PK., DHAWAN A., 2005. Comet assay responses in human lymphocytes are not influenced by the menstrual cycle: a study in healthy Indian females. *Mutat Res.*, Jan 3;565(2):163-72.
- BALTACI, V., ZEYNELOGLU, HB., 2004. Increased frequency of sister-chromatid exchange and altered alkaline comet assay scores in superovulation cycles for unexplained infertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. Mar 15;113(1):73-7.



- BECHER, R., 1988. No effect of high-dose medroxyprogesterone acetate on the frequency of sister chromatid exchange in lymphocytes of cancer patients. *Oncology*.;45(1):57-60.
- BOADA, LD., ZUMBADO, M., DEL, RI., BLANCO, A., TORRES, S., MONTERDE, JG., AFONSO, JL., CABRERA, JJ., DIAZ-CHICO, BN., 2002. Steroid hormone progesterone induces cell proliferation and abnormal mitotic processes in rat liver. *Arch Toxicol. Jan*;75(11-12):707-16.
- BONASSI, S., HAGMAR, L., STROMBERG, U., MONTAGUD, A. H., TINNERBERG, H., FORNI, A., HEIKKILÄ, P., WANDERS, S., WILHARDT, P., HANSTEEN, I. L., KNUDSEN, L. E. and NORPPA, H., 2000. Chromosomal Aberrations in Lymphocytes Predict Human Cancer Independently of Exposure to Carcinogens. *Cancer Res.*, 60:1619-1625.
- BONASSI, S, ZNAOR, A., NORPPA, H. and HAGMAR, L., 2004. Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. *Cytogenet. Genome Res.* 104:376-382.
- BONASSI, S, UGOLINI, D., KIRSCH-VOLDERS, M., STROMBERG, U., VERMEULEN, R. and TUCKER, J. D., 2005. Human Population With Cytogenetic Biomarkers: Review of the Literature and Future Perspectives. *Environ. and Mol. Mutagen.*, 45:258-270.
- BONASSI, S, ZNAOR, A., CEPPI, M., LANDO, C., CHANG, W. P., HOLLAND, N., KIRSCH-VOLDERS, M., ZEIGER, E., BAN, S., BARALE, R., BIGATTI, M. P., BOLOGNESI, C., CEBULSKA-WASILEWSKA, A., FABIANOVA, E., FUCIC, A., HAGMAR, L., JOKSIC, G., MARTELLI, A., MIGLIORE, L., MIRKOVA, E., SCARFI, M.R., ZIJNO, A., NORPPA, H. and FENECH, M., 2007. An Increased Micronucleus Frequency in Peripheral Blood Lymphocytes Predicts the Risk of Cancer in Humans. *Carcinogenesis*, 28:625-631.
- BRAZ, MG., SALVADORI, DM., 2007. Lack of genotoxicity induced by endogenous and synthetic female sex hormones in peripheral blood cells detected by alkaline comet assay. *Environ Mol Mutagen.* Jun;48(5):414- 20.

- BRAZ, FAVERO SALVADORI DM., 2007. Influence of endogenous and synthetic female sex hormones on human blood cells in vitro studied with comet assay. *Toxicol In Vitro*. Aug;21(5):972-6. Epub 2007 Feb 27.
- CARRANO, A.V., THOMPSON, LINDL, P.A. and MINKLER, J.L., 1978. Sister Chromatid Exchanges as an Indicator of Mutagenesis. *Nature (London)*, 271: 551-553.
- CARRANO, and NATARAJAN, A. T., 1988. Consideration for Population Monitoring Using Cytogenetic Techniques. *Mutat. Res.*, 204:379-406.
- CAVALIERI, E., FRENKEL, K., LIEHRE, J.G., ROGAN, E. and ROY, D., 2000. Estrogens as endogenous genotoxic agents—DNA adducts and mutations, *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*; 75–93.
- CHARLIER C., PLOMTEUX G., 2002. Environmental chemical pollution and toxic risk for humans: the particular role of organochlorine pesticides. *Ann Biol Clin (Paris)*. Jan-Feb;60(1):37-46.
- CHENG, M., CONNER, M. K. and ALARIA, Y., 1981. Potency of Some Carbamates as Multiple Tissue Sister Chromatid Exchanges in Bloom's Syndrome Lymphocytes. *Cancer Res.*, 71:4508-4512.
- COCCHI, L., SCARCELLI, V., PULITI, A., BARALE, R. and SBRANA, I., 2005. Endogenous sex hormones affect the mutagen-induced chromosome damage by altering a caffeine-sensitive checkpoint. *Mutation Res.* 570(2); 281-288.
- CUTOLO, M., CAPELLINO S., PAOLA, M., PAOLA G., SULLI A. And VILLAGGIO B., 2005. Sex hormone modulation of cell growth and apoptosis of the human monocytic/macrophage cell line. *Arthritis Research & Therapy*, 7:R1124-R1132 doi:10.1186/ar1791
- D'SOUZA, D., THOMAS, IM., DAS, BC., 1988. Variation in spontaneous chromosomal damage as a function of biologic rhythms in women. *Hum Genet*. May;79(1):83-5.
- DHILLON, VS., DHILLON,IK., 1996. Genotoxicity evaluation of norethisterone acetate. *Mutat Res*. Jan;367(1):1-10.

- DJELIC, N., and DJELIC, D., 2002. Enhanced sister-chromatid exchange rate in human lymphocytes exposed to 17beta estradiol in vitro, *Arch. Med. Res.*, 33:148–151.
- EVANS, H.J., 1984. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. Handbook of Mutagenicity Test Procedures. In: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (Eds.), Second edition, Elsevier Science Publishers, BV, pp. 405-427.
- FEINBERG, BB., TAN, NS., WALSH, SW., BRATH, PC., GONIK, B., 1992. Progesterone and estradiol suppress human mononuclear cell cytotoxicity. *J Reprod Immunol.* Mar;21(2):139-48.
- FISCHER, W.H., KEIWAN, A., SCHMITT, E. and STOPPER, H., 2001. Increased formation of micronuclei after hormonal stimulation of cell proliferation in human breast cancer cells, *Mutagenesis* 16; 209–212.
- FLOREK, E., JANICKI, R., PIEKOSZEWSKI, W., KULZA, M., CHUCRACKI, M., SEDZIAK, A., 2008. Tobacco smoking influence on the level of sex hormones--animal model. *Przegl Lek.*;65(10):508-13.
- FOWDEN, A.L., FORHEAD, A. J., 2009. Hormones as epigenetic signals in developmental programming. doi: 10.1113/expphysiol.2008.046359. *Experimental Physiology*, 94, 607-625.
- FUCIC, A., STOJKOVIC, R., KATIC, J., MARKOVIC, D., FERENCIC, Z., KORSIS, M., JAZBEC, AM., GAMULIN, M., 2009. Animal model for age- and sex-related genotoxicity of diethylstilbestrol. *Braz J Med Biol Res.*, 42(11):1090-6.
- FURUYA, T., HAGIWARA, J., OCHI, H., TOKUHIRO, H., KIKAWADA, R., KARUBE, T., WATANABE, S., 1991. Changes of common fragile sites on chromosomes according to the menstrual cycle. *Hum Genet.* Mar;86(5):471-4.
- GIEMSA, G., 1904. Eine Vereinfachung und Vervollkommnung meiner Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nocht'schen Chromatinfärbung. *Centralblatt für Bakteriologie I Abteilung* 32, 307–313.

- HAGMAR, L., BRØGGER, A., HANSTEEN, I. L., HEIM, S., HÖGSTEDT, B., KNUDAEN, L., LAMBERT, B., LINNAINMAA, K., MITELMAN, F., NORDENSON, I., REUTERWALL, C., SALOMAA, S., SKERFVING, S. and SORSA, M., 1994. Cancer Risk in Human Predicted by Increased Levels of Chromosomal Aberrations in Lymphocytes: Nordic Study Group on the Health Risk of Chromosome Damage. *Cancer Res.*, 54:2919-2922.
- HELLEDAY, T., 2003. Pathways for Mitotic Homologous Recombination in Mammalian Cells. *Mutat. Res.*, 532:103-115.
- HERZOG, R., LEUSCHNER, J., 1995. Evaluation of the mutagenicity of medroxyprogesterone acetate in vitro and in vivo. *Arzneimittelforschung*. Mar;45(3):311-4.
- HILL, A., WOLFF, S., 1983. Sister chromatid exchanges and cell division delays induced by diethylstilbestrol, estradiol, and estriol in human lymphocytes. *Cancer Res.*, Sep;43(9):4114-8.
- HILLER-STURMHOFEL, S., BARTKE, A., 1998. The Endocrine System An Overview Vol. 22, No. 3, 159 .
- HUNDAL, BS., DHILLON, VS., SIDHU, IS., 1997. Genotoxic potential of estrogens. *Mutat Res*. Mar 17;389(2-3):173-81.
- IWAI, K., MIZUNO, S., MIYASAKA, Y., MORI, T., 2005. Correlation between suspended particles in the environmental air and causes of disease among inhabitants: cross-sectional studies using the vital statistics and air pollution data in Japan. *Environ Res*. 2005 Sep;99(1):106-17. Epub Jan 11.
- JOSEPH-LERNER, N., FEJGIN, M., BEN-NUN, I., LEGUM, C. and AMIEL, A., 1993. The correlation between the frequency of sister-chromatid exchange and human reproductive hormones, *Mutat. Res.* **300**; 247–252.
- KAUDERER, B., ZAMITH, H., PAUMGARTEN, F. J. and SPEIT, G., 1991. Evaluation of the Mutagenicity of Beta-Myrcene in Mammalian Cells In Vitro. *Environ. Mol. Mutagen.*, 18 (1):28-34.

- KAYANI, MA., PARRY, JM., 2008. The detection and assessment of the aneugenic potential of selected oestrogens, progestins and androgens using the in vitro cytokinesis blocked micronucleus assay. *Mutat Res.*, Mar 12;651(1-2):40-5. Epub 2007 Nov 5.
- KAYIKCIOGLU, F., GUNES, M., BALTACI, V., KOCAK, M., ALPAS, I., HABERAL, A., 2000. Sister-chromatid exchange frequencies in postmenopausal hormone replacement patients. *Mutat Res.*, Jul 20;452(1):37-9.
- KOCHHAR, TS., 1985. Inducibility of chromosome aberrations by steroid hormones in cultured Chinese hamster ovary cells. *Toxicol Lett.* Dec;29(2-3):201-6.
- KOCHHAR, TS., 1988. Steroid hormones enhanced sister-chromatid exchange in cultured CHO cells. *Experientia.* Jan 15;44(1):62-3.
- KOJIMA, M., FUKUNAGA, K., SASAKI, M., NAKAMURA, M., TSUJI, M., NISHIYAMA, T., 2005. Evaluation of estrogenic activities of pesticides using an in vitro reporter gene assay. *Int J Environ Health Res.* Aug;15(4):271-80.
- KOOPMAN, MG., FLEER, A. VD., SCHAAF, DB., VAN DER MEULEN, FW., VON DEM BORNE, AE., ENGELFRIET, CP., 1981. Male-female differences in the cytotoxic activity of human monocytes in vitro. *Clin Lab Haematol.*;3(1):45-50.
- LANDI, S., BARALE, R., 1999. Sister chromatid exchanges, chromosome aberrations and micronuclei in female lymphocytes: correlations with biological rhythms, miscarriages and contraceptive pill use. *Mutagenesis.* Nov;14(6):581-6.
- LANG, R., REIMANN, R., 1993. Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids. I. Communication: examination for the induction of gene mutations using the Ames Salmonella/microsome test and the HGPRT test in V79 cells. *Environ Mol Mutagen.*;21(3):272-304.
- LEE, W., KANG, CW., SU, CK., OKUBO, K., NAGAHAMA, Y., 2012. Screening estrogenic activity of environmental contaminants and water samples using a transgenic medaka embryo bioassay. *Chemosphere.* Apr 10.

- LI, G., Zu, L., WONG, PK., HUI, X., LU, Y., XIONG, J., An, T., 2012. Biodegradation and detoxification of bisphenol A with one newly-isolated strain *Bacillus* sp. GZB: Kinetics, mechanism and estrogenic transition. *Bioresour Technol.* Mar 29.
- LIEHR, J.G., 1997. Dual role of oestrogens as hormones and pro-carcinogens: tumour initiation by metabolic activation of oestrogens, *Eur. J. Cancer Prev.* **6**; 3–10.
- LIEHR, J.G., 2000. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen. *Endocrinol. Rev.* **21**; 40–54.
- LIEHR, J.G., 2001. Genotoxicity of the steroidal oestrogens oestrone and oestradiol: possible mechanism of uterine and mammary cancer development. *Hum Reprod Update.* May-Jun;7(3):273-81.
- LITTLEFIELD, LG., LEVER, WE., MILLER, FL., GOH, KO., 1975. Chromosome breakage studies in lymphocytes from normal women, pregnant women, and women taking oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol.* Apr 1;121(7):976-80.
- LUKIC, B., BARJAKTAROVIC, N., 1987. Sister-chromatid exchanges in newborns after normal and progesterone-treated pregnancies. *Mutat Res.*, Jun;191(2):121-4.
- MACE, ML. JR., DASKAL, Y. and WRAY, W., 1978. Scanning electron microscopy of chromosome aberrations. *Mutat. Res.*, **52**:199-206.
- MAGKOUFOPOULOU, C., CLAESSEN, SM., JENNEN, DG., KLEINJANS JC., VAN DELFT, JH., 2011. Comparison of phenotypic and transcriptomic effects of false-positive genotoxins, true genotoxins and non-genotoxins using HepG2 cells. *Mutagenesis.* Sep;26(5):593-604. Epub 2011 Jun 1.
- MAHROUS, HS., 2008. Evaluation of genetic damage in human lymphocytes of women using oral contraceptives. *J Egypt Public Health Assoc.*;83(5-6):403-14.

- MAILANDER, PC., MEZA, JL., HIGGINBOTHAM S, CHAKRAVARTI, D., 2006. Induction of A.T to G.C mutations by erroneous repair of depurinated DNA following estrogen treatment of the mammary gland of ACI rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Nov;101(4-5):204-15. Epub 2006 Sep 18.
- MARTELLI, A., MATTIOLLI, F., ANGIOLA, M., REIMANN, R., BRAMBILLA, G., 2003. Species, sex and inter-individual differences in DNA repair induced by nine sex steroids in primary cultures of rat and human hepatocytes. *Mutat Res.* Apr 20;536(1-2):69-78.
- MASUDA, S., TERASHIMA, Y., SANO, A., OKADA, M., DEGUCHI, Y., TOYOIZUMI, T., SUGIYAMA, C., KUMAZAWA, S., KAMIHIRA, M., YOSHIOKA, H., TERAOKA, Y., KINAE, N., 2006. Changes in the mutagenic and estrogenic activities of 17beta-estradiol after treatment with nitrite. *Biosci Biotechnol Biochem.* Apr;70(4):890-6.
- MEEK, MD., FINCH, GL., 1999. Diluted mainstream cigarette smoke condensates activate estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor-mediated gene transcription. *Environ Res.* Jan;80(1):9-17.
- MEEKS, JJ., SHEINFELD, J., EGGENER, SE., 2012. Environmental toxicology of testicular cancer. *Urol Oncol.* Mar;30(2):212-5.
- MURAKAMI, M., MINAMIHISAMATSUA, M., SATOH, K., HAYATAA, I., 2001. Structural analysis of heavy ion radiation-induced chromosome aberrations by atomic force microscopy. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods.* 48(3): 293–301.
- MURDOCH, WJ., 2005. Carcinogenic potential of ovulatory genotoxicity. *Biol Reprod.* Oct;73(4):586-90. Epub 2005 Jun 15.
- MURTHY, PB., PREMA, K., 1983. Further studies on sister-chromatid exchange frequency in users of hormonal contraceptives. *Mutat Res.*, Mar;119(3):351-4.
- NAIK, P., VIJAYALAXMI, KK., 2009. Cytogenetic evaluation for genotoxicity of bisphenol-A in bone marrow cells of Swiss albino mice. *Mutat Res.* May 31;676(1-2):106-12. Epub 2009 Apr 22.

- NELLES, J.L., HU, W.Y. and PRINS, G.S., 2011. Estrogen action and prostate cancer. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 6(3):437-451.
- NORPPA, H., BONASSI, S., HANSTEEN, I-L., HAGMAR, L., STROMBERG, U., ROSSNER, P., BOFFETTA, P., LINDHOLM, C., GUNDY, S., LAZUTKA, J., CEBULSKA-WASILEWSKA, A., FABIÁNOVÁ, E., ŠRÁM, R. J., KUNUDSEN, L. E., BARALE, R. and FUCIC, A., 2006. Chromosomal Aberrations and SCE as Biomarkers of Cancer Risk. *Mutat. Res.*, 600(1-2):37-45.
- OKOH, V., DEORAJ, A., ROY, D., 2011. Estrogen-induced reactive oxygen species-mediated signalings contribute to breast cancer. *Biochim Biophys Acta.* Jan;1815(1):115-33. Epub 2010 Oct 29.
- PARADI E., 1981. Mutagenicity of some contraceptive drugs in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res.* Feb;88(2):175-8.
- PERRY, P. and EVANS, H. J., 1975. Cytological Detection of Mutagen-Carcinogen Exposure by Sister Chromatid Exchange. *Nature*, 258:121-125.
- PERRY, P., and THOMSON, E.J., 1984. The methodology of sister chromatid exchanges, in: B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel (Eds.), *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd Edition, Elsevier, Amsterdam, pp. 459–529.
- PETRIDIS P, JHA, AN., LANGSTON, WJ., 2009. Measurements of the genotoxic potential of (xeno-)oestrogens in the bivalve mollusc *Scrobicularia plana*, using the Comet assay. *Aquat Toxicol.* Aug 13;94(1):8-15. Epub 2009 May 27.
- PRESTON-MARTIN, S., PIKE, M.C., ROSS, R.K., JONES, P.A. and HENDERSON, B.E, 1990. Increased cell division as a cause of human cancer, *Cancer Res.* **50**; 7415–7421.
- RENATO N.V.B., PAOLA, N., 2010 New Targeted Therapies Against Breast Cancer. *J Carcinogene Mutagene* 1:110. doi:10.4172/2157-2518.1000110
- ROSSI, D., AIELLO, V., MAZZONI, L., SENSI, A., CALZOLARI, E., 2007. In vitro short-term test evaluation of catecholestrogens genotoxicity. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Jun-Jul;105(1-5):98-105. Epub 2007 May 17.



- RUDEL, RA., BRODY, JG., SPENGLER, JD., VALLARINO, J., GENO, PW., SUN, G., YAU A., 2001. Identification of selected hormonally active agents and animal mammary carcinogens in commercial and residential air and dust samples. *J Air Waste Manag Assoc.* Apr;51(4):499-513.
- SAVAGE, J. R. K., 1993. Update on Target Theory as Applied to Chromosomal Aberrations. *Env. and Mol. Mutagen.*, 22:198-207.
- SHAKHAR, K., SHAKHAR, G., ROSENNE, E., BEN-ELIYAHU, S., 2000. Timing within the menstrual cycle, sex, and the use of oral contraceptives determine adrenergic suppression of NK cell activity. *Br J Cancer.* Dec;83(12):1630-6.
- SIDDIQUE, YH., BEG, T., AFZAL, M., 2005. Genotoxic potential of ethinylestradiol in cultured mammalian cells. *Chem Biol Interact.* Jan 15;151(2):133-41.
- SIDDIQUE, ARA G., BEG, T., AFZAL, M., 2006. Genotoxic potential of medroxyprogesterone acetate in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Life Sci.* Dec 23;80(3):212-8. Epub 2006 Sep 16.
- SHYAMA, SK., RAHIMAN, MA., 1996. Genotoxicity of lynoral (ethinylestradiol, an oestrogen) in mouse bone marrow cells, in vivo. *Mutat Res.* Oct 1;370(3-4):175-80.
- SONODA, E., SASAKI, M. S., MORRISON, C., YAMAGUCHI-IWAI, Y., TAKATA, M. and TAKEDA, S., 1999. Sister Chromatid Exchanges Are Mediated by Homologous Recombination in Vertebrate Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 19 (7):5166-5169.
- SOUZA, SS., CASTRO, FA., MENDONCA, HC., PALMA, PV., MORAIS, FR., FERRIANI, RA., VOLTARELLI, JC., 2001. Influence of menstrual cycle on NK activity. *J Reprod Immunol.* May;50(2):151-9.
- SPEIT, G., 1984. Considerations on the Mechanism of Differential Giemsa Staining of Bromodeoxyuridine-Substituted Chromosomes. *Hum. Genet.*, 67:264-269.
- SPEIT, G., and HAUPTER, S., 1985. On the Mechanism of Differential Giemsa Staining of BrdU-Substituted Chromosomes. *Hum. Genet.*, 70:126-129.

- STELLMAN, SD., DJORDJEVIC, MV., MUSCAT, JE., GONG, L., BERNSTEIN, D., CITRON, ML., WHITE, A., KEMENY, M., BUSCH, E., NAFZIGER, AN., 1998. Relative abundance of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in adipose tissue and serum of women in Long Island, New York. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* Jun;7(6):489-96.
- STOPPER, H., SCHMITT, E., GREGOR, C., MUELLER, S.O. and FISCHER, W.H, 2003. Increased cell proliferation is associated with genomic instability: elevated micronuclei frequencies in estradiol-treated human ovarian cancer cells, *Mutagenesis* **18**; 243–247.
- SULKE, AN., JONES, DB., WOOD, PJ., 1985. Variation in natural killer activity in peripheral blood during the menstrual cycle. *Br Med J (Clin Res Ed)*. Mar 23;290(6472):884-6.
- SZEKERES-BARTHO J, CSERNUS, V., HADNAGY, J., PACSA, NAS., 1983. Influence of treatment with prostaglandin synthesis inhibitor or progesterone on cytotoxic activity and progesterone binding capacity of lymphocytes during pregnancy. *Prostaglandins*. Aug;26(2):187-95.
- TAYAMA, S., NAKAGAWA, Y., TAYAMA, K., 2008. Genotoxic effects of environmental estrogen-like compounds in CHO-K1 cells. *Mutat Res.* 2008 Jan 8;649(1-2):114-25. Epub Aug 19.
- TELES, M., PACHECO, M., SANTOS, MA., 2006. Biotransformation, stress and genotoxic effects of 17beta-estradiol in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Environ Int.* May;32(4):470-7. Epub 2006 Feb 17.
- TOPAKTAŞ, M., ve SPEIT, G., 1990. Sister Chromatid Exchange (SCE) Testinin Mutajenite ve Kanserojenitenin Belirlenmesinde Kullanılması. *Ç. Ü. Sağlık Bil. Der.*, 5 (1, 2, 3), 73-84.
- TRAVIS, R.C. and KEY, T.J. (2003). Oestrogen exposure and breast cancer risk, *Breast Cancer Res.* **5**; 239–247.
- TSUTSUI, T., BARRET, JC., 1997. Neoplastic transformation of cultured mammalian cells by estrogens and estrogenlike chemicals. *Environ Health Perspect.* Apr;105 Suppl 3:619-24.

- TSUTSUI, T., TAMURA, Y., YAGI, E., BARRET, JC., 2000. Involvement of genotoxic effects in the initiation of estrogen-induced cellular transformation: studies using Syrian hamster embryo cells treated with 17beta-estradiol and eight of its metabolites. *Int J Cancer*. Apr 1;86(1):8-14.
- TUCKER, J. D., AULETTA, A., CIMINO, M. C., DEARFIELD, K. L., JACOBSON-KRAM, D., TICE, R. R. and CARRANO, A. V., 1993. Sister-Chromatid Exchange: Second Report of the Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, 297:101-180.
- VAN BUUL, PP., GOUDZWAARD, JH., 1982. *Mutat Res*. Dec;106(2):247-53. Effect of follicle-stimulating hormone (FSH) on radiation-induced chromosomal aberrations in mouse germ cells and Chinese hamster cells in vitro.
- VARDAR, MA., ÇETIN, T., BURGUT, R., DEMIR, C., 1993. Klomifen sitrat veya HMG/HCG ile indüklenen siklularda luteal fazın değerlendirilmesi: Kısa luteal faz, luteal faz yetmezliği. *Kadın Doğum Dergisi*; 9(2): 127-131.
- VARES, G., ORY, K., LECTARD, B., LEVALOIS, C., ALTMeyer-MOREL, S., CHEVILLARD, S., LEBEAU, J., 2004. Progesterone prevents radiation-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene*. Jun 3;23(26):4603-13.
- WELCSH, P., 2009. *Cancer Genetics. The Role of Genetics in Breast and Reproductive Cancers*. Pp; 186. DOI 10.1007/978-1-4419-0477-5. ISBN 978-1-4419-0476-8. e-ISBN 978-1-4419-0477-5. Springer New York Dordrecht Heidelberg London Springer Science+Business Media, LLC.
- WHITE, D., JONES, DB., COOKE, T., KIRKHAM, N., 1982. Natural killer (NK) activity in peripheral blood lymphocytes of patients with benign and malignant breast disease. *Br J Cancer*. Oct;46(4):611-6.
- WHITEHEAD, SA., NUSSEY, S., 2001. *Endocrinology: an integrated approach*. Oxford: BIOS: Taylor & Francis. ISBN 1-85996-252-1. Chapter: 1, pp: 15. Webpage is below:
- YARED, E., MCMILLAN, TJ., MARTIN, FL., 2002. Genotoxic effects of oestrogens in breast cells detected by the micronucleus assay and the Comet assay. *Mutagenesis*. Jul;17(4):345-52.

YOVEL, G., SHAKHAR, K., BEN-ELIYAHU, S., 2001. The effects of sex, menstrual cycle, and oral contraceptives on the number and activity of natural killer cells. *Gynecol Oncol.* May;81(2):254-62.

ZAHID, M., SAEED, M., ALI, MF., ROGAN, EG., CAVALIERI, EL., 2010. N-acetylcysteine blocks formation of cancer-initiating estrogen-DNA adducts in cells. *Free Radic Biol Med.* 2010 Aug 1;49(3):392-400. Epub May 31.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Estradiol> (20.03.2012)

<http://www.ilacabak.com/prosp.php?Id=4814> (05.042012)



## ÖZGEÇMİŞ

17/09/1982 tarihinde Adana'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana'da tamamladı. 2000 yılında Adana bir Market'te çalışmaya başladı. 2001 yılında Adana Meslek Yüksekokulu İklimlendirme ve Soğutma Bölümü'nü okumaya hak kazandı. 2003 yılında buradaki eğitimini tamamladı. Aynı zamanda çalıştığı işyerinde kısmi zamanlı olarak çalışmaya devam etti.

2004 yılında Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nde okumaya hak kazandı. 2008 yılında buradaki eğitimini tamamladı ve aynı yıl aynı üniversitenin Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans öğrenimine başladı. Halen özel bir markette mağaza müdür yardımcısı olarak görev yapmaktadır.