



**SİGARA İÇEN KİŞİLERDE GENOTOKSİK HASARIN COMET YÖNTEMİYLE
BELİRLENMESİ**

Elif Gülşah KARAHAN

**Mayıs, 2014
DENİZLİ**

**SİGARA İÇEN KİŞİLERDE GENOTOKSİK HASARIN COMET YÖNTEMİYLE
BELİRLENMESİ**

**Pamukkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

Elif Gülşah KARAHAN

Danışman: Doç. Dr. Ayşe Gaye TOMATIR

**Mayıs, 2014
DENİZLİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

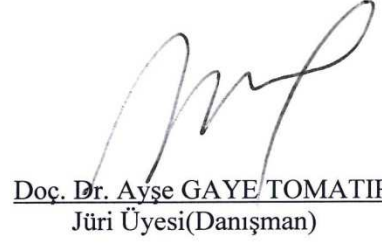
Elif Gülşah KARAHAN tarafından, Doç. Dr. Ayşe Gaye TOMATIR yönetiminde hazırlanan “**Sigara İçen Kişilerde Genotoksik Hasarın Comet Yöntemiyle Belirlenmesi**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hakan AKÇA
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Ferzan LERMİOĞLU ERCİYAS
Jüri Üyesi



Doç. Dr. Ayşe GAYE TOMATIR
Jüri Üyesi (Danışman)

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
ve 15.7.2016 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

12.12.15 tarih

Prof. Dr. Z. Melek BOR KÜÇÜKATAY
Müdür



TEŞEKKÜR

Bu tezin her aşamasında bilgi birikimi, deneyimleri ile bana yol gösteren, her zaman olumlu düşünceleri ve güler yüzüyle bana destek olan, değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ayşe Gaye TOMATIR'a, bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren değerli hocam Sayın Doç. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ' a, klinik bilgisini paylaşan Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Fatma EVYAPAN'a, laboratuvarlarının tüm imkanlarını ve kapılarını bana açan, önemli yol kat etmemi sağlayan Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı başkanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ferzan LERMİOĞLU ERCİYAS'a, bilgisini ve zamanını paylaşan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Cumhuriyet GÜNDÜZ'e, laboratuvarlarının imkanlarını sunan Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD öğretim üyesi Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE'ye ve Fizyoloji AD öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Vural KÜÇÜKATAY'a, Biyoistatistik AD başkanı değerli hocam Prof. Dr. Beyza AKDAĞ'a, çalışmamı destekleyen Tıbbi Genetik AD başkanı değerli hocam Prof. Dr. Gülseren BAĞCI'ya ve yüksek lisans eğitimim boyunca bana emeği geçen çok değerli tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın en başından beri bıkmadan usanmadan benimle birlikte olan, değerli vaktini ayıran, benimle birlikte emek veren, ter döken, sevgiyle bana destek olan arkadaşlarım Börte AĞRAP'a, Ayşen Buket ER'e, Esra MENFAATLI'ye, Mehmet Salih YIKILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yine desteğini esirgemeyen Dr. Onur KAYA'ya sevgili arkadaşlarım Esin ÖZCAN'a, Hande ŞENOL'a, Elvan ARSLAN'a, Yeliz COŞKUN'a, Seçkin GÜLAY ÇELEBİ ve Onat ÇELEBİ'ye çok teşekkür ederim. Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalındaki tüm arkadaşlarıma, tez çalışmama destek olan Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu' na ve değerli çalışanlarına, tez çalışmama katılan gönüllülere, kan alma ekibi çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca karşılıksız bir sevgiyle bana destek olan sevgili aileme, canım babam Ceyhan TÜRKECAN, canım annem Emine TÜRKECAN ve biricik kardeşim Reşide Gülhan TÜRKECAN'a, desteği ve sevgisiyle her zaman yanımda olan, sevgili eşim Can KARAHAAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza
Öğrenci Adı Soyadı
Elif Gülşah KARAHAN

ÖZET

SİĞARA İÇEN KİŞİLERDE GENOTOKSİK HASARIN COMET YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

Karahan, Elif Gülşah
Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Ayşe Gaye TOMATIR

Mayıs 2014, 60 Sayfa

Comet yöntemi, DNA hasarını ölçebilen, duyarlı, basit, hızlı ve yaygın bir tekniktir. Dünyada her yıl 4 milyon, günde ise 11 bin kişinin sigaraya bağlı hastalıklardan hayatını kaybettiği bilinmektedir. Son yıllarda, sigaraya bağlı birçok sorunun klinik seyri ile genotoksosite arasındaki kuvvetli ilişkiye değinilmektedir. Bu çalışmada genotoksik riskin tespitine yönelik; sigara içen ve sigara içmeyen gönüllülerin DNA hasarı bakımından karşılaştırılması amaçlandı.

Toplam 50 gönüllüden; sigara içen 30 gönüllü araştırma grubunu, sigara içmeyen 20 gönüllü ise kontrol grubunu oluşturdu. Gönüllülerden alınan periferik kan örneklerinde lenfositler *comet* yöntemiyle incelendi. DNA hasarı, görüntüleme analiz yöntemiyle kantitatif olarak değerlendirildi.

Sigara içen ve içmeyen her iki grubun periferik kan örneklerindeki lenfosit DNA hasarı *comet* yöntemi ile karşılaştırıldığında, sigara içenlerde; $12,75 \pm 7,14$ oranında, içmeyenlerde ise; $10,41 \pm 3,41$ oranında DNA hasar yüzdesi tespit edildi ($p>0.05$). Her iki grup yaş ve cinsiyet bakımından birbirlerine benzer bulundu ($p>0.05$). Sigara içen erkeklerde kadınlara göre daha fazla DNA hasarı saptandı. Yaş ile DNA hasarı arasında bir ilişki saptanmadı.

Sonuç olarak; sigara içen ve içmeyen gönüllülerde DNA hasarı bakımından anlamlı bir fark bulunmadı.

Anahtar Kelimeler: Comet assay, DNA Hasarı, Genotoksik risk, Sigara içimi

ABSTRACT

DETERMINATION OF GENOTOXIC DAMAGE BY COMET ASSAY IN SMOKERS

Karahan, Elif Gülşah
MSc Thesis, Medical Biology Department
Supervisor: Assoc. Prof. Ayşe Gaye TOMATIR

May 2014, 60 Pages

Comet assay is a sensitive, simple, quick and common technique which can detect DNA damage. It's worldwide known that every year 4 million, everyday 11 thousand people die from the diseases related to smoking. Recently, it's mentioned that clinical course of most diseases related with smoking have strong relationship with genotoxicity .In this study we aimed to compare DNA damage of smokers and non-smoker to determine genotoxic risk.

Our study group consists of totally 50 volunteers; 30 of them are smokers and 20 of them are non-smoker control group. Lymphocytes which were isolated from peripheral blood samples taken from volunteers are determined by Comet assay. DNA damage was evaluated quantitatively with image analysis method.

When comparing the lymphocytes of smokers and non-smokers with Comet assay, we determined the DNA damage percentage as $12,75 \pm 7,14$ in smokers, $10,41 \pm 3,41$ in non-smokers ($p>0.05$). There was no statistical difference in smokers' and non-smokers' ages and gender ($p>0.05$). We determined higher DNA damage in male smokers than female ones. There was no correlation between age and DNA damage.

As a result there was no significant difference between smokers and non-smokers in terms of DNA damage.

Keywords: Comet assay, DNA damage, Genotoxic risk, Smoking

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Teşekkür.....	ii
Bilimsel Etik Sayfası.....	iii
Özet.....	iv
Abstract.....	v
İçindekiler	vi
Şekiller Dizini.....	viii
Tablolar Dizini.....	x
Simge ve Kısaltmalar Dizini.....	xi
1.GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI.....	4
2.1. Tütün ve Nikotin Hakkında Genel Bilgiler4
2.2. Sigaranın Toksik Etkileri6
2.3. Genotoksik Etkiler9
2.4. Genotoksisite Analizleri9
2.4.1. Genotoksisite Testleri	10
2.4.1.1. Mikronukleus (MN) Testi	10
2.4.1.2. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD)	10
2.4.1.3. Kromozom Aberasyonları Testi	11
2.4.1.4.Ames Testi	11
2.5. Comet Yöntemi Uygulamaları	11
2.5.1 Comet Yöntemindeki Basamaklar.....	13
2.5.1.1 Hücresel materyalin hazırlanması.....	13
2.5.1.2 Mikroskop lamalarının hazırlığı.....	13
2.5.1.3 Lizis aşaması.....	14
2.5.1.4 DNA yapısının alkali ortamda açılması (Alkali unwinding).....	14
2.5.1.5 Elektroforez aşaması.....	14
2.5.1.6 Nötralizasyon	14

2.5.1.7 Boyama ve görüntüleme.....	15
2.5.1.8 Comet sayımı ve DNA hasar tespiti.....	15
2.5.2 Comet Yöntemi İle İlgili Diğer Uygulama Alanları.....	16
2.5.2.1 Klinik Araştırmalar.....	16
2.5.2.2 Biyolojik İzleme.....	16
2.5.2.3 Apoptoz Araştırmaları.....	17
2.5.2.4 Farklı Tiplerde DNA Hasarı Çalışmaları	17
2.5.2.5 DNA Onarım Araştırmaları.....	17
2.5.2.6 Genotoksisite Araştırmaları.....	17
2.6. Araştırmanın Genel Bilgiler Işığında Öngörüsü	18
3. MATERYAL VE METOT	19
3.1. Gönüllerin Niteliği ve Sayıları	19
3.2. Comet Yöntemi	20
3.2.1. Yöntemde Kullanılan Gereçler ve Markaları	20
3.2.2. Yöntemde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Markaları	21
3.2.3. Yöntemde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	21
3.2.4. Lenfositlerde Comet Yöntemi Uygulanışı	22
3.2.5. Comet Yönteminde Görüntü Analizi.....	25
3.3. Verilerin Değerlendirilmesi	26
4. BULGULAR	27
5. TARTIŞMA	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
7. KAYNAKLAR.....	50
EKLER	
Ek 1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Belgesi (Çalışma Grubu İçin).....	56
Ek 2. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Belgesi (Sağlıklı Kontrol Grubu İçin).....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Nicotiana tabacum bitkisi.....	5
Şekil 2.2 Nikotin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2.3 Comet yöntemi şeması.....	13
Şekil 2.4 Görsel Analizde Comet Kategoriler.....	16
Şekil 3.1 Lamaların elektroforez tankına yerleştirilmesi.....	24
Şekil 3.2 Elektroforez Aşaması.....	24
Şekil 3.3. CometScore 15, Tritex Corporation Analiz Programı.....	25
Şekil 3.4. Comet görüntüsü oluşturmamış DNA'ların mikroskopi görüntüsü ve analiz programı.....	25
Şekil 3.5. H ₂ O ₂ ile indüklenmiş DNA hasarının mikroskopi görüntüsü ve analiz programı.....	26
Şekil 4.1. Sigara içen erkek gönüllünün comet görüntüsü (H ₂ O ₂ 'siz).....	28
Şekil 4.2. Sigara içen erkek gönüllünün comet görüntüsü (H ₂ O ₂ 'li).....	28
Şekil 4.3. Sigara içmeyen erkek gönüllünün comet görüntüsü (H ₂ O ₂ 'siz).....	29
Şekil 4.4. Sigara içmeyen erkek gönüllünün comet görüntüsü (H ₂ O ₂ 'li).....	29
Şekil 4.5. Sigara içen kadın gönüllünün comet görüntüsü (H ₂ O ₂ 'siz).....	30
Şekil 4.6. Sigara içen kadın gönüllünün comet görüntüsü (H ₂ O ₂ 'li).....	30
Şekil 4.7. Sigara içmeyen kadın gönüllünün comet görüntüsü (H ₂ O ₂ 'siz).....	31
Şekil 4.8. Sigara içmeyen kadın gönüllünün comet görüntüsü (H ₂ O ₂ 'li).....	31
Şekil 4.9. Sigara içen ve içmeyen gönüllü gruplarında bazal (-H ₂ O ₂) ve H ₂ O ₂ ile indüklenmiş oksidatif DNA hasarının (+H ₂ O ₂) grafiksel gösterimi.....	33
Şekil 4.10. Sigara içenlerde bazal (-H ₂ O ₂) ve H ₂ O ₂ ile indüklenmiş oksidatif DNA hasarının (+H ₂ O ₂) grafiksel gösterimi.....	35
Şekil 4.11. Sigara içmeyenlerde bazal (-H ₂ O ₂) ve H ₂ O ₂ ile indüklenmiş oksidatif DNA hasarının (+H ₂ O ₂) grafiksel gösterimi.....	37
Şekil 4.12. Sigara içme süresi (yıl) ile kuyruktaki % DNA parametresi arasındaki korelasyon.....	38

Şekil 4.13. Bir günde içilen sigara sayısı ile kuyruktaki % DNA arasındaki korelasyon.....	39
Şekil 4.14. Gönüllülerin yaşları ile kuyruktaki % DNA arasındaki korelasyon.....	40

TABLolar DİZİNİ**Sayfa**

Tablo 3.1. Gönüllülerin özellikleri.....	19
Tablo 4.1. Gönüllülerin demografik özellikleri.....	27
Tablo 4.2Gönüllü gruplarının bazal ve H ₂ O ₂ ile indüklenmiş DNA hasarı sonuçları.....	32
Tablo 4.3. Sigara içen gönüllülerin bazal ve H ₂ O ₂ ile indüklenenmiş DNA hasarı sonuçları.....	34
Tablo 4.4. Sigara içmeyen gönüllülerin bazal ve H ₂ O ₂ ile indüklenmiş DNA hasarı sonuçları.....	36
Tablo 4.5.Sigara içme süresi ile kuyruktaki % DNA arasındaki korelasyon.....	38
Tablo 4.6. Bir günde içilen sigara sayısı ile kuyruktaki % DNA arasındaki korelasyon	39
Tablo 4.7. Tüm gönüllülerin yaşları ile kuyruktaki % DNA parametresi arasındaki korelasyon	40
Tablo 4.8. Sigara içen gönüllülerden elde edilen ham veriler	41
Tablo 4.9. Sigara içmeyen gönüllülerden elde edilen ham veriler	42

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
μ L	Mikrolitre
CO	Karbonmonoksit
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EKG	Elektrokardiyografi
GSH	Glutasyon
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
KKD	Kardeş kromatid değişimi
LDL	Low Density Lipoprotein
ml	Mililitre
MN	Mikronukleus
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NO	Nitrik oksid
NO ₂	Azot dioksit
O ₂	Oksijen
ORT	Ortalama
PAH	Poliaromatik hidrokarbonlar
PBS	Phosphate buffered saline
PMN	Polimorfonükleer
SCE	Sister cromatid Exchange
SCGE	Single cell gel electrophoresis
SR	Serbest radikal
SS	Standart sapma
Tris	Trizma base

VLDL	Very low density lipoprotein
WHO	Dünya sağlık örgütü
E	Erkek
K	Kadın
NE	Sigara içmeyen erkek
NK	Sigara içmeyen kadın
PE	Sigara içen erkek
PK	Sigara içen kadın

1. GİRİŞ

Dünyada her yıl 4 milyon insanın sigaradan hayatını kaybettiği ve gerekli önlemlerin alınmadığı takdirde bu sayının 20 yıl içinde 10 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Ayrıca, dünyada günde 11 bin kişinin sigaranın neden olduğu hastalıklardan öldüğü bilinmektedir (Ezzati 2003). Türkiye’de sigara içenlerin oranının hala endişe verici boyutlarda olduğu görülmektedir (Satman vd 2002). Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) yayımladığı “Küresel Sigara Salgını-2008” adlı raporunda ise, Türkiye’nin dünyada sigaranın en fazla içildiği 10 ülke arasına girdiği bildirilmektedir.

Sigara ve diğer tütün mamullerinin kanser, kardiyovasküler sistem ve solunum sistemi hastalıkları başta olmak üzere çok çeşitli sağlık sorunlarına yol açtığı veya bu sorunların ortaya çıkmasını kolaylaştırdığı, kişilerin bu maruziyeti sürdürmeleri halinde ise ortaya çıkan sağlık sorunlarını ağırlaştırmada rol oynadığı kanıtlanmıştır (Karlıkaya 2004, Kayaalp vd 2005, Vineis vd 2007, Giovino 2007, Barcala vd 2007). Sigara içme alışkanlığı, birçok ülkede ölüme sebebiyet veren hastalıklara yol açan en yaygın toksikolojik problem olarak kabul edilmektedir. Örneğin akciğer kanserinin sigara içenlerde içmeyenlere oranla daha fazla görülebildiği bilinmektedir (Phillips 2002, Ezzati2003, Karlıkaya 2004, Vineis vd 2007). Sigara içmenin sadece akciğer kanserine değil, aynı zamanda oral ve nazal boşluk, özofagus, gırtlak, yutak, pankreas, karaciğer, böbrek, mide, üriner sistem ve serviks kanserinde de rolü olduğu bildirilmiştir (Phillips 2004). Sigaranın sayılan birçok zararına ilave olarak, son yıllarda genotoksisiteye yol açması önemli tartışma konularından birisi olarak kabul edilmektedir. Özellikle sigaraya bağlı birçok sorunun oluşumu ve klinik seyri ile genotoksisite arasındaki kuvvetli ilişkiye değinilmektedir (Akbaş vd 2001, Karlıkaya 2004, Kayaalp vd 2005). Çevremizdeki çeşitli kimyasal maddeler, canlılardaki hücre DNA’sının yapısını bozarak

mutasyona bağılı karsinojen etkilere neden olmaktadır. Kimyasal ajanların ya da radyasyonun gamet veya somatik hücrelerdeki DNA üzerinde oluşturduğu kalıcı değişimlere mutasyonadı verilir. Genotoksisitenin yol açtığı makromutasyonlar (sayısal ve yapısal olarak) ve mikromutasyonlar (çerçeve kayması ve baz çifti değişimi) vardır(Brusick 1987, Debeleç-Bütüner ve Kantarcı 2006). Özellikle somatik hücrelerdeki mutasyonların kanser oluşumuna zemin hazırlayıcı rollerinin bulunması, genotoksisitenin klinik önemini artırmaktadır. Mutajenez mekanizmasının aydınlatılması ve mutajenlerin saptanması için çeşitli test sistemlerinin geliştirilmesi ve mutajenezin insanlar için oluşturduğu kalıtsal hastalık ve kanser riskinin azaltılması için yapılan çalışmalar toksikolojinin en önemli çalışma alanlarından birini oluşturmaktadır (Hedner vd 1983, Salonen 1993,Michalska vd 1999,Stephan 1999, Pluth 2000,Preston 2001, Sasikala vd 2003, Albers vd 2004, Vineis ve Husgafvel-Pursiainen2005, Rossner 2005, de la Chica 2005). Mutajenlerin ve karsinojenlerin saptanmasında geliştirilen Kardeş Kromatid Değişimi(KKD,*Sister Chromatid Exchange*, SCE), Kromozom aberasyonları, *Ames*Testi, Mikronukleus, *Comet*Yöntemi gibi testler kullanılmaktadır. İnsan kromozomlarını daha yakından tanıyabilme ve birbirinden kolayca ayırabilme çabaları sürdürülürken araştırmacılar tarafından *comety*öntemiyle, Deoksiribonukleikasit (DNA) hasarının bir göstergesi sayılan kuyruktaki % DNA ölçümü, DNA hasarını ve riskini doğru tarama olanağına kavuşmuştur (Brusick 1987, Debeleç - Bütüner ve Kantarcı 2006).

Genomik instabilite; genlerin DNA'nın hasarına yol açacak ajanlarla karşılaşması sonrasında kromozomal destabilizasyon, gen amplifikasyonları ve mutasyonların oluşmasına eğilim derecesini belirlemek için kullanılan bir tanımdır. Alkali *comety*öntemi ile genomik instabilite ölçülebilmektedir. Tek zincirde, ikili zincirde ve alkalilabil bölgelerde DNA hasarını çabuk ve kolay bir teknikle gösterebilmek mümkün olabilmektedir. Bu yöntem tek hücre seviyesinde DNA hasarı hakkında bilgi vermektedir.

Comet yöntemi, diğer adıyla tek hücre jel elektroforezi (*Single cell gel electrophoresis; SCGE*) DNA hasarını analiz etmek amacıyla kullanılan hızlı, basit, duyarlı ve yaygın kullanım alanına sahip bir tekniktir. Rydberg ve Johanson (1978) tarafından DNA sarmal kırıklarının ölçülmesi amacıyla kurulan, daha sonra Östling ve Johanson (1984) tarafından geliştirilen teknik nötral pH'daki lizis şartlarında uygulanarak DNA çift sarmal kırıklarını tayin etmede kullanılmıştır. Singh vd (1988)

tarafından protokolde birtakım değişiklikler yapılarak yöntem alkali liziskoşullarında uygulanmıştır. Singh ve arkadaşlarının *comet* yöntemi protokolü bugün küçük değişikliklerle dünya genelinde en yaygın kullanılan protokoldür. Yöntemin en önemli avantajlarından biri de çok çeşitli hücre tiplerinde çalışma olanağı sağlamasıdır (Preston 2001,Collins 2004, Zalata vd 2007).

Comet yönteminde hücreler izole edildikten sonra agaroz içine gömülerek mikroskopik lamalara yayılırlar. Lizis aşamasından sonra elektroforeze bırakılıp floresan boya ile boyanması suretiyle değerlendirilirler. *Comet* yöntemi ile DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde gözle değerlendirmenin yanısıra kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki % DNA en yaygın kullanılan parametrelerdir. Kuyruktaki % DNA' nin belirlenmesi ve sonuçların gözle değerlendirilmesi diğer parametrelere göre doz cevap ilişkisini daha iyi yansıtmaları sebebiyle tercih edilmektedir (Preston 2001,Zalata vd 2007, Collins 2004).

Bu bilgiler ışığında, sigara içen kişilerde oluşabilecek mutajenik etkinin araştırılması büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada söz konusu mutajenik riskin oluşup oluşmadığının tespitine yönelik olarak; son yıllarda geliştirilen ve DNA'daki çok küçük harabiyetlerin bile hassas biyogöstergesi olduğu kabul edilen ve kısa sürede yanıt alınan *Comet* yöntemi ile sigara içen kişilerin DNA hasarı bakımından değerlendirilmesi amaçlandı.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Tütün ve Nikotin Hakkında Genel Bilgiler

Tütün, *Solanaceae* familyasından *Nicotiana* cinsinden yaprakları sigarayapımında kullanılan bir yıllık otsu bitkidir. Tütün ilk kez 1492 yılında Amerika'nın keşfi ile Avrupa'ya getirilmiş ve oradan da tüm dünyaya yayılmıştır. Üretilen tütünün %90'ı sigara yapımında kullanılmaktadır. Sigara dumanı gaz ve partikül fazda toksik ya da kanserojen özellik gösteren 4000'den fazla molekül içermektedir (Yıldız 2000).

Ayrıca sigara dumanının bir dizi serbest radikal (SR) türevidiği gösterilmiştir. Özellikle nitrik oksid (NO) ve azot dioksit (NO₂) ile oksijen ve karbon merkezli radikaller gaz fazında, hidrokinon-kinon siklusu tarafından üretilen radikaller de katran fazında bulunur. Serbest radikaller organizmanın makromoleküllerine, özellikle lipid, protein ve Deoksiribonükleik asit (DNA) yapısına zarar verirler. SR'in DNA ile etkileşimi ile baz modifikasyonları ve fosfodiester bağlarının hidrolizi sonucu da DNA zincir kırıkları oluşur (Dinçer vd 2003).

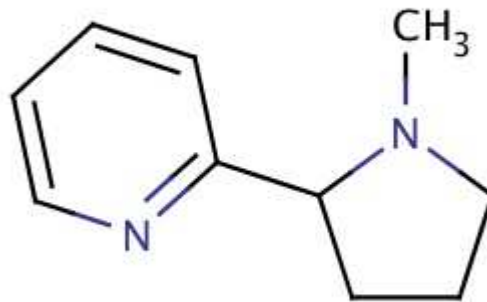
Sigara dumanı içinde en etkili olan moleküller nikotin, NO ve siyanürdür. Nikotin, *Nicotiana tabacum* bitkisinin (Şekil 2.1) tütün olarak bilinen kurutulmuş yapraklarında üretilen bir çeşit alkaloiddir. Sigara için kullanılan tütün % 0.5-3 oranında nikotin ihtiva eder. Kimyasal yapısı (Şekil 2.2); N- metil piroldin halkası ve piridin halkasından oluşur (Akıcı 2008).



Şekil 2.1 *Nicotiana tabacum* bitkisi

Nikotin zayıf bir bazdır ve pH'ya bağımlı olarak biyolojik membranları geçebilir ve alt solunum yolları ile akciğer alveollerinde absorbe edilir (Yıldız 2000).

Sigara içimi sonrası 5 dakika içinde kan plazma nikotin konsantrasyonu 15-30 ng/ml'ye ulaşır. Nikotin, etkilerini hedef hücreler üzerinde bulunan nikotinik tipteki asetilkolin reseptörlerini aktifleştirmek suretiyle gösterir. Nikotinik reseptörler nöromusküler kavşak, otonom gangliyonlar, adrenal medullanın kromafin hücreleri, santral sinir sistemi nöronları, duyuşal sinir uçlarında bulunmaktadır. Nikotin sinir uçlarını kendi reseptörlerini aktive ederek depolarize eder ve dopamin, serotonin, asetilkolin, gamma-amino butirik asit, glutamat, noradrenalin, opioid peptidlerin salımını artırır. Nikotin reseptörlerinin çeşitliliği ve nöromediatörler üzerine olan etkileri taşikardi, koroner vazokonstriksiyon, mide asit salgısının artması, barsak motilitesinin artması, iştahta azalma gibi sistemde farklı tablolarla gözlenir (Öztuna 2004).



Şekil 2.2 Nikotin kimyasal yapısı (Akıcı, 2008)

Dünyada 1.3 milyar kişi sigara içmektedir ve yılda 5 milyondan fazla insan sigara nedeniyle yaşamını kaybetmektedir. Sigara tüketiminde Avrupa ülkeleri arasında üçüncü, dünya ülkeleri arasında yedinci sırada yer alan ülkemizde 15 yaş ve üzeri erişkinlerin %31'i sigara kullanmakta ve sigaranın yılda 100-150 bin kişinin ölümüne neden olduğu tahmin edilmektedir. Günümüzde ise dünyadaki en önemli sağlık sorununun sigara kullanımı olduğu kabul edilmektedir. Şu andaki sigara içme düzeyinin böyle devam etmesi durumunda, içinde bulunduğumuz yüzyılda yaklaşık 1 milyar insanın sigara sebebiyle beklenenden erken dönemde öleceği tahmin edilmektedir. Eğer 2020 yılında tüm dünyada sigara prevalansı %5 oranında azaltılabilirse, sigaraya bağlı yaklaşık 100 milyon erken ölüm vakasının önlenebileceği düşünülmektedir (Demir 2008).

2.2. Sigaranın Toksik Etkileri

Sigaranın kanserojenik ve mutajenik etkileri, içinde barındırdığı, günümüzde sayısı 55'e kadar yükselmiş olan kanserojen maddeler sayesinde ortaya çıkmaktadır. Bunlar poliaromatik hidrokarbonlar (PAH), aza-arenler, nitrozaminler, aromatik aminler, aldehitler, organik ve inorganik bileşiklerdir. Bu maddeler özellikle PAH ve nitrozaminin metabolitleri DNA'ya kovalent bağlar ile bağlanmakta (guanin ve adenin baz bölgeleri) ve DNA'nın bu haline DNA-*adducts* denilmektedir. Böylece, DNA'nın başlangıç fazı dönüşümsüz olarak bölünmekte ve DNA'daki bu değişiklik ilerleme

fazına geçildiğinde *malign* fenotipe dönüşümün ilk basamağını oluşturmaktadır. DNA'ya bağlanan toksik bileşiklerin seviyesi, maruz kalınan biyolojik genotoksik etkenin dozu ile ilişkilidir. Sigara içenlerin oral kavite, akciğer, bronş ve diğer organların hücrelerinin DNA'da sigaranın meydana getirdiği bazı artık maddelere rastlanmış olması, bu sistem kanserlerinin oluş mekanizmalarını anlaşılmasında önemlidir (Öztuna 2004).

Sigara; hava yolları, mukosilyer temizleme mekanizmaları ve akciğer parankimine etkileri ile solunum sisteminde birçok patolojik durumun ortaya çıkmasına neden olur. Sigara, solunum sisteminde mukusun artmasına da yol açar. Bu olay, hem *siliar* fonksiyonu azaltarak mukusun atılamaması ile, hem de trakeobronşiyal salgı bezleri ve goblet hücrelerinin sayısının artırılarak mukus üretiminin fazlalaşmasıyla gerçekleşir. Sigara içmek, solunum yollarında inflamatuvar reaksiyonlara neden olur ve bu inflamatuvar olaylar da periferik solunum yolları obstrüksiyonuna yol açar. Sigara içmek solunum yollarında polimorfonükleer (PMN) lökosit ve monositlerin artışına sebep olur. PMN lökositlerin proteazlardan olan elastazı üretebilme yeteneği vardır. Elastaz, bağ dokusu bileşeni olan elastini parçalar. Sigara ayrıca, elastaz gibi proteolitik enzimleri inhibe eden α 1-Antitripsinin yapısında yer alan metiyonini metiyonin sülfokside okside ederek onu inaktif hale getirir. Sonuçta bir yandan elastaz üretimi artarken, diğer yandan inhibitörü olan α 1-Antitripsin inaktif hale getirilmiş olur. Böylece akciğer dokusunun elastolitik parçalanması sonucu amfizem gelişir. Sigara alt solunum yollarına fazla miktarda oksidanın ulaşmasına sebep olur. Sigara dumanında, kirli havadan onlarca kat fazla miktarda azot oksitler bulunur. Sigara, alt solunum yollarında nitrik oksit konsantrasyonunu artırarak, peroksinitrit ve peroksinitröz asit gibi oksidan maddelerin oluşumuna sebep olur. Sigara içen sağlıklı insanların ekspiryum havasında nitrik oksit seviyesinin azaldığı, sigarayı bıraktıktan sonra nitrik oksit seviyesinin arttığı bildirilmiştir (Yıldız 2000).

Sigaranın kardiovasküler sisteme etkisi nikotinin dozuna bağlıdır. Düşük dozlarda (0,05 mg/kg) bradikardi ve hipotansiyon parasempatik stimülasyona bağlı olarak gelişir. Fakat doz arttırılırsa (0,5 mg/kg) taşikardi ve kan basıncında yükselme görülür. Bu etki sempatik stimülasyon, adrenal medulla kromaffin hücrelerinin uyarılması, karotik ve aortik kemoreseptörlerin uyarılmasıyla vazomotor merkezin aktive olması, adrenerjik sinir uçlarından noradrenalin salınımının arttırılması ve kalpte parasempatik

blokajsonucu ortaya çıkar. Bu etkiler sinirsel vazokonstriksiyon gelişmesine neden olur. Kan basıncı artışı kalpte oksijen (O₂) kullanımını yükseltir, anaerobik glikoliz artışı ve laktik asit, EKG de miyokart infarktüsü belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olur. Ateroskleroz için yüksek risk faktörlerinden birini oluşturan sigara kullanımı, damar duvarı irritasyonu ve hasarına neden olur. Endotel irritasyonu nitrik oksit sentezini azaltırken endotelin salgılanmasında artışa yol açar. Endotel hasarı trombositlerin agregasyonu ve adezyonunu yükseltir ve plazma trigliserit, LDL, VLDL; ve total kolesterol miktarını artırır. Bu artışlar kalp frekansı artışıyla korelasyon gösterir. Kan lipit profilindeki değişiklikler sigarayla lipit peroksidasyonu ile okside-LDL miktarında artış, damar duvarındaki düz kaslarındaki Interlökin-1, etkilenecek ateroskleroz plak oluşumu hızlandırılır. Okside LDL ile antioksidan savunma dengesi bozulur, sonunda ateroskleroz gelişir. Aterosklerozun koroner arterlerde gelişmesi 10 yıl alırken beyin arterlerinde ve periferik arterlerde oluşması 20 yıl sürer. Ateroskleroz gelişmesinde Tromboksan-A₂ sentezindeki, trombosit agregasyonu ve adezyonunda artışın, plazmada adrenalin, ve noradrenalin artışının rolü büyüktür. Sigara, vücutta oksidan antioksidan dengesini bozar. Sigara kullananlarda plazma serotonin düzeyinin azaldığı ve angiotensin-I'in angiotensin-II'ye dönüşmesinin yavaşladığı görülür. Sigara dumanı solumakla pulmoner dolaşımda vazodilatör cevap oluşur, bu cevabın büyük bir kısmı (3/4) NO olmaması ve (1/4) karbonmonoksitten (CO) kaynaklanır. Tek bir sigaranın içilmesi kalp frekansını ortalama 8, ikinci sigara 9 sayı artırır. Bu artış kan plazma nikotin ve kotinin seviyesiyle korelasyon gösterir. Nikotinin nikotinik adrenerjik etkiyle perifer vazokonstriksiyon, ekstremitelerde uçlarındaki deri sıcaklığını azalttığı da bilinmektedir(Ergün 1997).

Sigaranın içinde oldukça toksik olan kadmiyum adı verilen kimyasal bulunur. Uzun süreli kadmiyum maruziyeti, bu metalin karaciğer ve böbrekte birikmesine neden olmaktadır. Kadmiyum uygulaması karaciğerde apoptozu indüklemektedir. Sigara dumanının uzun süreli inhalasyonu karaciğer dokusunu etkilemektedir. Ratlarda yapılan deneyler sonucunda sigaraya bağlı olarak hepatositlerde lipid tanecikleri, sinüzoidlerde genişleme ve düzensizlik meydana geldiği görülmüştür (Kaleli 2010).

2.3.Genotoksik Etkiler

Sigara dumanının kemirgenlerde, memeli hücre kültüründe ve *in vitro* DNA'da DNA zincirinin kırılmasını indüklediği birçok çalışmada gösterilmiştir. Sigara dumanı fare hücrelerinde TP53 proteinin birikimini arttırmış ve indirek DNA hasarına sebep olmuştur. Benzer birçok çalışma reaktif oksijen ve azotun zincir kırılmasında birincil sebep olduğunu göstermektedir (DeMarini 2004).

Reaktif oksijen türleri endojen oksijen metabolizması ve çeşitli ksenobiyotikler tarafından oluşturulmakta ve lipidler, proteinler, RNA ve DNA'nın oksidasyonunda hücre hasarına neden olmaktadır. DNA'da tanımlanmış pek çok oksidasyon ürünleri arasında, 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin(8-OHdG)oksidatif hasarının bir göstergesi olarak kullanılır. 8-OHdG tümörle ilgili genlerin dahil olduğu çeşitli genlerin mutasyonuna neden olur ve bu durum hassas yöntemlerle ölçülebilmektedir. Artmış 8-OHdGdüzeyi çeşitli karsinojenlere maruz kalmış hayvanların hedef organlarında, insan vetümör hücrelerinde bulunmuştur ve bu artış insanlarda çoğu tümörde görülmüştür. Araştırmalar, dejeneratif hastalıklı kişilerin lökositlerinde 8-OHdGdüzeyinin arttığını gösterir. Sigara kullanımı, insanlarda oksidatif DNA hasarını değiştirebilir. Sigaradaki çeşitli kimyasal bileşikler, inflamasyonu artırarak direkt veya indirekt yolla DNA hasarına sebep olabilen reaktif oksijen türlerini üretir. 2005 yılında Lodovici vd. tarafından yapılan bir çalışmada,lökositlerde 8-OHdGdüzeylerini incelenmiş, sigara kullanan ve kullanmayan fakat çevresel sigara dumanına maruz kalan pasif içicilerde oksidatif DNA hasarı olduğugösterilmiştir (Kaleli 2010).

2.4. Genotoksisite Analizleri

Genetik toksisite ya da genotoksisite, genotoksinlerin kromozom ve DNA yapısında meydana getirdiği hasarları kapsayan bir terimdir. Toksikolojinin bir alt dalı olan genetik toksikoloji bilimi, organizmanın normal biyolojik işleyişi sırasında veya fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkenlere bağlı olarak hücrelerin DNA 'da meydana gelen değişiklikleri inceleyen bir bilimdir ve çeşitli ajanların ortaya çıkardığı genetik hasarın değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir (Choy 2001, Young 2002, Mortelmans ve Rupa 2004, Vural 2005). Nukleus, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen DNA kırıkları, eklentileri, gen mutasyonları, kromozom anormalikleri, anöploidi ve klastojenite gibi hasarları kapsayan genel terime genotoksisite adı verilmiştir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).

Mutajenik ve genotoksik maddelerin karsinojenik potansiyellerini ölçmek amacıyla pek çok genotoksisite testleri geliştirilmiştir (Bedir vd 2004). Bu testler, çeşitli mekanizmalarla direkt yada dolaylı olarak genetik materyalde oluşmuş hasarları saptamak için geliştirilmiş *in vivo* ve *in vitro* testlerden oluşmaktadır. Mutajen maddelerin tanımı, insanda risk tayini ve bu maddelere maruziyetin önlenmesi genotoksisitenin amaçlarındandır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011). Genotoksisite testleri genomu etkileyen UV ve radyasyon gibi fiziksel etkilerin, sigara, pestisitler, gıda katkı maddeleri, parazitik enfeksiyonlar, ilaçlar, nanomateryaller gibi ajanların genotoksik ve karsinojenik potansiyellerinin tespitinde, bazı hastalıklar sonucu oluşan DNA hasar tespitinde, genetik hasarların hastalıklarla olan ilişkilerinin incelenmesinde, kansere duyarlılık tespiti ve takibinin yapılmasında biyolojik izleme testi olarak kullanılır (Choy 2001, Jena vd 2002, Mateuca vd 2006).

2.4.1. Genotoksisite testleri

Mikronukleus (MN) testi, Kardeş Kromatid Değişimi (KKD), Kromozom Aberasyonları Testi, Ames Testi, Comet Yöntemidir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011).

2.4.1.1. Mikronukleus (MN) testi

Mikronukleuslar mitotik iğde oluşan hatalardan, mitotik aygıtın diğer parçalarından ya da kinetokordan hücre döngüsünü kontrol eden genlerin eksikliğinden, kromozomal hatalardan kaynaklanan ve mitoz bölünme sırasında ortaya çıkan, kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. MN artışı kromozom düzensizliği ve genomik kararsızlıkların indirekt göstergesidir (Vanparys vd 1990, Demirel ve Zamani 2002).

2.4.1.2. Kardeş kromatid değişimi (KKD) (*Sister Chromatid Exchange, SCE*)

Kardeş Kromatid Değişimi testi, kromozom morfolojisi değişmeksizin, kardeş kromatidler arasında, özdeş segmentlerin simetrik genetik materyal alışverişi sonucu oluşan değişimlere neden olan mutajen bileşikleri saptamak için kullanılan bir testtir.

Bu test çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların genotoksik etkilerini araştırmakta kullanılmakla birlikte, kromozom instabilitesi ile seyreden *Bloom* Sendromu, *FankoniAplastik* Anemisi, *Duchenne* ve *Becker* tipi kas distrofileri gibi bazı hastalıklarda da araştırma ve tanı amaçlı olarak da kullanılmaktadır (Kontaş vd 2011).

2.4.1.3. Kromozom aberasyonları testi

Bu test, mutajenlerin indüklediği yapısal ve sayısal kromozom anormalliklerinin saptanmasında sıklıkla kullanılır. Hücre bölünmesi metafaz aşamasında durdurularak kromozomlarda ortaya çıkan farklılıklar tespit edilir (Savage 1993).

2.4.1.4. Ames testi

1972'de Dr. Bruce Ames tarafından geliştirilmiş olan ve kimyasal maddelerin mutajenik etkilerini belirlemek amacıyla tarama testi olarak uygulanan Ames testi, çok yaygın ve güvenilir bir biçimde kısa zamanlı bakteriyel test sistemi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tümör oluşumunda somatik hücrelerin tümör baskılayıcı genlerinde meydana gelen nokta mutasyonlarının saptanmasında kullanılır (Mortelmans ve Zeigler 2000, Choy 2001).

2.5. Comet Yöntemi Uygulamaları

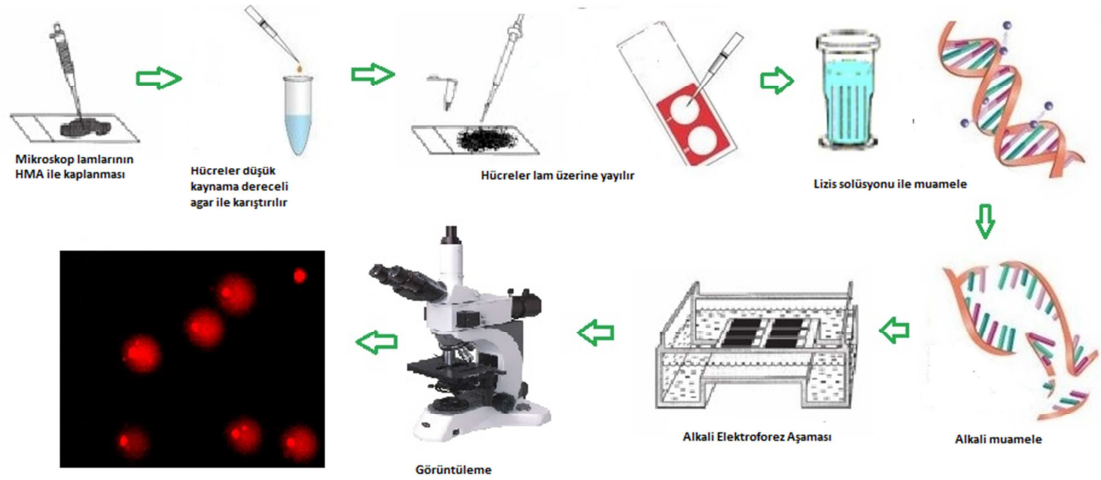
DNA, hasara duyarlılığı yüksek bir moleküldür. DNA hasarı kendiliğinden yada çevresel etkiler sebebiyle oluşmaktadır. Genetik bilginin doğru aktarımı için DNA yapısının korunması önemli olduğundan DNA hasarının onarılması için onarım mekanizmaları bulunmaktadır. Bu mekanizmaların kusurlu olması ya da yetersiz kaldığı durumlarda, DNA hasarı kısa dönemde replikasyon, transkripsiyon ve protein sentezinin inhibisyonuna, uzun vadede ise mutasyona ve kromozom anomalilerine sebep olmaktadır. DNA hasarı, ateroskleroz, diyabet, kanser gibi hastalıkların nedenleriyle ilgili çalışmalarda ve kemoterapi ve radyoterapinin etkinliğinin takibinde, kronik dejeneratif hastalıkların izlenmesinde, radyasyon aracılı ve xenobiyotik genotoksisitenin belirlenmesinde önemli bir belirteç olarak değerlendirmeye alınmaktadır. Bu nedenle DNA hasarının hassas olarak ölçülmesine yarayan teknikler oldukça önemlidir. "Comet Yöntemi" ya da diğer adıyla tek hücreli jel elektroforezi, hücre düzeyinde DNA hasarını saptamak, miktarını belirlemek amacıyla kullanılan hassas, hızlı ve *non-invaziv* bir yöntemdir (Dinçer ve Kankaya 2010).

Mikroskop lamı üzerinde agaroz jel içine gömülü hücrelerin hafif alkali ortamda bekletilmesi, DNA sarmalının kısmi açılması, akrinin turuncusu ile işaretlenmesi ve hasar düzeyinin yeşil floresansın (çift sarmal DNA'yı belirtir), kırmızı floresansa (tek sarmal DNA'yı belirtir) oranının fotometrik olarak ölçülmesi aşamaları çok sayıda

kritik basamak içerdiğinden günümüzde terk edilmiştir. Daha sonraki yıllarda, Östling ve Johanson mikro jel elektroforez tekniğini geliştirmişlerdir (Dinçer ve Kankaya 2010).

Bu teknikte, mikroskop lamı üzerine agaroz jel içine gömülü hücreler, yoğun deterjan ve tuz içerikli çözeltide bekletilerek lizis aşaması gerçekleştirilir ve membran parçalanır. Nötr pH ortamında elektroforez gerçekleştirilir. Sağlam DNA ve yüksek oranda zincir kırığı içeren DNA 'nın anoda doğru göçmesi arasındaki fark gözlenmiştir. Hasarlı DNA daha hızlı göç etmiştir. Lamaların etidyum bromür ile boyanması ve floresans mikroskobu ile floresans yoğunluğunun tespiti DNA göçünün miktarıyla ilgili bilgi vermiştir. Bu teknikte elektroforez aşamasının nötral koşulda uygulanmasıyla çifte sarmal kırıkları tespit edilmiş ancak tek sarmal kırıkları tespit edilememiştir (Dinçer ve Kankaya 2010).

1988 yılında Singh ve ark. elektroforezi yüksek alkali ortamda ($\text{pH} > 13$) uygulayarak bu soruna bir çözüm getirmişlerdir. Bugün uygulanan "*Comet* Yöntemi" Singh ve arkadaşları tarafından geliştirilen, çift ve tek sarmal kırıklarının tanımlanmasına olanak sağlayan metodolojidir (Şekil 2.3). *Comet* yöntemi son yıllarda, belirli DNA dizilerine spesifik işaretli probler kullanılarak floresan in situ hibridizasyon tekniği ile birleştirilmiş, FISH (fluorescent in situ hybridization) - *Comet* adını almış, dizi veya gen spesifik hasar belirlenmesinde kullanılan bir modifiye teknik haline gelmiştir (Shaposhnikov vd 2009).



Şekil 2.3 Comet yöntemi şeması (<http://www.amsbio.com/Comet-Assays.aspx>)

2.5.1 Comet Yöntemindeki Basamaklar

2.5.1.1 Hücresel materyalin hazırlanması:

Tam kan örnekleri (mononükleer hücre fraksiyonları, polimorf lökositler), kültüre edilmiş hücreler, primer insan fibroblastları, doku örnekleri, bitki hücreleri, funguslar, bakteriler, algler, deniz canlıları, böcekler materyal olarak kullanılabilir ve her birinin hazırlanması spesifiktir.

Tam kan örneklerinde, kan heparinize ortama alınır, düşük erime noktasına sahip agaroz jel ile karıştırılarak kullanılır. Lenfosit ve mononükleer hücrelerde hücre fraksiyonları histopak ile izole edilir. Çeşitli doku örnekleri ve fibroblastlar tripsin - EDTA kullanılarak proteinler uzaklaştırılır. Bu ön işlemlerle hücreler serbestleşir ve ön kaplama yapılmış lamaların üzerine yayılır (Green 1996).

2.5.1.2 Mikroskop lamalarının hazırlığı:

Jelin tüm deneme boyunca mikroskop lamının üzerinde kalabilmesi, bozulmaması ve net görüntü verebilmesi çok önemlidir. Deneme yapılmadan bir gün önce normal yada yüksek erime noktalı agaroz jel hazırlanır ve lamaların üzerine yayılır. Lamaların kuruması için bir gece beklenir. Deneme yapılacağı gün düşük erime noktalı agaroz ile hücre süspansiyonu karıştırılarak, kaplanmış lamaların üzerine yayılır. Bu sayede hücreler iki agaroz jel içine gömülmüş olur (Green 1996).

DNA hasar tespitinde, pozitif kontrol gerçekleştirebilmek amacıyla, UV ışınları, hidrojen peroksit (H₂O₂), iyonize radyasyon, ksantin/ksantin oksidaz gibi radikal oluşturan ajanlar kullanılır.

2.5.1.3 Lizis aşaması:

Lamların üzerindeki jel donduktan sonra, tuz ve deterjan içeren lizis çözeltisinde bekletilir. Kan ve doku örnekleriyle çalışılıyor ise mevcut eritrositlerin parçalanması ile açığa çıkan demire bağlı serbest radikal aracılı DNA hasarını önlemek amacıyla % 10 oranında dimetil sülfoksit eklenmiş lizis çözeltisi hazırlanır. Lizis aşamasında membran parçalanır, hücre içeriği nukleustan uzaklaştırılır. DNA az miktarda nonhiston proteinlerle birlikte süperkoil yapısında kalmıştır. Lamlar uygun bir tamponla ya da saf suyla yıkanarak deterjan, tuz ve hücre artıklarından uzaklaştırılır (Green 1996).

2.5.1.4 DNA yapısının alkali ortamda açılması (Alkali *unwinding*):

DNA yapısının açılması amacıyla yüksek alkali içerikli elektroforez tamponunda inkübe edilir. Çift sarmal DNA, zincir kırıklarının bulunduğu noktalardan açılmaya başlar. İşlem süresi genelde 20 dk. olarak uygulanır, çalışmaya göre değişebilir (Collins vd 2004).

2.5.1.5 Elektroforez aşaması:

Jel içinde oluşan tek zincir DNA alkali ortamda elektrofoze tabi tutulur ve *comet* oluşumu sağlanır. Elektrik akımı uygulandığında, anoda doğru yürüyen DNA parçaları kuyruklu yıldız görüntüsü verir. Bu kuyruklu yıldız görüntüsü, yönteme '*comet*' adını vermiştir. Hasarsız DNA kuyruğu olmayan *spot* bir görüntüdedir. Elektroforez 300mA akımda 20 □ 25 dakika süreyle, elektroforezin uygulandığı tankın büyüklüğüne göre (1V/cm) (genellikle 25 V) voltaj ile gerçekleştirilir (McKelvey vd 1993).

2.5.1.6 Nötralizasyon:

Elektroforez aşamasından sonra jel pH'sının nötralizasyonu, pH 7.5 olan uygun bir tampon çözeltiyle gerçekleştirilir. Çözelti içinde lamların kaç dakika bekletileceği çalışmaya göre değişebilir. Görüntüleme işlemi öncesi ne kadar bekletilmesi gerekiyorsa depolanmada stabilizasyonu sağlamak için uygun pH formalin veya metanol kullanılabilir.

2.5.1.7 Boyama ve görüntüleme:

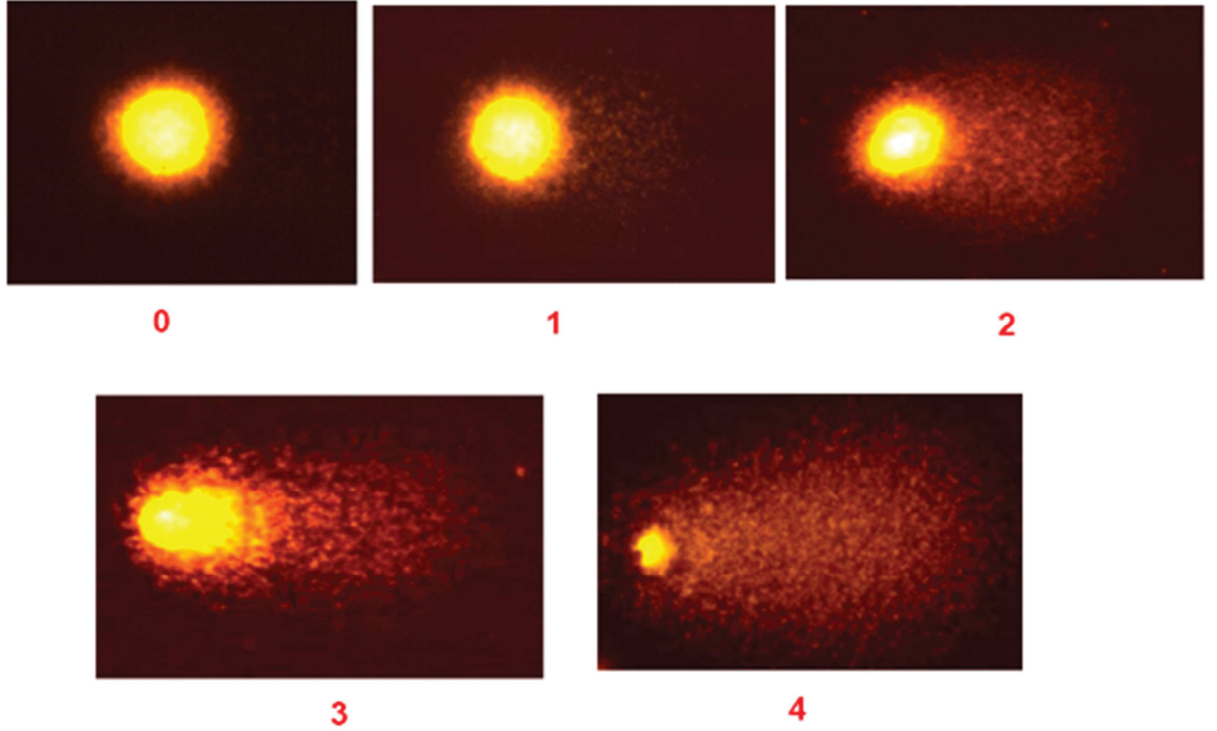
Comet görüntülenmesi için DNA'ya spesifik boyalar, mikroskopta uygun büyütme denemeyi yapan kişiye göre değişebilir. İşaretleme amacıyla genellikle etidyum bromür (floresan boya olarak) veya gümüş nitrat (non- floresan olarak) kullanılmaktadır.

2.5.1.8 *Comet* sayımı ve DNA hasar tespiti:

Mikroskobik değerlendirme işlemi, sonuç güvenilirliği amacıyla aynı kişi tarafından yapılmalıdır. Görsel analiz ve bilgisayarlı görüntü analizi yolları izlenebilir.

Bilgisayarlı görüntüleme analizinde dijital kamera bağlantısı ile otomatik olarak *comet* görüntüleri analiz edilir. Bu amaçla pek çok şirketin geliştirdiği yazılımlar kullanılır. Programlar *comet* başını kuyruktan ayırt edebilir, kuyruk uzunluğu, kuyruktaki % DNA, baştaki % DNA, kuyruk momenti gibi parametreleri belirleyebilir. Bu parametreler DNA zincir kırığı sıklığı ile orantılıdır (McKelvey vd 1993, Green vd 1996, Collins 2004).

Görsel olarak analiz işleminde *comet*, DNA göç uzunluğuna göre beş kategoride sınıflandırılır ve insan gözü bunu kolaylıkla ayırt edebilir. Parlak *spot* görünümli DNA kuyruk görüntüsü vermemiştir ve 0 kategorisindedir. Çok küçük başlı *comet*ler ve uzun dağınık kuyruklar 4. kategoridedir. 0 ve 4. kategoriler arasında kalan *comet*ler 1, 2, 3 olarak nitelendirilir (Şekil 2.4) Her kategoride olan *comet* sayısı belirlenir ve özel formüller ile DNA hasarı ortaya çıkar.



Şekil 2.4 Görsel Analizde *Comet* Kategorileri (Dinçer ve Kankaya 2010)

2.5.2 *Comet* Yöntemi İle İlgili Diğer Uygulama Alanları

2.5.2.1 Klinik araştırmalar

Çeşitli hastalıkların patojenik mekanizmalarının aydınlatılması, bazı kalıtsal hastalıkların prenatal tanısı, kansere duyarlılığın belirlenmesi, kanser tedavisinin takibi, diabetes mellitus, katarakt, romatoid artrit - sistemik lupus eritematozus, polikistik over sendromu, Alzheimer gibi hastalıklarda artan DNA hasarının gösterilmesi, postmenopozal kadınlarda hormon replasman tedavisinin, sigara içenlerde sigaranın DNA üzerine etkilerinin araştırılması *Comet* yöntemiyle gerçekleştirilmiştir (Dinçer ve Kankaya 2010).

2.5.2.2 Biyolojik izleme

Sperm kalitesinin belirlenmesi, kemoterapi, ozon ve hipoksi etkilerinin değerlendirilmesi, çevresel değişikliklerin canlı sistemde etkisinin incelenmesi, yaşlanma, beslenme, egzersiz gibi süreçlerin izlenmesi *comet* yöntemi ile gerçekleştirilebilir çünkü ucuzdur, hızlıdır, kolaydır ve 10 - 20 mikrolitre kan örneğiyle uygulanabilen non - invaziv bir teknolojidir (Dinçer ve Kankaya 2010) (Herrera vd 2009).

2.5.2.3 Apoptoz araştırmaları

Apoptoz yada nekroz aracılı sitotoksisite nedeni ile oluşan DNA kırıkları elektroforez aşamasında DNA göçünün hızını arttırır. Çift sarmal DNA zincir kırıkları oluşmuştur. Nekrotik ve apoptotik hücreler alkali yada nötral elektroforez ile belirlenebilir. Bazı araştırmalarda *comet* yöntemi ile bu iki tip hücrenin ayrılabilceği sonucuna varılmıştır. Apoptotik hücreler küçük baş ve yelpaze görünümlü kuyruğa sahip *cometler* oluştururken; nekrotik hücreler geniş baş ve farklı uzunluklarda dar kuyruklu *cometler* oluşturmuştur (Marks 1991, Elia 1994, Olive 1993, Vasquez 1997).

2.5.2.4 Farklı tiplerde DNA hasarı çalışmaları

Bazı araştırmalarda, hasara spesifik DNA onarım enzimleri kullanılmış, çeşitli baz modifikasyonlarının sıklığı belirlenmiştir. Örnek olarak, okside olmuş primidin sıklığı endonukleaz III enzimi kullanılarak, 8-OHdG hasarının sıklığı formamidoprimidin DNA glikozilaz kullanılarak gösterilmiştir (Gedik 1992, Collins vd 1993).

2.5.2.5 DNAonarım araştırmaları:

Doğal olarak oluşan DNA zincir kırıklarının yanında kesip-çıkarma onarımı sırasında da oluşan geçici zincir kırıkları da elektroforezde göçü arttırır. Spesifik bir endonukleaz hasara yakın bölgede DNA sarmalını keser ve zincir kırığı oluşur. Deoksiribonukleozit trifosfatlar ilave edilip uygun sıcaklıkta inkübe edilir ise kırık uçlar bağlanır ve onarım gerçekteşir. *Comet* yöntemi hasar oluşturan madde ile muameleden sonra DNA onarım aktivitesinin belirlenmesinde kullanılır (Collins vd 1993).

2.5.2.6 Genotoksisite Araştırmaları:

Genotoksisite, DNA zincir kırıkları ile karakterizedir. *In vitro* ve *in vivo* genetik toksikoloji alanında *comet* yöntemi önemli bir yere sahiptir. Bu alanda kullanılan diğer tekniklerle karşılaştırıldığında avantajları fazladır. Biyopsi örneklerinde, deney hayvanlarının her bir doku örneğinde, oldukça az miktarda hücre ile çalışmaya olanak sağlar. Prosedür bir kaç saatte tamamlanır ve hemen o gün değerlendirilebilir. Tanımlanmış mutagenik ve genotoksik ajanların farklı hücre tipleri ve farklı dokulardaki aktiviteleri (hücreye özel metabolik aktivasyon, *in vitro* DNA onarımı,

toksikokinetikler ve maddenin vucuda farklı yoldan verilmesiyle doz-toksik yanıt ilişkisi) *comet* yöntemi ile belirlenebilir (McKelvey vd 1993).

2.6. Araştırmanın Genel Bilgiler Işığında Öngörüsü

Sigaranın genotoksik etkisinin ileride karsinojenik etkilere dönüşme riski, konunun klinik önemini artırmakta ve rutinde kullanılabilecek hassas bir biyogöstergeyle kanserojen etkinin tespitine yönelik araştırmalar sürmektedir. Bu çalışmada söz konusu genotoksik riskin oluşup oluşmadığının tespitine yönelik olarak; son yıllarda geliştirilen ve DNA'daki çok küçük harabiyetlerin bile hassas biyogöstergesi olduğu kabul edilen ve kısa sürede yanıt alınan *comet* inceleme tekniği ile sigara içen kişilerin bazal DNA hasarı ve H₂O₂ ile indüklenmiş DNA hasarı bakımından değerlendirilmesi amaçlandı.

3. MATERYAL VE METOT

Pamukkale Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 8.11.2013 tarihli 44573 sayılı yazısıyla onaylanan araştırma, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2012-SBE-010 no' lu proje kapsamında desteklendi.

Çalışmayla ilgili olarak gönüllülere imzalatılan "Pamukkale Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Belgesi" örnekleri Ek 1. ve Ek 2.' de verildi.

Ailesinde herhangi bir kalıtsal hastalığı bulunanlar araştırmaya alınmadı.

3.1. Gönüllerin Niteliği ve Sayıları

Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran ve araştırmaya katılmayı kabul eden gönüllülerin gruplandırması aşağıdaki şekildedir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 Gönüllülerin özellikleri

		Sigara İçenler	Sigara İçmeyenler	P
Gönüllü Sayısı	N	30	20	
Cinsiyet	Kadın	15	13	p=0,295
	Erkek	15	7	
Yaş	Ort ± SS (min-maks)	30,57 ± 5,87 (21-45)	29,2 ± 5,3 (22-44)	p=0,406
	Günde İçilen Sigara Sayısı	(Ort ± SS) (min-maks)	17,67 ± 7,63 (10-40)	
Kullanım Yılı	(Ort ± SS)	11,72 ± 7,26		
	(min-maks)	(1-35)		

Sigara içen gönüllüler: Bilinen herhangi bir kronik hastalığı bulunmayan ve halen herhangi bir ilaç kullanmayan, günde en az 10 adet sigara içen, 20 yaş ve üstündeki, 15 kadın ve 15 erkek gönüllü olmak üzere toplam 30 kişi.

Sigara içmeyen gönüllüler: Yaşadığı evde sigara içen kişi olmayan, bilinen herhangi bir kronik hastalığı bulunmayan ve halen herhangi bir ilaç kullanmayan, 20 yaş ve üstündeki, 13 kadın ve 7 erkek gönüllü olmak üzere toplam 20 kişi.

3.2. Comet Yöntemi

3.2.1. Yöntemde Kullanılan Gereçler ve Markaları

Comet yöntemi için elektroforez tankı	Cleaver Scientific, CLS- COM20 model, İngiltere
Dijital üstten kefeli terazi	Sartorius CP2245, Almanya
Elektroforez güç kaynağı	Biorad Power Pac300, Singapur
Elektroforez tankı İçin Chiller Sistem	WITEG, Wise Circu Fuzzy Control System, Almanya
Falkon tüp	AXYGEN, ABD
Flouresan Mikroskop	BAB Görüntü İşleme ve Analiz Sistemi, Türkiye
Heparinli Tüp	LP ITALIANA, İtalya
Lam	Isotherm Microscope Slider
Lamel (24 x 60 mm)	Deckgläser / CITOGLAS, Almanya
Manyetik karıştırıcı	Torrey PINES SCIENTIFIC, ABD
Mikrodalga fırın	Arçelik M0300, Türkiye
Otomatik pipetler	AXYGEN, ABD
pH metre	HANNA HI221-02, Mauritius
Soğutmalı santrifüj	SIGMA WCR-P6 4K15C model, ABD

3.2.2. Yöntemde Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Markaları

Agaroz (yüksek ve düşük erime noktalı)	Lonza, Sea Plaque ® Agarose, İsviçre
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Fischer BioReagents ®, ABD
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	Fischer BioReagents ®, ABD
Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	İron Kimya, Türkiye
Hidroklorik asit (HCl)	Merck, Almanya
Histopak-1077	Sigma Aldrich ® , ABD
Metanol	Sigma Aldrich, ABD
Phosphate buffered saline (PBS)	Lonza, İsviçre
Sodyum hidroksit (NaOH)	Sigma ® Aldrich, ABD
Sodyum klorür (NaCl)	Merck, Almanya
Triton X- 100	Fischer Chemicals ®, ABD
Trizma base (Tris)	Fischer BioReagents ®, ABD

3.2.3. Yöntemde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

5 M NaOH çözeltisi

200 g NaOH distile suyla 1000 mL'ye tamamlandı.

0.5 M EDTA çözeltisi

73.05 g EDTA distile suyla 500 mL'ye tamamlandı.

Stok 100 µg/ml Etidyum Bromür Çözeltisi

10 mg boya 50 mL distile suda çözüldü. Boyama sırasında stok 1:10 oranında seyreltilerek kullanıldı.

Stok Lizis Çözeltisi

2.5 M NaCl 146.1 g

100 mM EDTA 37.2 g

10 mM Tris 1.2 g

Distile su 900 mL

Çözeltinin pH'ı 10'a ayarlandı. Hazırlanan stok lizis çözeltisi buzdolabında saklandı. Kullanmadan önce her 100 mL çözelti için 1 mL Triton X ve 10 mL DMSO ilave edildi.

Elektroforez Tamponu

0.3 M NaOH 60 mL

1 mM EDTA 2 mL

Distile su 938 ml

Nötralizasyon Tamponu

0.4 M Tris 48.5 g

Distile su 1000 mL

Çözeltinin pH'sı konsantre HCl ile pH 7.5'e ayarlandı.

Düşük kaynama dereceli agaroz (LMA) (%1)

Distile su içinde hazırlandı.

Yüksek kaynama dereceli agaroz (HMA) (%1.8)

Distile su içinde hazırlandı.

3.2.4. Lenfositlerde *Comet* Yöntemi Uygulanışı

Lenfosit hücrelerinde DNA hasarını belirlemek için alkali *comet* yöntemi(Singh vd 1988) kullanıldı.

Deney yapılacağı günden bir gün önce lamlar % 1,8'lik HMA çözeltisine daldırıldı ve bir tarafı silinerek düz bir zemine yerleştirildi. İşlem süresince agarozun donmaması için kap 40°C'lik su banyosunda tutuldu.

Deney günü ilk olarak %1'lik LMA çözeltisi hazırlandı ve 37.5°C'lik su banyosuna konuldu. Ardından liziz ve elektroforez çözeltileri hazırlanarak soğumaları için buzdolabına bırakıldı.

3 mL kan 3mL histopaque solüsyonu üzerine yavaşça eklendi. +4°C'de 2100 rpm'de, 30 dakika santrifüj edildi.

Lenfosit tabakası alınarak PBS ile yıkandı.

Bu süspansiyondan alınan 60 µL lenfosit ve 180 µL LMA ayrı bir ependorf tüp içerisinde karıştırıldı ve karışımdan 40 µL alınarak lamlara damlatıldı.

Her gönüllünün kan örneği için 4 lam çalışıldı. Lamlardan ikisi bazal DNA hasarının incelemesi için, buna paralel olarak diğer ikisi H₂O₂ ile indüklenmiş DNA hasarının incelenmesi için hazırlandı.

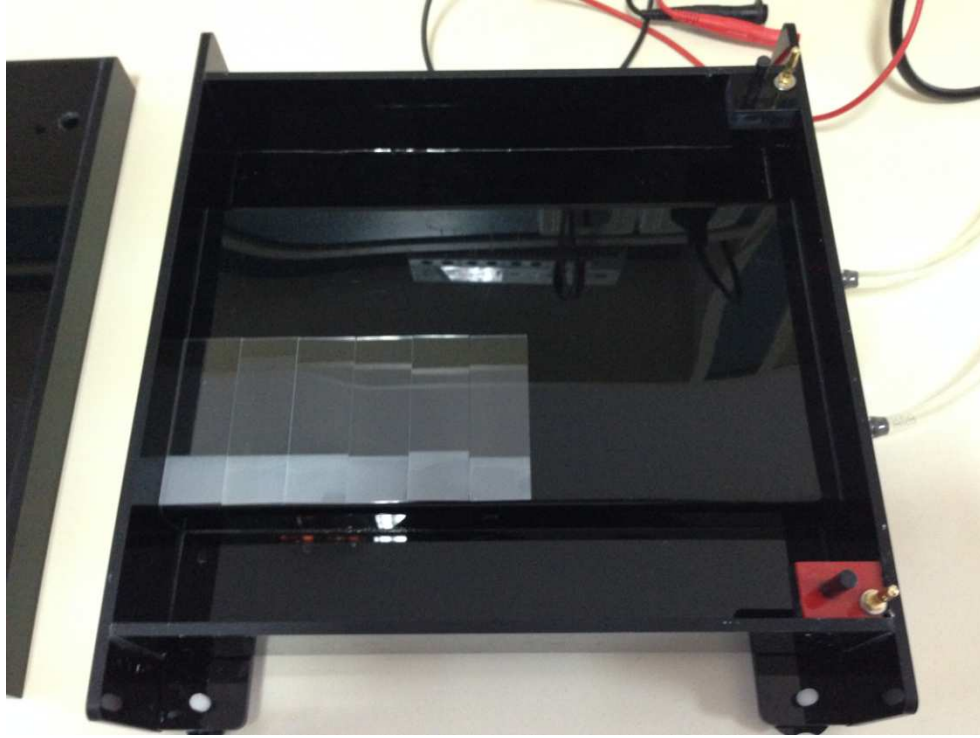
Lamlara yayılan hücrelerin düzgün dağılması amacıyla üzerlerine lamel kapatıldı. Agarozun katılaşması için lamlar 40 dakika buzdolabında bekletildi; süre sonunda lameller yavaşça çıkarıldı.

Pozitif kontrol olarak H₂O₂ kullanıldı. Çalışılan her dört lamdan ikisi 100 µM H₂O₂ ile 5 dk muamele edildi ve distile suyla yıkandı.

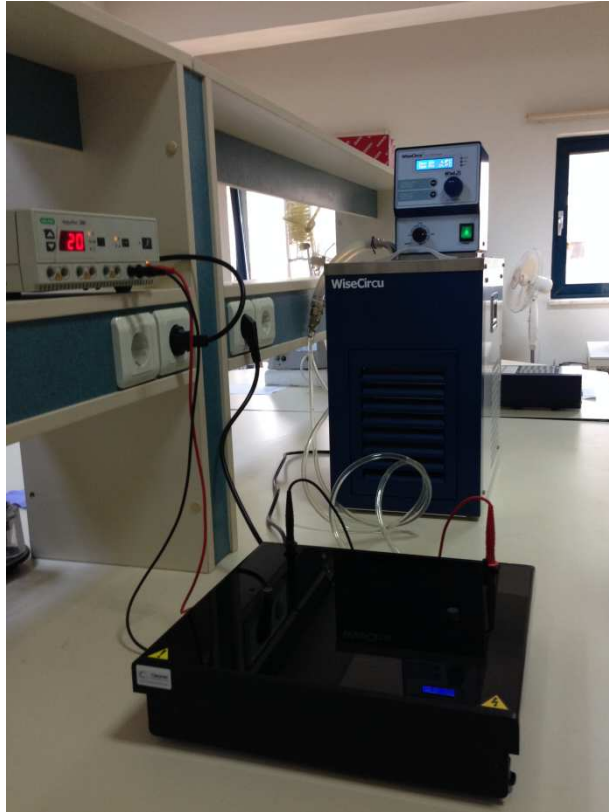
Lizis çözeltilisine alınan lamlar 1 saat 15 dakika boyunca buzdolabında bekletildi.

Lizis çözeltilisinden çıkarılan lamlar distile suyla yıkayıp elektroforez tankına yerleştirildi. (Şekil 3.1) Tanka elektroforez çözeltilisi eklendikten sonra lamlar 20 dakika akım uygulamadan bekletildi. Ardından uygun akım (1V/cm, 300mA) ayarlandı ve 20 dakika, 4°C ' de elektroforez aşaması gerçekleştirildi (Şekil 3.2).

Elektroforez tankından alınan lamlar distile su ile yıkandı ve nötralizasyon çözeltilisinde 15 dakika bekletildi. Nötralizasyonun ardından lamlar -20⁰C'lik metanole 5 dakika daldırıldı. Metanolden çıkarılan lamlar düz bir zemine koyularak kurutuldu Görüntüleme öncesi lamlar etidyum bromür (45 µL) ile boyandı.



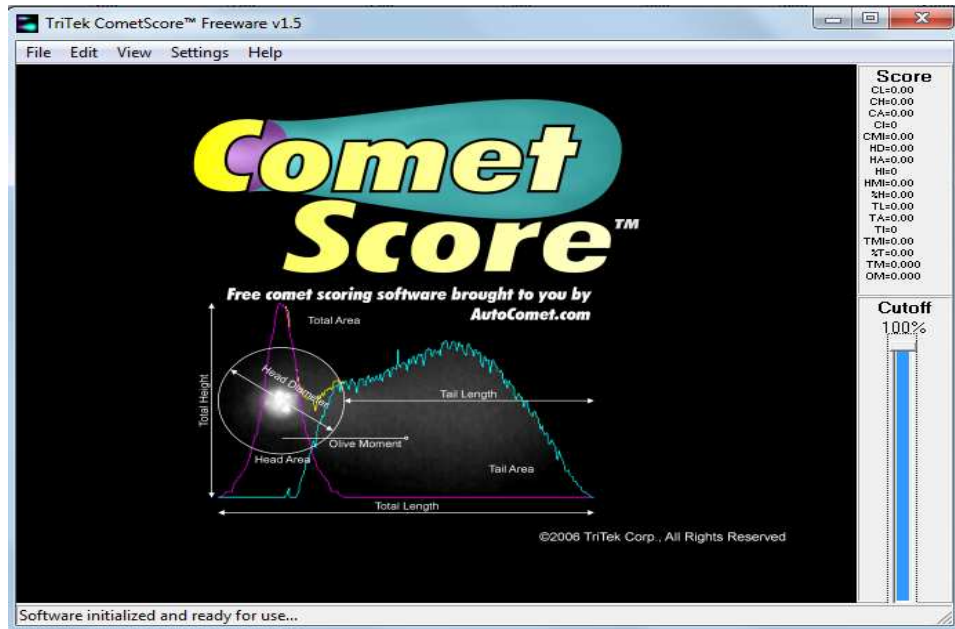
Şekil 3.1 Lamaların elektroforez tankına yerleştirilmesi



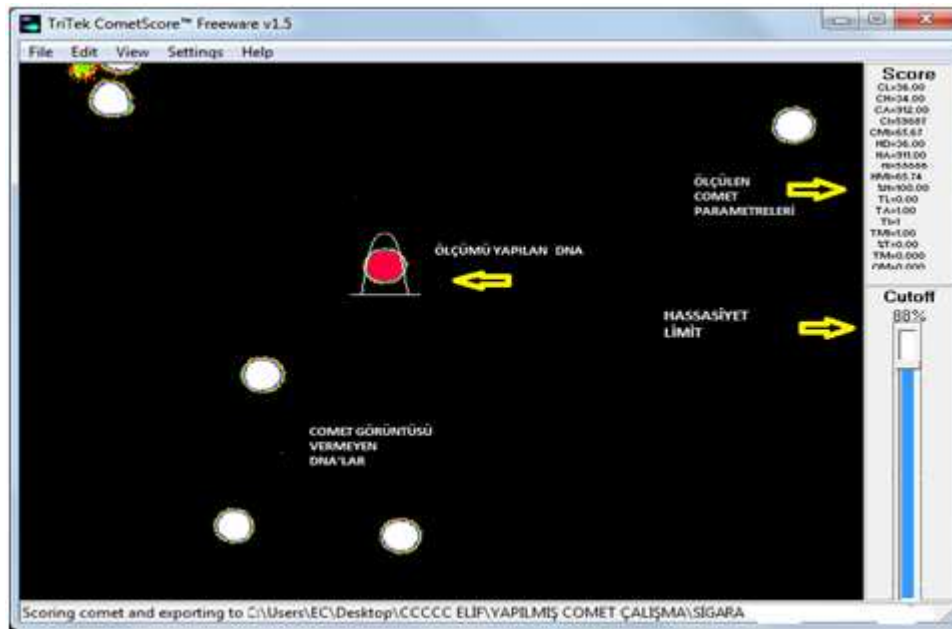
Şekil 3.2 Elektroforez aşaması

3.2.5. Comet Yönteminde Görüntü Analizi

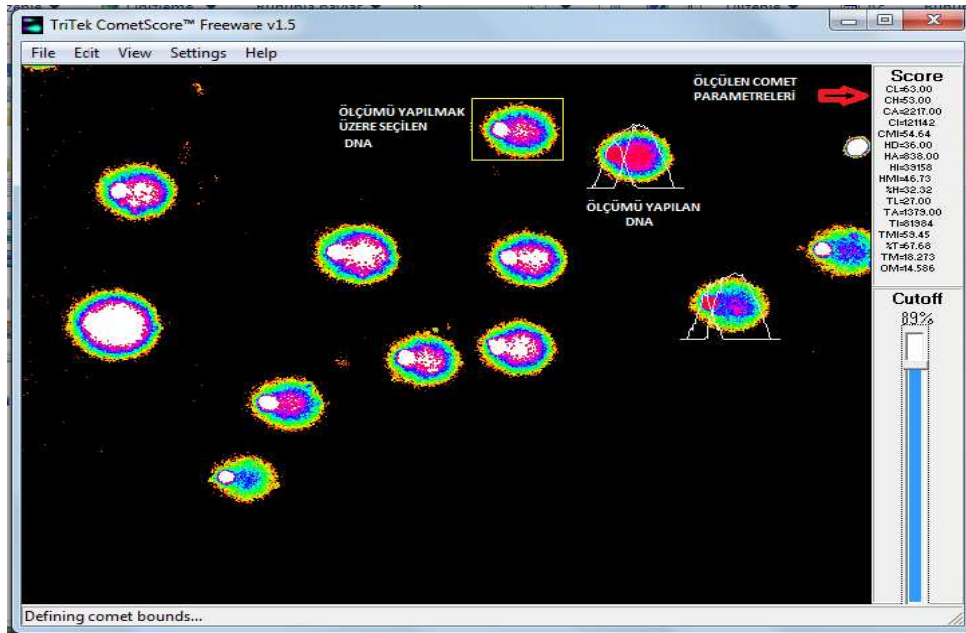
Hazırlanan preparatlar, BAB Görüntü İşleme ve Analiz Sistemi kullanılarak incelendi ve fotoğrafları çekildi Değerlendirilmelerinde *CometScore 15*, *Tritek Corporation* görüntü analiz programı kullanıldı (Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5).



Şekil 3.3 CometScore 15, TriTek Corporation Analiz Programı



Şekil 3.4 Comet görüntüsü oluşturmamış DNA'ların mikroskopi görüntüsü ve analiz programı



Şekil 3.5H₂O₂ ile indüklenmiş DNA hasarının mikroskopi görüntüsü ve analiz programı

3.3. Verilerin Değerlendirilmesi

Veriler SPSS paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler, ortalama \pm standart sapma, medyan, minimum-maksimum değerlerle, niteliksel değişkenler ise sayı (yüzde) şeklinde ifade edildi. Bağımsız grup karşılaştırmalarında, parametrik test varsayımları sağlandığında İki Ortalama Arasındaki Farkın Önemlilik Testi; parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise *Mann-Whitney U* testi kullanıldı. Bağımlı grup karşılaştırmalarında ise parametrik test varsayımları sağlandığında İki Eş Arasındaki Farkın Önemlilik Testi; parametrik test varsayımları sağlanmadığında *Wilcoxon* Eşleştirilmiş İki Örnek Testi kullanıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu *Shapiro-Wilk* testi ile araştırıldı. Niteliksel değişkenlerin karşılaştırılmasında ise Ki-kare analizi kullanıldı. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi. Değişkenler arası ilişkiyi incelemek için ise *Spearman* korelasyon analizi kullanıldı.

4. BULGULAR

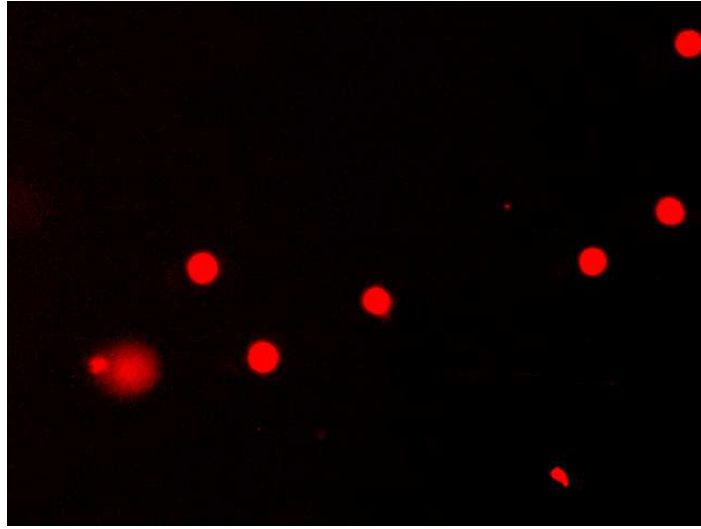
Çalışmaya katılan gönüllülerin demografik özellikleri Tablo 4.1' de verildi. Gruplar arasında yaş ve cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4.1 Gönüllülerin demografik özellikleri

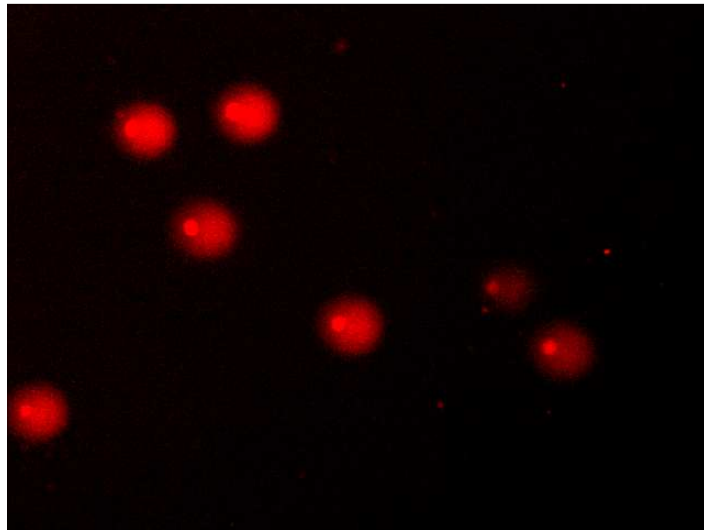
		Sigara İçmeyenler n=20	Sigara İçenler n=30	
Cinsiyet	Kadın	13	15	
	Erkek	7	15	
Yaş (ort \pm SS) (min-maks)		29,2 \pm 5,3 (21-45)	30,57 \pm 5,87 (22-44)	p=0,406

Gönüllü gruplarının periferik kan lenfositlerindeki DNA hasarı comet yöntemiyle değerlendirildi ve fotoğraflandı (Şekil 4.1- Şekil 4.8).

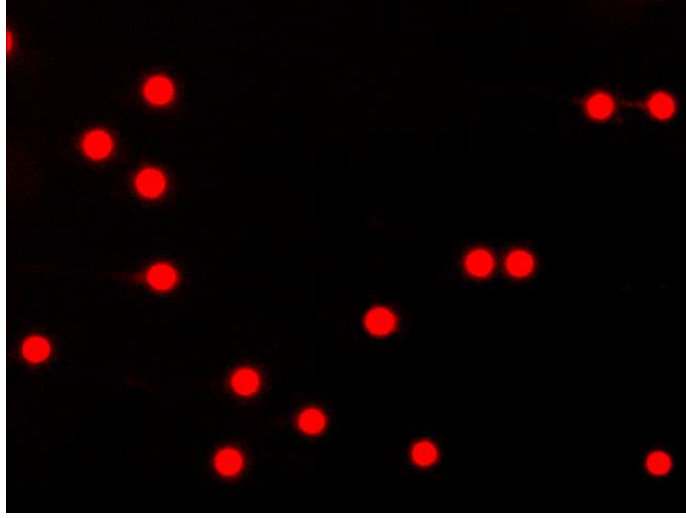
Sigara içen ve içmeyenlerin elde edilen tüm verileri Ek 3 ve Ek 4 'de verildi.



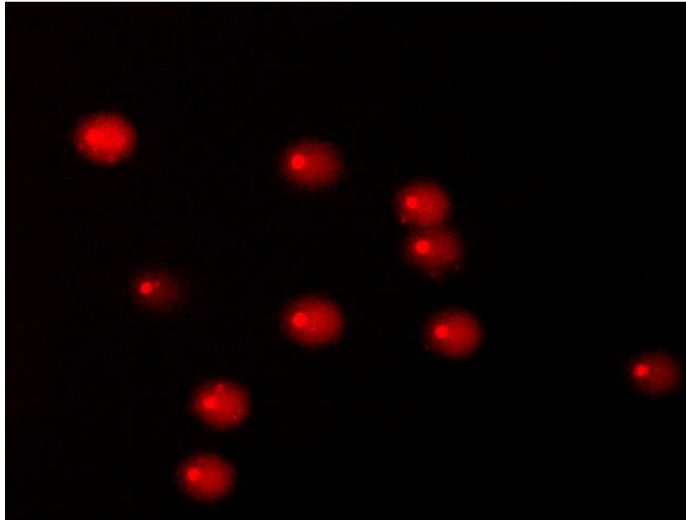
Şekil 4.1 Sigara içen erkek gönüllünün comet görüntüsü (H_2O_2 'siz)



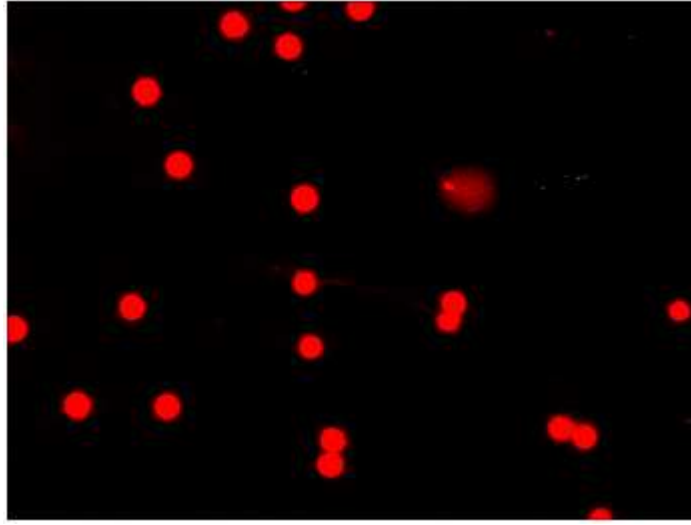
Şekil 4.2 Sigara içen erkek gönüllünün comet görüntüsü (H_2O_2 'li)



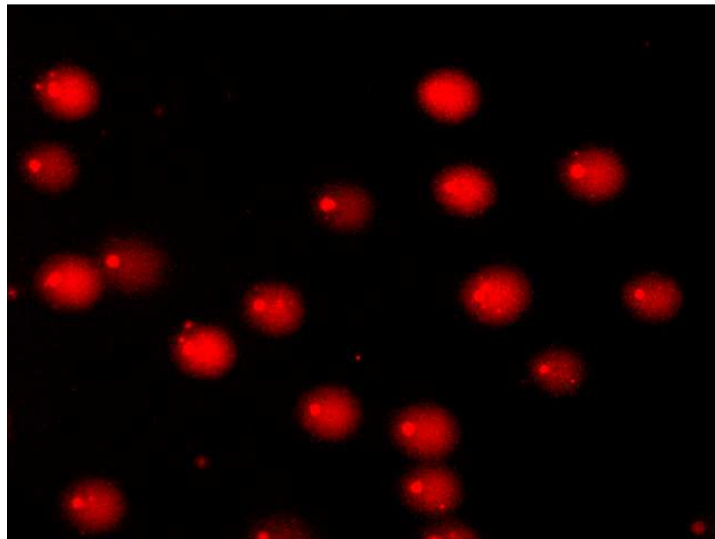
Şekil 4.3 Sigara içmeyen erkek gönüllünün comet görüntüsü (H_2O_2 'siz)



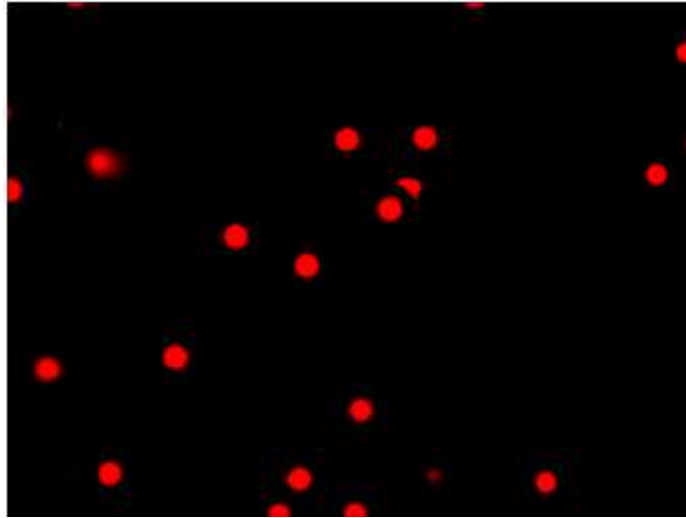
Şekil 4.4 Sigara içmeyen erkek gönüllünün comet görüntüsü (H_2O_2 'li)



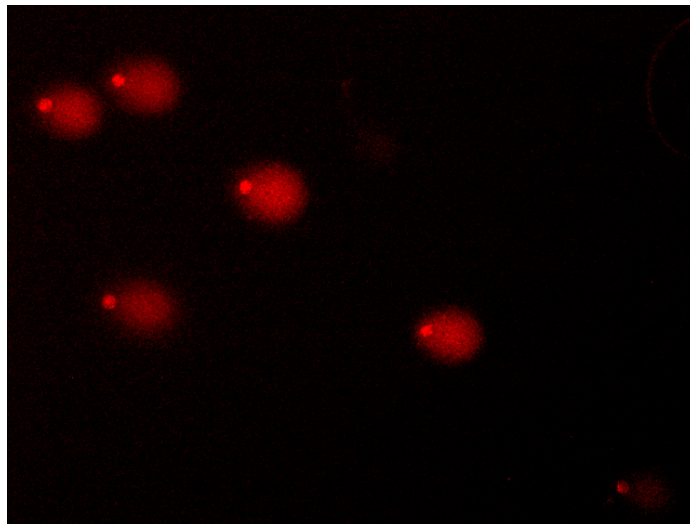
Şekil 4.5 Sigara içen kadın gönüllünün comet görüntüsü (H_2O_2 'siz)



Şekil 4.6 Sigara içen kadın gönüllünün comet görüntüsü (H_2O_2 'li)



Şekil 4.7 Sigara içmeyen kadın gönüllünün comet görüntüsü (H_2O_2 'siz)



Şekil 4.8 Sigara içmeyen kadın gönüllünün comet görüntüsü (H_2O_2 'li)

Gönüllü gruplarının bazal ve H₂O₂ ile indüklenmiş DNA hasarı sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 4.2' de, grafiksel olarak Şekil 4.9 'de sunuldu.

H₂O₂ ile muamele gören hücrelerde, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti değişkeni yönünden sigara içen ve içmeyen gönüllü grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu (p<0,05).

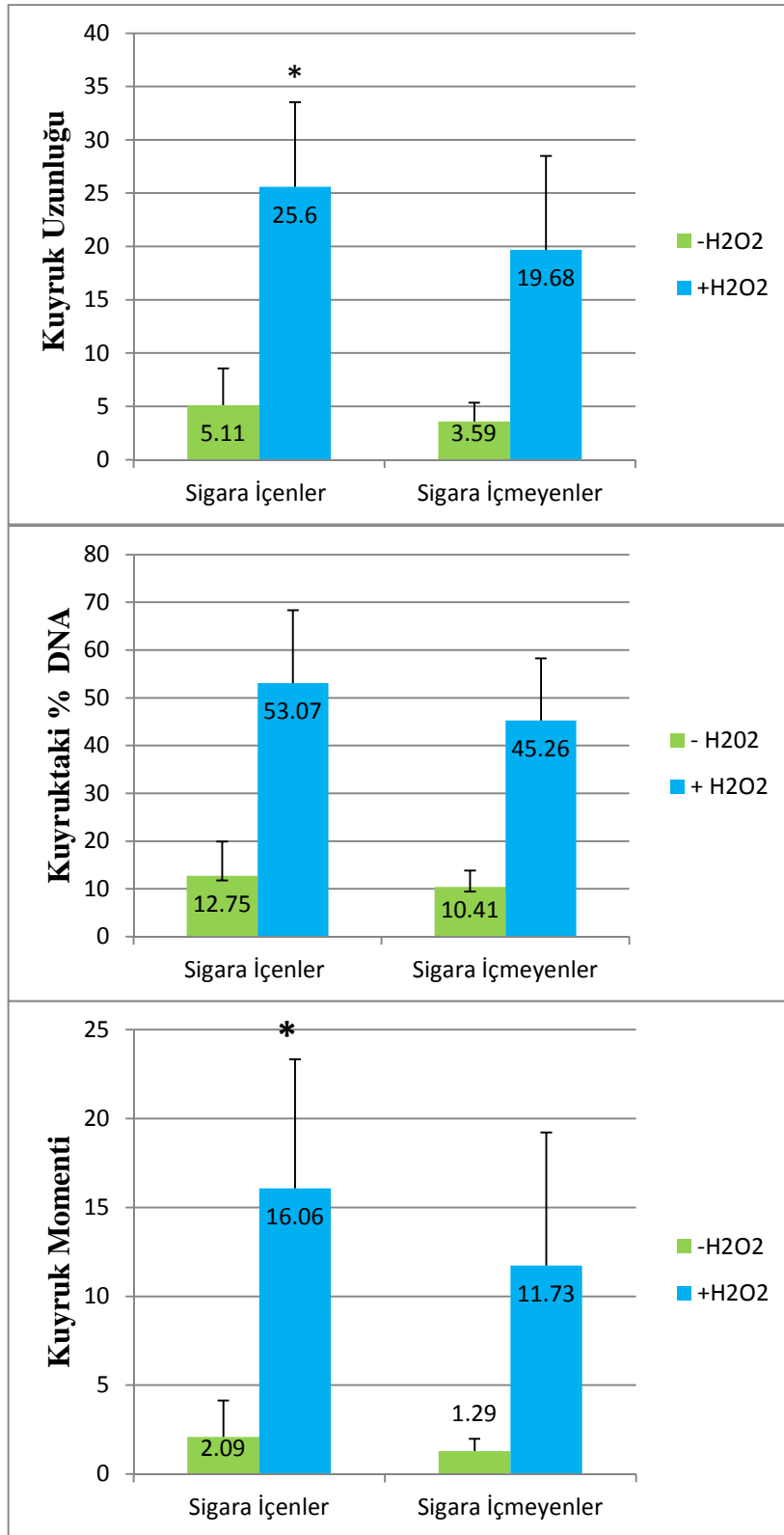
Tablo 4.2 Gönüllü gruplarının bazal ve H₂O₂ ile indüklenmiş DNA hasarı sonuçları

Tablo 4.2a Gönüllü gruplarının bazal DNA hasarı

	Sigara İçen Gönüllü (n=30)			Sigara İçmeyen Gönüllü (n=20)			P
	Ort± SS	Medyan	Min - Maks	Ort± SS	Medyan	Min - Maks	
Kuyruk Uzunluğu	5,11±3,45	4,13	1,73 - 15,99	3,59±1,75	3,28	1,6 - 8,14	0,063
Kuyruktaki % DNA	12,75±7,14	10,4	3,35 - 33,77	10,41±3,41	9,89	5,67 - 18,7	0,452
Kuyruk Momenti	2,09±2,05	1,44	0,43 - 8,85	1,29±0,69	1,05	0,47 - 2,99	0,178

Tablo 4.2b Gönüllü gruplarının H₂O₂ ile indüklenmiş DNA hasarı

	Sigara İçen Gönüllü (n=30)			Sigara İçmeyen Gönüllü(n=20)			P
	Ort± SS	Medyan	Min - Maks	Ort± SS	Medyan	Min - Maks	
Kuyruk Uzunluğu	25,6±7,92	25,68	11,09 - 43,94	19,68±8,82	16,54	7,21 - 36,19	0,017*
Kuyruktaki % DNA	53,07±13	55,21	24,96 - 78,49	45,26±15,29	40,64	20,7 - 73,68	0,058
Kuyruk Momenti	16,06±7,27	15,89	4,18 - 34,84	11,73±7,48	9,06	2,64 - 26,93	0,021*



Şekil 4.9 Sigara içen ve içmeyen gönüllü gruplarında bazal (-H₂O₂) ve H₂O₂ ile indüklenmiş oksidatif DNA hasarının grafiksel gösterimi.

*Sigara içmeyenlere göre anlamlı farklılık (p<0,05)

Sigara içen gönüllü grubunda bazal ve H_2O_2 ile indüklenmiş DNA hasarı sonuçlarının cinsiyete göre karşılaştırılması Tablo 4.3' de, grafiksel olarak Şekil 4.10 'da Sunuldu. İncelenen değişkenler için sigara içen gönüllülerde kadın ve erkek grupları arasında kuyruk uzunluğu ve kuyruktaki % DNA parametrelerinde, istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p < 0,05$). Ancak H_2O_2 ile muamele gören hücrelerde incelenen parametreler açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p > 0,05$).

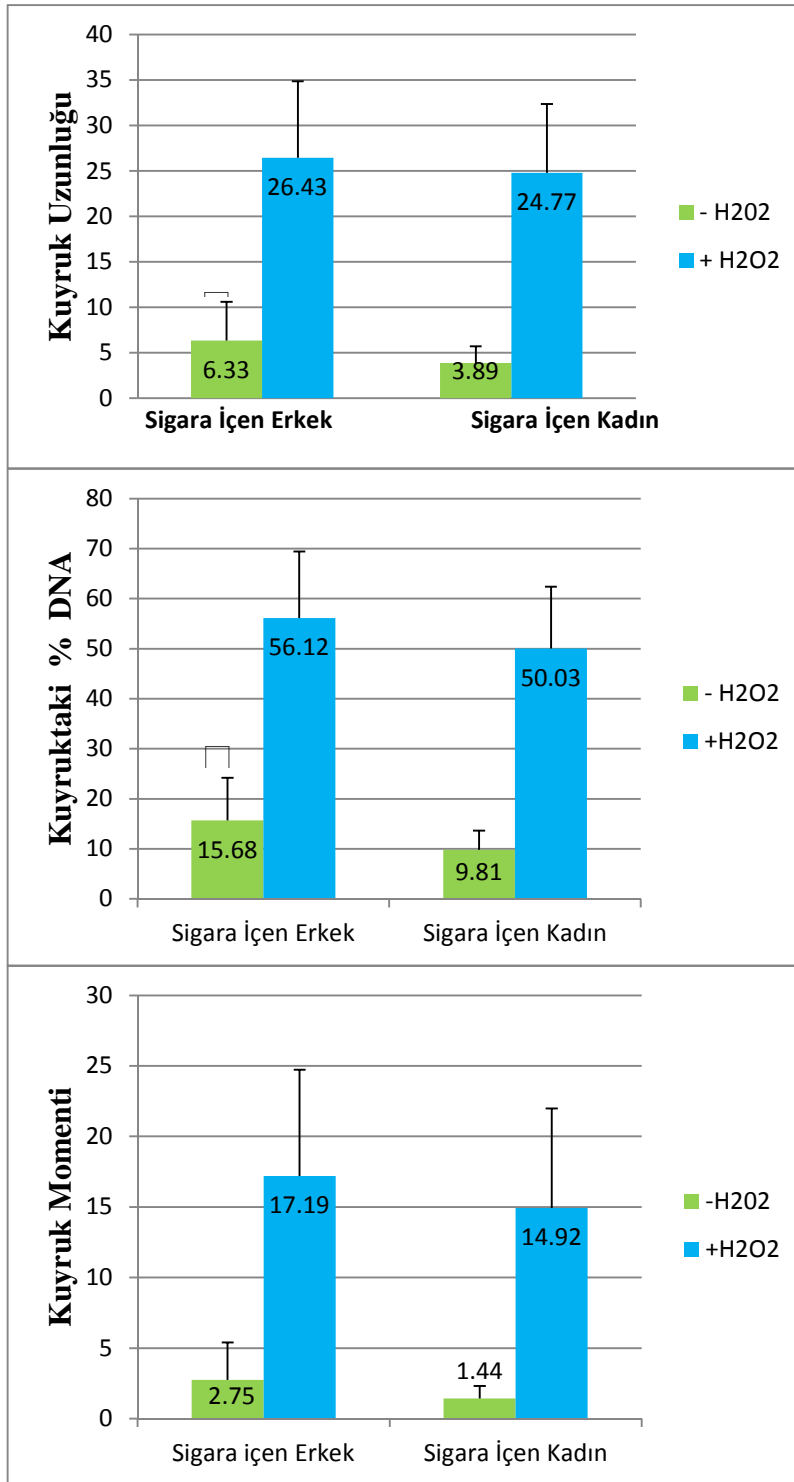
Tablo 4.3 Sigara içen gönüllülerin bazal ve H_2O_2 ile indüklenenmiş DNA hasarı sonuçları

Tablo 4.3a Sigara içen gönüllülerin bazal DNA hasarı

	ERKEK (n=15)			KADIN (n=15)			p
	Ort± SS	Medyan	Min - Maks	Ort± SS	Medyan	Min - Maks	
Kuyruk Uzunluğu	6,33±4,26	4,67	1,96 - 15,99	3,89±1,82	3,10	1,73 - 7,55	0,045*
Kuyruktaki % DNA	15,68±8,51	12,58	4,83 - 33,77	9,81±3,86	8,7	3,35 - 15,94	0,025*
Kuyruk Momenti	2,75±2,65	1,47	0,43 - 8,85	1,44±0,87	1,36	0,46 - 3	0,174

Tablo 4.3b Sigara içen gönüllülerin H_2O_2 ile indüklenmiş DNA hasarı

	ERKEK (n=15)			KADIN (n=15)			p
	Ort± SS	Medyan	Min - Maks	Ort±SS	Medyan	Min - Maks	
Kuyruk Uzunluğu	26,43±8,42	27,2	11,09 - 43,94	24,77±7,59	23,6900	13,39 - 41,01	0,576
Kuyruktaki % DNA	56,12±13,32	58,62	26,71 - 78,49	50,03±12,35	48,4800	24,96 - 73,87	0,205
Kuyruk Momenti	17,19±7,53	17,81	4,72 - 34,84	14,92±7,07	13,6400	4,18 - 30,74	0,401



Şekil 4.10 Sigara içenlerde bazal (-H₂O₂) ve H₂O₂ ile indüklenmiş oksidatif DNA hasarının (+H₂O₂) grafiksel gösterimi.

* Bazal DNA hasarı açısından anlamlı farklılık (p<0,05).

Sigara içmeyen gönüllü grubunda bazal ve H_2O_2 ile indüklenmiş DNA hasarı sonuçlarının cinsiyete göre karşılaştırılması Tablo 4.4' de, grafiksel olarak Şekil 4.11 'de sunuldu. İncelenen değişkenler açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0,05$).

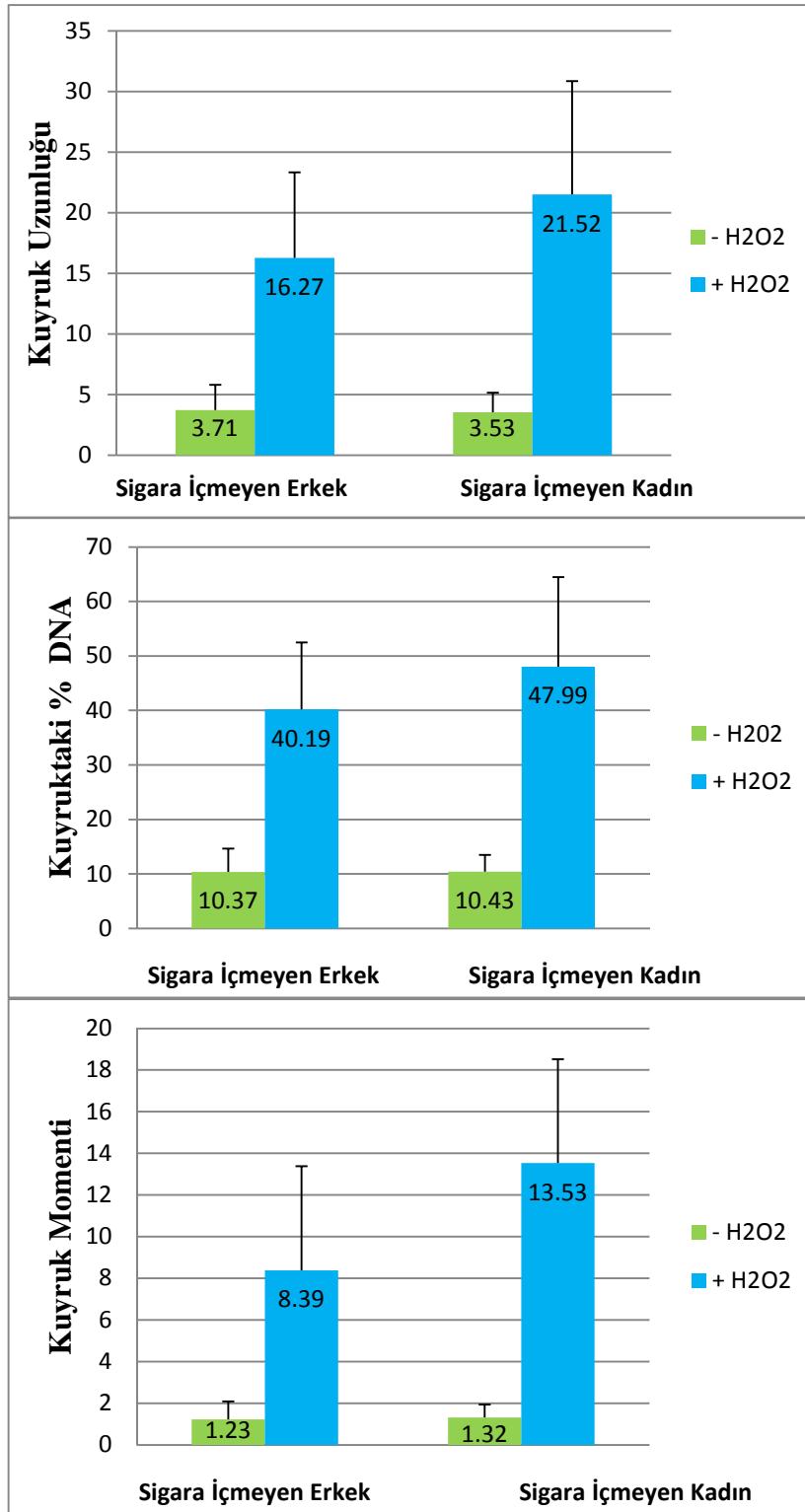
Tablo 4.4 Sigara içmeyen gönüllülerin bazal ve H_2O_2 ile indüklenmiş DNA hasarı sonuçları

Tablo 4.4a Sigara içmeyen gönüllülerin bazal DNA hasarı

	ERKEK (n=7)			KADIN (n=13)			p
	Ort± SS	Medyan	Min - Maks	Ort± SS	Medyan	Min - Maks	
Kuyruk Uzunluğu	3,71±2,1	3,23	2,03 - 8,14	3,53±1,62	3,32	1,6 - 7,99	0,968
Kuyruktaki % DNA	10,37±4,28	8,85	6,5 - 18,7	10,43±3,04	10,53	5,67 - 16,38	0,663
Kuyruk Momenti	1,23±0,86	,95	0,47 - 2,99	1,32±0,62	1,38	0,63 - 2,71	0,606

Tablo 4.4b Sigara içmeyen gönüllülerin H_2O_2 ile indüklenmiş DNA hasarı

	ERKEK (n=7)			KADIN (n=13)			p
	Ort± SS	Medyan	Min - Maks	Ort± SS	Medyan	Min - Maks	
Kuyruk Uzunluğu	16,27±7,07	14,67	7,21 - 27,88	21,52±9,36	18,42	8,14 - 36,19	0,183
Kuyruktaki % DNA	40,19±12,26	40,36	21,34 - 56,71	47,99±16,49	47,49	20,7 - 73,68	0,588
Kuyruk Momenti	8,39±4,94	7,32	2,64 - 16,64	13,53±8,14	10,43	3,28 - 26,93	0,157

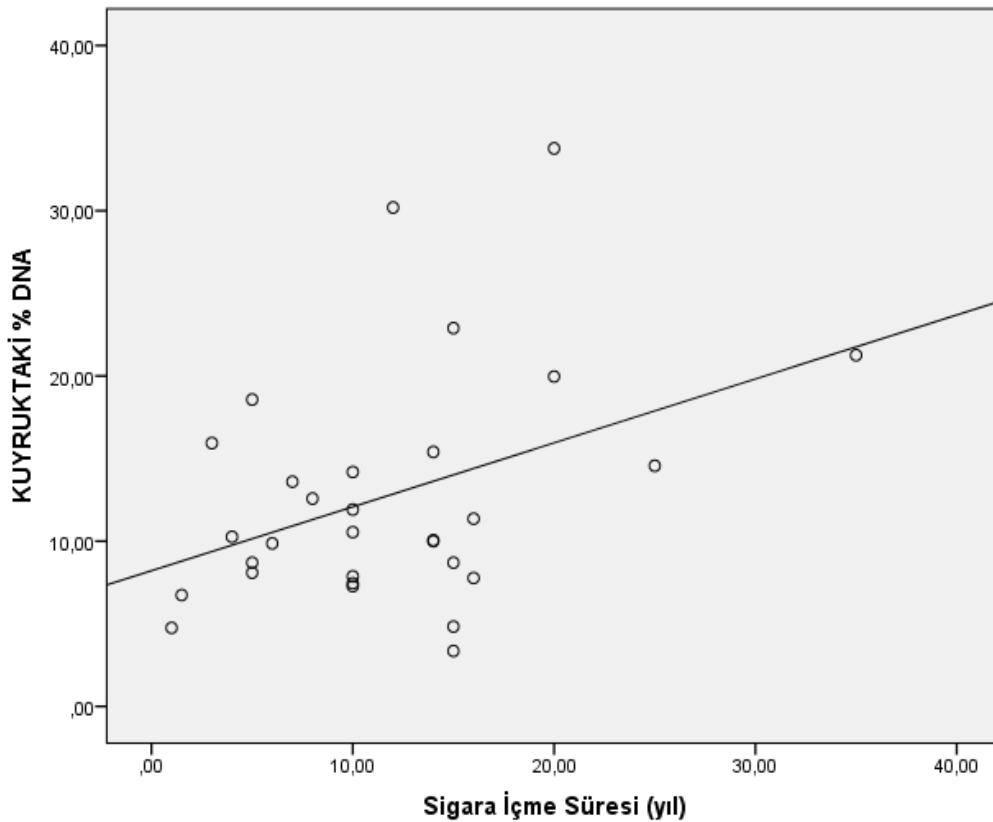


Şekil 4.11 Sigara içmeyenlerde bazal (-H₂O₂) ve H₂O₂ ile indüklenmiş oksidatif DNA hasarının (+H₂O₂) grafiksel gösterimi.

Sigara içen gönüllü grubunda bulunanların lenfositlerindeki bazal DNA hasarıyla (kuyruktaki % DNA parametresi ele alınarak), gönüllülerin sigara içme süreleri (yıl) arasındaki ilişki *spearman* korelasyon testi ile araştırıldı; istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı(Tablo4.5) (Şekil 4.12).

Tablo 4.5 Sigara içme süresi ile kuyruktaki % DNA arasındaki korelasyon

		KUYRUKTAKİ % DNA
Sigara İçme Süresi (yıl)	Korelasyon Katsayısı	,302
	p	,105
	N	30

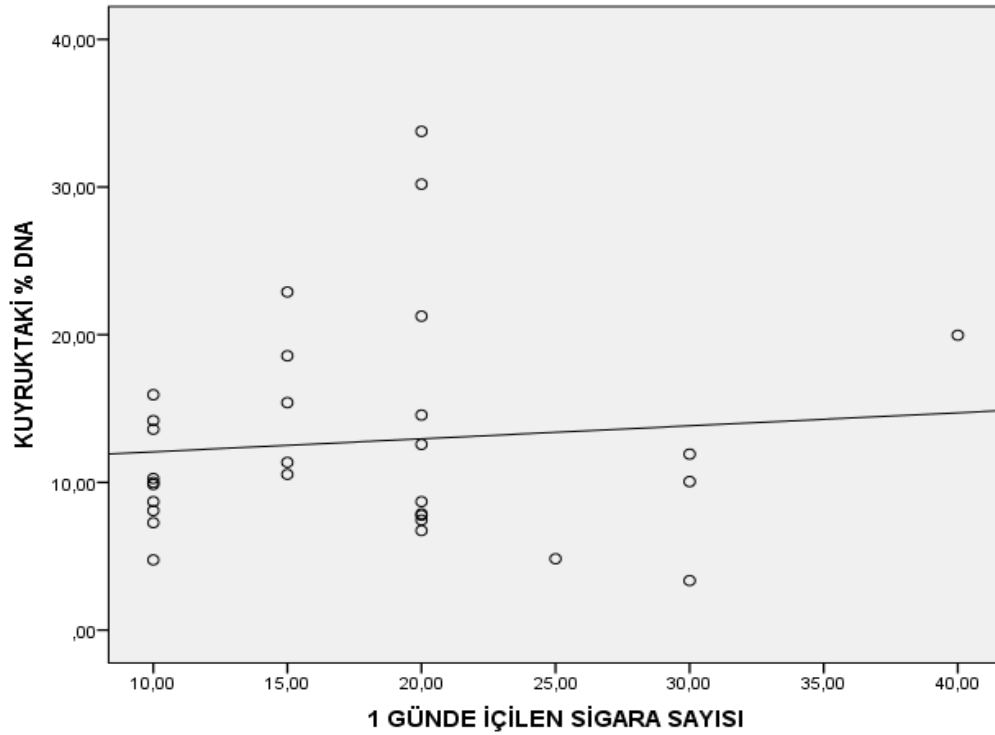


Şekil 4.12 Sigara içme süresi (yıl) ile kuyruktaki % DNA parametresi arasındaki korelasyon

Sigara içen gönüllülerin lenfositlerindeki bazal DNA hasarının kuyruktaki % DNA parametresi ele alınarak yapılan karşılaştırma *spearman* korelasyon testi ile araştırıldı, gönüllülerin bir günde içtikleri sigara sayısı ile bazal DNA hasarı arasında bir ilişki bulunmadı (Tablo 4.6) (Şekil 4.13).

Tablo 4.6 Bir günde içilen sigara sayısı ile kuyruktaki % DNA arasındaki korelasyon

		KUYRUKTAKİ % DNA
BİR GÜNDE İÇİLEN SİGARA / GÜN	Korelasyon Katsayısı	,025
	p	,896
	N	30

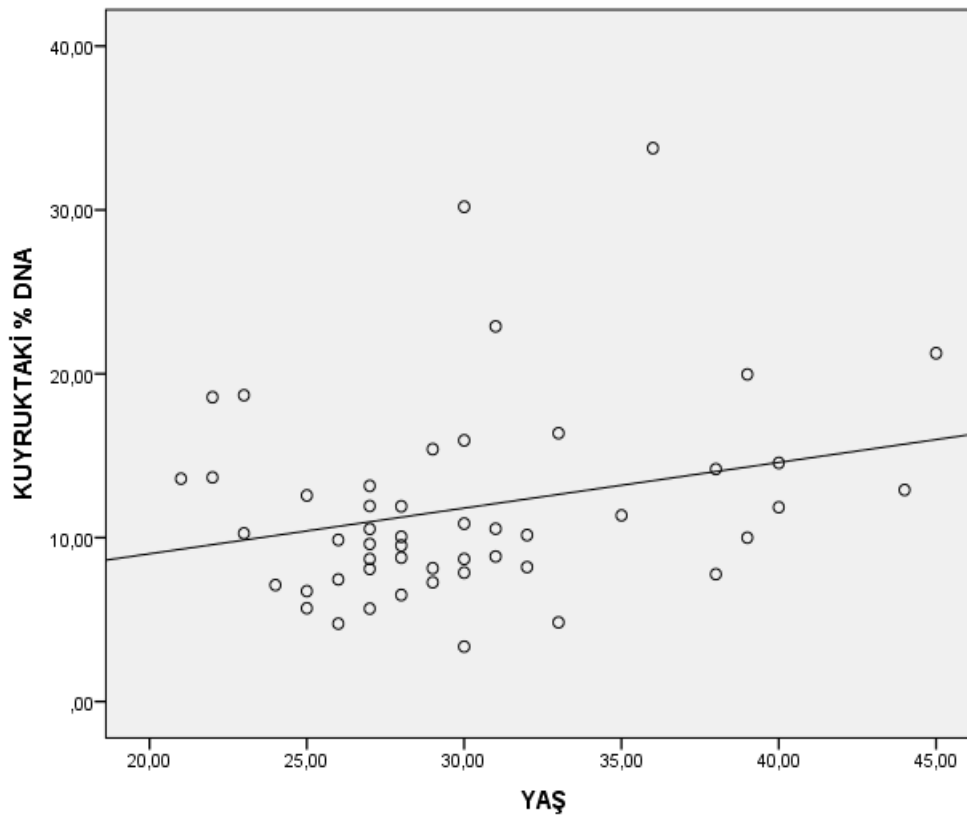


Şekil 4.13 Bir günde içilen sigara sayısı ile kuyruktaki % DNA arasındaki korelasyon

Tüm gönüllülerin yaşları ile kuyruktaki % DNA parametresi arasındaki ilişki *spearman* korelasyon testi ile araştırıldı ve bir korelasyon bulunmadı.(Tablo 4.7) (Şekil 4.14).

Tablo 4.7 Tüm gönüllülerin yaşları ile kuyruktaki % DNA parametresi arasındaki korelasyon

		KUYRUKTAKI% DNA
YAŞ	Korelasyon Katsayısı	,231
	p	,106
	N	50



Şekil 4.14 Gönüllülerin yaşları ile kuyruktaki % DNA arasındaki korelasyon

Tablo 4.8. Sigara içen gönüllülerden elde edilen ham veriler

isim	yaş	cinsiyet	günlük sigara	kullanım yılı	Kuyruk Uzunluğu	Kuyruktaki % DNA	Kuyruk Momenti	Kuyruk Uzunluğu	Kuyruktaki % DNA	Kuyruk Momenti
								H2O2'li	H2O2'li	H2O2'li
PE1	36	E	20	20	15,6 ± 12,72	33,77 ± 29,02	8,75 ± 9,74	31,58 ± 10,22	58,62 ± 12,35	19,42 ± 9,05
PE2	45	E	20	35	7,05 ± 7,44	21,26 ± 23,41	3,13 ± 4,47	32,17 ± 7,68	67,93 ± 11,05	22,45 ± 7,83
PE3	26	E	20	10	3,40 ± 4,37	7,45 ± 13,32	0,71 ± 1,62	30,33 ± 15,70	59,54 ± 27,33	22,06 ± 15,15
PE4	31	E	15	10	3,74 ± 5,27	10,54 ± 16,44	1,18 ± 2,85	11,09 ± 9,10	26,71 ± 21,36	4,72 ± 5,40
PE5	22	E	15	5	5,77 ± 8,21	18,57 ± 25,30	2,83 ± 5,42	27,20 ± 12,25	58,36 ± 20,51	17,87 ± 12,19
PE6	33	E	25	15	1,96 ± 3,89	4,83 ± 10,11	0,43 ± 1,71	17,29 ± 13,05	39,79 ± 24,65	9,88 ± 11,29
PE7	31	E	15	15	9,44 ± 8,63	22,90 ± 23,19	4,07 ± 5,62	21,82 ± 5,38	55,05 ± 11,50	12,55 ± 5,20
PE8	25	E	20	8	5,29 ± 6,21	12,58 ± 14,41	1,47 ± 3,06	26,03 ± 6,04	53,95 ± 10,90	14,42 ± 5,36
PE9	35	E	15	16	4,31 ± 5,64	11,36 ± 17,24	1,34 ± 2,92	11,69 ± 6,14	35,31 ± 16,03	5,03 ± 4,19
PE10	30	E	20	12	15,99 ± 14,97	30,19 ± 29,40	8,85 ± 12,34	28,29 ± 9,10	67,25 ± 14,30	20,12 ± 9,08
PE11	39	E	40	20	6,74 ± 7,46	19,97 ± 21,71	2,88 ± 4,50	25,82 ± 8,58	59,26 ± 17,19	16,52 ± 8,12
PE12	23	E	10	4	4,16 ± 6,75	10,26 ± 16,60	1,42 ± 3,20	32,90 ± 8,73	66,30 ± 12,08	22,63 ± 8,52
PE13	21	E	10	7	4,67 ± 5,54	13,60 ± 18,16	1,52 ± 2,85	26,98 ± 9,73	59,83 ± 16,70	17,59 ± 9,55
PE14	27	E	10	5	3,32 ± 7,14	8,09 ± 15,97	1,27 ± 3,70	29,28 ± 10,40	55,36 ± 18,68	17,81 ± 10,74
PE15	26	E	10	6	3,52 ± 6,77	9,86 ± 17,52	1,35 ± 4,02	43,94 ± 8,48	78,49 ± 8,91	34,84 ± 8,94
PK1	25	K	20	1,5	2,44 ± 5,05	6,74 ± 14,95	0,79 ± 2,57	41,01 ± 7,15	73,87 ± 9,68	30,74 ± 8,19
PK2	38	K	20	16	2,35 ± 3,06	7,77 ± 11,43	0,46 ± 0,95	23,01 ± 5,80	43,62 ± 10,23	10,31 ± 4,20
PK3	40	K	20	25	5,38 ± 8,70	14,56 ± 21,48	2,51 ± 5,92	25,54 ± 13,34	56,48 ± 24,40	17,40 ± 11,77
PK4	30	K	20	15	2,83 ± 4,76	8,70 ± 17,83	1,00 ± 2,94	19,71 ± 13,10	44,03 ± 25,37	11,79 ± 11,07
PK5	28	K	30	14	4,21 ± 6,89	10,06 ± 17,76	1,50 ± 3,79	25,37 ± 8,76	49,19 ± 16,96	13,64 ± 8,34
PK6	27	K	10	5	4,09 ± 5,92	8,70 ± 14,16	1,04 ± 3,45	23,99 ± 9,10	57,17 ± 19,55	15,27 ± 8,36
PK7	30	K	20	10	2,23 ± 3,86	7,87 ± 13,12	0,56 ± 1,89	20,06 ± 5,93	48,44 ± 9,39	10,05 ± 4,34
PK8	38	K	10	10	7,55 ± 8,86	14,19 ± 17,32	2,43 ± 4,65	22,59 ± 9,36	48,48 ± 16,37	12,21 ± 7,18
PK9	30	K	30	15	2,68 ± 5,62	3,35 ± 7,67	0,47 ± 2,29	13,39 ± 7,25	24,96 ± 14,66	4,18 ± 3,66
PK10	29	K	15	14	6,44 ± 8,95	15,40 ± 21,09	2,73 ± 5,03	15,62 ± 12,58	33,13 ± 24,26	7,99 ± 10,77
PK11	39	K	10	14	2,69 ± 6,11	10,00 ± 23,50	1,51 ± 4,99	23,69 ± 16,24	45,11 ± 28,67	14,94 ± 13,63
PK12	30	K	10	3	6,67 ± 9,20	15,94 ± 23,09	3,00 ± 6,22	19,09 ± 8,67	47,40 ± 17,26	10,26 ± 7,56
PK13	29	K	10	10	3,10 ± 6,77	7,27 ± 17,85	1,36 ± 4,67	27,92 ± 12,61	50,54 ± 22,73	16,69 ± 12,11
PK14	28	K	30	10	3,99 ± 6,75	11,91 ± 19,83	1,68 ± 4,26	37,14 ± 11,75	69,34 ± 16,07	27,40 ± 13,19
PK15	26	K	10	1	1,73 ± 4,13	4,75 ± 12,60	0,53 ± 1,97	33,45 ± 11,33	58,64 ± 15,85	20,94 ± 11,61

Tablo 4.9. Sigara içmeyen gönüllülerden elde edilen ham veriler

İSİM	YAŞ	CİNSİYET	Kuyruk Uzunluğu	Kuyruktaki % DNA	Kuyruk Momenti	Kuyruk Uzunluğu H2O2'li	Kuyruktaki % DNA H2O2'li	Kuyruk Momenti + H2O2'li
NE1	23	E	8,14 ± 8,19	18,70 ± 20,07	2,99 ± 4,28	23,26 ± 8,25	52,99 ± 15,40	13,44 ± 7,33
NE2	28	E	2,03 ± 3,09	6,50 ± 14,83	0,47 ± 1,34	7,21 ± 6,21	21,34 ± 19,65	2,64 ± 3,68
NE3	29	E	2,35 ± 3,66	8,13 ± 12,06	0,57 ± 1,31	14,67 ± 7,98	40,36 ± 19,41	7,32 ± 5,95
NE4	24	E	3,60 ± 6,60	7,11 ± 14,65	1,12 ± 3,37	27,88 ± 8,13	56,71 ± 13,69	16,64 ± 6,86
NE5	27	E	4,20 ± 5,80	13,16 ± 19,26	1,55 ± 3,03	14,55 ± 7,90	39,21 ± 17,43	6,82 ± 5,74
NE6	32	E	3,23 ± 4,77	10,16 ± 15,01	0,95 ± 2,13	10,97 ± 7,53	29,79 ± 17,87	4,45 ± 4,51
NE7	31	E	2,44 ± 4,71	8,85 ± 17,09	0,93 ± 3,13	15,32 ± 7,22	40,92 ± 18,71	7,41 ± 5,77
NK1	28	K	2,85 ± 4,34	9,52 ± 13,89	0,79 ± 1,91	25,60 ± 9,57	58,78 ± 16,09	16,24 ± 8,51
NK2	40	K	4,09 ± 6,33	11,85 ± 17,49	1,41 ± 3,29	18,42 ± 8,72	48,53 ± 19,13	10,43 ± 7,57
NK3	27	K	2,06 ± 4,18	5,67 ± 14,18	0,63 ± 2,28	21,44 ± 13,43	47,49 ± 26,77	13,54 ± 11,74
NK4	27	K	2,57 ± 4,47	9,62 ± 16,11	0,89 ± 2,11	8,14 ± 8,42	20,70 ± 21,70	3,28 ± 4,89
NK5	28	K	3,39 ± 4,67	8,78 ± 13,44	0,88 ± 2,35	12,18 ± 7,81	31,93 ± 18,19	5,09 ± 5,30
NK6	22	K	5,18 ± 8,02	13,67 ± 21,40	2,29 ± 5,78	35,59 ± 9,73	71,29 ± 12,17	26,21 ± 9,34
NK7	33	K	7,99 ± 8,48	16,38 ± 19,59	2,71 ± 4,58	35,65 ± 7,94	73,68 ± 10,11	26,93 ± 8,69
NK8	25	K	1,60 ± 4,29	5,69 ± 15,46	0,72 ± 2,98	23,82 ± 12,87	51,57 ± 23,58	14,93 ± 12,02
NK9	44	K	3,67 ± 5,24	12,91 ± 19,59	1,43 ± 3,08	16,78 ± 10,85	38,83 ± 23,22	8,77 ± 7,55
NK10	27	K	3,57 ± 5,86	11,93 ± 19,09	1,47 ± 3,37	13,77 ± 9,48	36,07 ± 20,24	6,62 ± 6,68
NK11	27	K	3,18 ± 6,35	10,53 ± 20,85	1,56 ± 4,64	16,29 ± 12,09	37,42 ± 25,34	8,82 ± 10,22
NK12	32	K	2,43 ± 4,77	8,20 ± 17,56	0,97 ± 3,33	15,94 ± 12,49	37,59 ± 28,84	9,29 ± 9,81
NK13	30	K	3,32 ± 6,07	10,86 ± 20,13	1,38 ± 3,64	36,19 ± 7,50	69,99 ± 9,08	25,74 ± 7,69

5. TARTIŞMA

Dünya Sağlık Örgütü'nün Sigara Salgını raporuna göre, Türkiye dünyada en fazla sigaranın içildiği 10 ülke arasına girmektedir (WHO, 2008). Sigara ve diğer tütün mamullerinin; kanser, kardiyovasküler sistem ve solunum sistemi hastalıklarına yol açtığı, uzun süreli maruziyetin, sağlık sorunlarını ağırlaştırdığı kanıtlanmıştır (Karlıkaya 2006, Vineis vd 2007, Barcala vd 2007, Giovino 2007). Son yıllarda, sigaraya bağlı birçok sorunun oluşumunun yanısıra genotoksisiteye de yol açması ve klinik seyir ile genotoksisite arasındaki kuvvetli ilişki önemli tartışma konularındandır (Akbaş vd 2001, Karlıkaya 2004, Kayaalp vd 2005). Genotoksisitenin artışı ile insanlarda kanser oluşumu arasındaki bağlantı kanıtlanmıştır (Bonassi vd, 1995). Bugün belki de kansere neden olan en yaygın çevresel etken tütün ürünleridir. Tütün ürünleri başta akciğer, ağız boşluğu ve komşu doku kanserleri olmak üzere birçok kansere neden olmaktadır (Doll ve Peto, 1981; Wogan vd, 2004). Eksojen kaynaklı DNA hasarlarıyla oluşan mutasyonlar ve gen anlatımındaki değişikliklerle etkinliği artan endojen DNA hasarları çoğu kanser vakasında birlikte rol almaktadır. Bu nedenle oluşan endojen DNA hasarlarının eksojen DNA hasarları ile etkileşimini bilmek kanser ve diğer hastalıkların gelişimini anlamak için önemlidir (De Bont ve Van Larebeke, 2004).

DNA hasarını belirlemede, diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında *comet* yöntemi; düşük seviyedeki DNA hasarını belirleyebilmesi, az miktarda biyolojik materyal ile çalışılabilmesi, ekonomik ve uygulaması kolay olması, kısa sürede tamamlanabilmesi özellikleriyle öne çıkmaktadır (Tice vd, 2000). Wu vd (2005) nikotinin pH 8'de kültüre

edilmiş normal hücrelerde, pH 6.5'da kültüre edilmiş hücrelere göre daha fazla DNA kırığına sebep olduğunu *comet* analizliyle göstermişlerdir. Mukherjee vd (2013) tütün dumanına ve petrol gazına maruz kalan sigara içmeyen kişileri çalışma grubu olarak ele almışlardır ve kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında bu kişilerin balgamındaki hem inflamatuvar hem de epitelyum hücrelerinde *comet* yöntemiyle oldukça yüksek oranda DNA hasarı saptamışlardır. da Silva vd (2013) tütün yapraklarındaki organik ve inorganik karışımlara maruz kalan çiftçiler için olası riski araştırmak adına, tütün yapraklarında yaşayan *Helixaspersa*'daki genotoksik etkiyi *comet* yöntemi ile ölçerek; tütün yapraklarına farklı zaman periyotlarında maruz kalmanın belirgin DNA hasarı oluşturduğunu saptamışlardır. Hang vd (2013) sigara dumanının insan hücrelerinde oluşturabileceği DNA hasarını araştırmışlar ve sonuç olarak *comet* yönteminin numunedeki çok düşük miktardaki kimyasalların etkilerini test etmede oldukça kullanışlı olduğu kanısına varmışlardır.

Çalışmamızda sigara içen ve içmeyenler arasında bazal DNA hasarı ve H₂O₂ ile indüklenmiş DNA hasarı 3 farklı *comet* parametresi incelenerek araştırıldı. Kuyruk uzunluğu, kuyruktaki % DNA ve kuyruk momenti parametrelerine bakıldığında, sigara içenler ve içmeyenlerin bazal DNA hasarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Ancak H₂O₂ ile indüklenmiş DNA hasarı açısından kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti parametrelerinde anlamlı bir fark bulundu (p<0,05). Sigara içenlerde oranların daha yüksek olduğu dikkat çekti.

Sigara içen kişilerde çeşitli yöntemlerle DNA hasarını inceleyen çalışmaların sonuçları tartışmalıdır. Hoffmann vd (2005) tarafından gerçekleştirilen sigaranın DNA üzerindeki potansiyel etkilerini periferik kan örneklerinde *comet* yöntemiyle inceleyen bir meta analiz çalışmasında 37 çalışmadan sadece 14'ünde sigara içen ve içmeyenler arasında bir fark saptandığı ve istatistiksel analiz sonuçlarının verildiği belirtilmiştir. Diğer çalışmalardan beşinde yine sigara içen ve içmeyenler arasında bir fark saptanmış fakat veriler ve istatistiksel analiz sonuçları belirtilmemiştir. Bu çalışmalardan sadece birinde (Piperakis vd 1998) sigaranın genotoksik etkisinden söz edilmiş fakat diğer dört çalışmada sigara içen ve içmeyenler arasında bir fark saptanmamıştır. Bazı diğer çalışmalarda da zayıf istatistiksel analizler ve biaslara dikkat çekilmiştir. Dinçer vd (2003) tarafından günde 20 adet sigara içen 27 erkek ve sigara içme alışkanlığı olmayan 23 erkek bireyin kan örnekleri alınarak yapılan çalışmada ise, lökosit DNA'sındaki

hasar ve tam kanda GSH düzeyi incelenmiştir. DNA zincir kırığı sıklığı *comet* yöntemi ile ölçülmüş, kuyruktaki % DNA parametresine bakılmış ve sigara içen bireylerde, içmeyenlere göre anlamlı olarak yüksek ($p<0.001$) bulunmuştur Cloos vd (1996) boğaz ve baş skuamoz hücre tümörüne sahip hastalarda gerçekleştirilen bir çalışmada, sigara kullanımının lenfositlerde DNA hasarını etkilemediğini ileri sürmüşlerdir. Ginzkey vd (2013) insan kan lenfositlerine $1\mu\text{M}$ - 1mM aralığındaki dozlarda nikotin ile muamele etmişler, suplementli RPMI mediumu negatif kontrol olarak $100\mu\text{M}$ konsantrasyondaki metilmetan sülfonatu pozitif kontrol olarak kullanmışlardır. *Comet* analizinden elde edilen sonuçlara göre negatif kontrol ile karşılaştırıldığında DNA migrasyonunda artış gözlenmemiş olup 24 saatlik süre sonucunda da belirgin bir DNA hasarı belirlenmemiştir.

Çalışmamızda günde en az 10 adet sigara içen kişiler çalışmaya alındı. Sigara içen bireylerin bazal DNA hasarıyla bir günde içtikleri sigara sayısı arasında bir korelasyon saptanmadı. Tüm gönüllülerin yaşları ile bazal DNA hasarı arasında bir ilişki bulunamadı. Ayrıca sigara içen bireylerin sigara içtikleri süre (yıl) ile bazal DNA hasarı arasında bir ilişki olup olmadığı araştırıldı ve istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki kaydedilmedi. Zhu vd (1999) yaptığı çalışmada ise bu çalışmadan farklı olarak sigara sayısının artışıyla DNA hasarının da belirgin derecede arttığı gözlenmiştir.

Çalışmamızda erkeklerin sigaranın zararlı etkisinden daha fazla etkilendiği görüldü. Kuyruk uzunluğu ve kuyruktaki % DNA parametrelerinde, sigara içen erkeklerin kadınlara oranla daha yüksek oranda bazal DNA hasarına sahip olduğu görüldü ($p<0.05$). Yine sigara içen gönüllü grubunda H_2O_2 ile indüklenmiş DNA hasarı bakımından kadın ve erkekler arasında anlamlı bir fark görülmedi. Söylemez vd (2012) tarafından, 60 sigara içen ve 60 sigara içmeyen gönüllü bireyden alınan periferik kan örnekleriyle, lenfosit hücrelerindeki DNA hasarı, *comet* yöntemi kullanılarak incelenmiş ve gerçekleştirilen çalışmada; sigara içen ve içmeyen gruplar arasında *comet* uzunluğu, kuyruk momenti ve *olive* kuyruk momenti, *comet* parametreleri açısından yüksek derecede anlamlılık bulunmuştur ($p<0.01$). Sigara içen kadınların içmeyenlere oranla DNA hasarı *comet* uzunluğu, *comet* yoğunluğu, baş uzunluğu, baş yoğunluğu, kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, ($p<0.01$), kuyruk momenti, ($p<0.05$) parametrelerine göre daha fazladır. Buna karşın, sigara içen ve içmeyen erkek grupları arasında kuyruktaki % DNA ve *olive* kuyruk momenti parametreleri açısından anlamlılık gözlenmiştir ($p<0.05$). Sigara indeksi açısından kadınlarda tüm kan örnekleri çalışılan

comet parametreleri ile karşılaştırıldığında, kuyruk momenti dışındaki bütün parametreler ile istatistiksel olarak anlamlılık bulunmuştur ($p < 0.05$). Diğer taraftan, erkek grubundaki kan örneklerinde *comet* uzunluğu, baş uzunluğu, baş yoğunluğu, kuyruk yoğunluğu ve olive kuyruk momentinde anlamlılık gözlenmiştir ($p < 0.05$). Sonuç olarak, sigaranın DNA hasarlarına sebep olduğu ve kadınların, sigaranın zararlı etkilerine karşı daha duyarlı olduğu söylenilebilir denilmiştir (Söylemez 2012).

El- Zein vd (2010) tarafından yapılan çalışmada, 30 akciğer kanseri teşhisi konulmuş (yeni teşhis konulmuş, kemoterapi ve radyoterapi görmemiş kişiler), 90 kişilik bir kontrol grubu (kansere vaka hikayesi olmayan), 30 sigara içmeyen, 30 sigarayı bırakmış, 30 halen sigara içen ve kanser belirtisi görülmemiş kişiler gönüllü olmuştur. Akciğer kanser vakaları; sigara kullanmayanlardan 6, eski kullanıcılardan 3 ve hala kullananlardan bir kat daha yüksek seviyede DNA hasarına sahiptir. En yüksek hasar seviyesine akciğer kanseri hastaları sahipken, bunu halen sigara içenler takip etmektedir. Sigara içmeyenlerin ise en az DNA hasar seviyesine sahip olduğu gözlenmiştir. Nakayama vd (1985) sigara içen bireylerin dokularında karsinojen DNA eklentilerinin düzeyinin daha yüksek olduğunu göstermiş ve sigara içen bireylerde tütünde bulunan elektofilik maddeler nedeni ile DNA kırıklarının oluştuğu öne sürmüştür. Çalışmamızda karsinojen DNA eklentileri ve sigara madde içerikleri ile ilgili bir araştırma yapılmadı.

Akbaş vd (2001) sigara kullanımının; KKD bazında genotoksik etkisi ve özgün bağışık sisteminin en önemli hücresel elamanları olan lenfositlerde (hücre düzeyinde) yaşam süresi üzerine etkileri incelenmiştir. KKD oranları sigara içmeyenlere göre sigara içenlerde (kadınlarda, erkeklerde ve genel toplamda) daha yüksek olduğu belirlenerek, sigaranın kardeş kromatid değişimi bazında genotoksik etkisi belirlenmiştir. Aynı şekilde sigara kullanımının kadınlarda, erkeklerde ve genel toplamda, lenfosit sayısını ve lenfositlerin mitozaya giriş hızını artırdığı belirlenmiş ve lenfosit oluşum hızının sayısal değer artışından daha yüksek olması nedeniyle sigara kullanımının lenfositlerde yaşam süresini kısalttığı saptanmıştır. Çalışmamızda mitotik indeks, hücre canlılığı ve apoptotik süreçler değerlendirilmedi.

Fracasso vd (2006) lenfositlerde DNA hasarını ve onarımını *comet* yöntemi ile belirleyerek sigaranın muhtemel etkilerini göstermek amaçlı çalışmalarında sigara içmeyen, sigarayı bırakan ve aktif içici çalışma grupları arasında diğer gruplarla

karşılaştırıldığında aktif içicilerde oldukça yüksek oranda bazal DNA hasarı tespit etmişler fakat DNA migrasyonu üzerinde sigaranın etkisini gösterememişlerdir. Tek başına hasarın tespiti diğer çalışmalarla uyumlu bulunmamıştır. Sigarayı bırakan kişilerin kuyruktaki % DNA, *comet* sayısı ve sigarayı bırakma yılı arasında ters bir korelasyon olduğu ve kontrol sınırı saptamak için yıl karşılaştırması yapıldığında 17 yıllık bir periyodun gerekli olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda sigarayı bırakanlar az sayıda (3 kişi) olduğu için araştırmaya alınmadı. Araştırma sigarayı bırakanları da içeren daha fazla gönüllüyle yeniden planlanabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak sigara içen ve içmeyenler arasındaki genotoksik hasarı *comet* yöntemiyle araştırdığımız bu çalışmada her ne kadarkuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki % DNA parametrelerine göre bazal DNA hasarı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülme de sigara içenlerde belirgin bir DNA hasarı artışı saptandı. Bu hasar kadınlara oranla erkeklerde daha fazlaydı. Kullanılan sigara sayısı ve sigara içme süresi (yıl) ile DNA hasarı arasında bir ilişki bulunmadı. DNA hasarı ile gönüllü gruplarının yaşları arasında bir ilişki bulunmadı. DNA hasarına meslek, beslenme gibi çevresel etmenlerin katkısı değerlendirilmedi.

Comet yönteminin yanısıra diğer genotoksisite analizleriyle yapılan pek çok çalışma da sigaranın DNA hasarı ve DNA tamir mekanizmalarına olumsuz etkisinin varlığını göstermektedir. Ancak *comet* yöntemi, daha hassas bir yöntem olması bakımından sigaranın oluşturduğu DNA hasarını belirlemede bir tarama yöntemi olarak öne çıkabilir.

Ayrıca DNA hasarına yönelik lenfositler dışında sigara dumanının geçiş yolu olan ağız içi ve soluk borusundan elde edilebilecek epitel hücreleriyle de yeni çalışmalar planlanabilir ve karşılaştırılabilir. Ayrıca hücrelerin apoptoz süreçleri de araştırılarak çalışma farklı yöntemlerle de desteklenebilir.

Piyasada bulunan farklı sigara formlarının sebep olabilecekleri genotoksik hasara ilişkin karşılaştırmalı çalışmalar yapılabilir. Bu çalışmalarda; sigaralar içerdikleri nikotin miktarına, karbonmonoksit miktarına, katran miktarına, fiziksel formuna, filtrelerinin farklılıklarına, aromalarına göre sınıflandırılabilir. Tütün bitkisinin sigara dışında puro, pipo, sarma tütün, nargile gibi farklı formlarının da işlendiği ve

tüketildiği bilinmektedir. Tütünün bu farklı formlarını tüketen kişilerde de DNA hasarını değerlendirme amacıyla yeni araştırmalara da ihtiyaç vardır.

Sigarayı bırakmaya yönelik üretilen ürünlerin (elektronik sigara, nikotin sakızları, nikotin bantları ve benzeri ürünler ile nikotin bağımlılığına yönelik tedavi amaçlı ilaçlar) DNA hasarı oluşturup oluşturmadığı, sigara kullanılan dönemle karşılaştırılarak DNA üzerinde nasıl değişiklikler oluşturduğu araştırılabilir. Sigara bırakıldıktan sonraki aşamada, belirli periyotlarla alınan örneklerde, DNA hasarı ve tamir mekanizmaları yeniden değerlendirilebilir.

7. KAYNAKLAR

- Akbaş, E., Çelik, A., Derici, E., Söylemez, F., (2001). Sigara Kullanımının Lenfosit Yaşam Süresi ve Genotoksik Etkilerinin İncelenmesi.,*Geriatrici*, 4(1):15-18.
- Akıcı, N., Sigara Dumanına Maruz Kalan Pasif İçici Durumundaki Çocuklarda DNA Hasarının Araştırılması., Uzmanlık Tezi, *T.C. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği*, İstanbul, 2008. 70s.
- Albers, A.B., Siegel, M., Cheng, D.M., Rigotti, N.A., Biener, L. (2004). Effects of restaurant and bar smoking regulations on exposure to environmental tobacco smoke among Massachusetts adults, *Am. J. Public Health.*; 94(11):1959-64.
- Barcala. F.J.G., Takkouche, B., Valdés, L., Temes, E., Leis, R., Cabanas, R., Suárez, J.R.R., Tojo, R., (2007). Parenteral smoking and lung function in healthy children and adolescents. *Arch.Bronconeumol.*, 43(2): 81-85.
- Bonassi, S., Abbondandolo, A., Camurri., Dal Prá, L., De Ferrari, M., Degrassi, F., Forni, A., Lamberti, L., Lando, C., Padovani, P., Sbrana, I., Vecchio, D., Puntoni, R. (1995). Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italiancohort study,*Cancer Genet. Cytogenet.*,79: 133–135.
- Brusick, D., (1987). Principles of Genetic Toxicology, second ed.,*Plenum Pres*, New York and London.
- Choy, W.N., (2001). Genetic toxicology and cancer risk assessment, *Marcel Dekker*, New York, 29-187.
- Cloos, J., Steen, I., Timmerman, A.J., van der Schans, G.P., Snow, G.B, Braakhuis, B.J., (1996). DNA damage processing in blood lymphocytes of head and neck squamous cell carcinoma patients is dependent on tumor site.,*Int. J. Cancer*, 68(1): 26-29.
- Collins, A.R., (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations, *Mol. Biotechnol.*,26(3):249-261.

- Collins, A.R., Duthie, S.J., Dobson, V.L. (1993). Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA, *Carcinogenesis*, 14(9):1733-1735.
- da Silva, F.R., Erdtmann, B., Dalpiaz, T., Nunes, E., Ferraz, A., Martins, T.L., Dias, J.F., da Rosa, D.P., Porawskie, M., Bona, S., da Silva, J., (2013). Genotoxicity of *Nicotiana tabacum* leaves on *Helix aspersa*, *Genetics and Molecular Biology*, 36, 2, 269-275.
- De Bont, R. and Van Larebeke, N. (2004). Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data, *Mutagenesis*, 19(3): 169–185.
- De la Chica, R.A., Ribas, I., Giraldo, J., Egozcue, J., Fuster, C., (2005). Chromosomal instability in amniocytes from fetuses of mothers who smoke., *JAMA.*, 293(10):1212-22.
- Debeleş-Bütüner, B., Kantarcı, G., (2006). Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi, *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 35(2):149-170.
- DeMarini, D.M., (2004). Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review., *Mutat. Res. Nov*, 567(2-3):447-474.
- Demir, T., (2008). Sigara Bağımlılığı, *Türkiye’de Sık Karşılaşılan Psikiyatrik Hastalıklar Sempozyum Dizisi*, İstanbul, No:62 Mart sayısı S:231-238.
- Demirel, S. ve Zamani, A., (2002). Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları, *Genel Tıp Dergisi*, 12 (3): 123-127.
- Diñer, Y. ve Kankaya, S., (2010). DNA Hasarının Belirlenmesinde Comet Assay, *J. Med. Sci.*, 30(4):1365-1373.
- Diñer, Y., Saygılı, E.İ., Akçay, T., (2003). Sigaranın DNA Hasarı ve Kan Glutasyon Düzeyi Üzerine Etkisi, *T Klin. Tıp Bilimleri*, 23:108-111.
- Doll, R., Peto, R. (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today, *J. Natl. Cancer Inst.*, 66: 1191–1308.
- Elia, M.C., Storer, R.D., McKelvey, T.W., Kraynak, A.R., Barnum, J.E., Harmon, L.S., (1994). Rapid DNA degradation in primary rat hepatocytes treated with diverse cytotoxic chemicals: analysis by pulsed field gel electrophoresis and implications for alkaline elution assays. *Environ. Mol. Mutagen.*, 24(3):181-191.
- El-Zein, R.A., Monroy, C.M., Cortes, A., Spitz, M.R., Greisinger, A., Etsel, C.J., (2010). Rapid method for determination of DNA repair capacity in human peripheral blood lymphocytes amongst smokers *BMC Cancer*, 10:439.
- Ergün, A., (1998). Sigara ve Sistemik Etkileri, *T. Klin. J. Med Sci.*, 18(3): 159-163.

- Ezzati, M. and Lopez, A.D., (2003). Estimates of global mortality attributable to smoking in 2000. *Lancet*, 362:847-852.
- Fracasso, M., Doria, D., Franceschetti, P., Perbellini, L., Romeo, L., (2006). DNA damage and repair capacity by comet assay in lymphocytes of white-collar active smokers and passive smokers (non- and ex-smokers) at workplace., *Toxicology Letters*, 167: 131–141.
- Gedik, C.M., Ewen, S.W., Collins, A.R., (1992). Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells., *Int. J. Radiat. Biol.*, 62(3):313-320.
- Ginzkey, C., Friehs, G., Koehler, C., Hackenberg, S., Hagen, R., Kleinsasser, N.H., (2013). Assessment of nicotine-induced DNA damage in a genotoxicological test battery, *Mutation Research*, 751, 34–39.
- Giovino, G.A., (2007). The tobacco epidemic in the United States. *Am. J. Prev. Med.*, 33(6Suppl):318-326.
- Green, M.H., Lowe, J.E., Delaney, C.A., Green, I.C., (1996). Comet assay to detect nitric oxide-dependent DNA damage in mammalian cells., *Methods Enzymol.*, 269:243-266.
- Hang, B., Sarker, A.H., Havel, C., Saha, S., Hazra, T.K., Schick, S., Jacob, P. 3rd, Rehan, V.K., Chenna, A., Sharan, D., Sleiman, M., Destailats, H., Gundel, L.A., (2013). Thirdhand smoke causes DNA damage in human cells, *Mutagenesis* vol. 28 no. 4 pp. 381–391.
- Hedner, K., Högstedt, B., Kolnig, A.M., Mark-Vendel, E., Strömbeck, B., Mitelman, F., (1983). Sister chromatid exchanges and structural chromosome aberrations in relation to smoking in 91 individuals., *Hereditas*, 98(1):77-81.
- Herrera, M., Dominguez, G., Garcia, J.M., Peña, C., Jimenez, C., Silva, J. (2009). Differences in repair of DNA cross-links between lymphocytes and epithelial tumor cells from colon cancer patients measured in vitro with the comet assay., *Clin. Cancer Res.*, 15(17):5466-5472.
- Hoffmann, H., Hogel, J. and Speit, G., (2005). The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis., *Mutagenesis*, vol. 20 no. 6 pp. 455–466.
- Kaleli, S., (2010). Sigaranın Sağlık Üzerine Zararlı Etkileri, *Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi*, Cilt:5, Sayı:14.
- Karlıkaya, C., (2004). Sigara ve meslek. *Solunum*, Ankara, 6(6):262-275.
- Karlıkaya, C., Öztuna, F., Solak, Z.A., Özkan, M., Örsel, O., (2006). Tütün kontrolü., *Toraks Dergisi*, Ankara, 7(1):51-64.
- Kayaalp, S.O. ve Güven, H., (2005). Nikotin ve diğer ganglion stimüle ediciler, sigara ve sağlık, ganglion bloke edici ilaçlar, Kayaalp Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi

- Farmakoloji, , *Kayaalp, S.O. ed, Hacettepe-Taş*, Ankara, 2.Cilt s:106-1016. Onbirinci baskı
- Kontaş, S., Şekeroğlu, Z.A., Şekeroğlu, V., (2011). Kardeş kromatid değişimi testi ve kullanım alanları, *Tübbak Bilim Dergisi*, Ankara, Cilt:4, Sayı:4, Sayfa: 226-234.
- Marks, D.I., Fox, R.M., (1991). DNA damage, poly (ADP-ribosyl)ation and apoptotic cell death as a potential common pathway of cytotoxic drug action. *Biochem. Pharmacol.*, 42(10): 1859-67.
- McKelvey, T.W., Martin, V.J., Green, M.H., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Méo, M.P., Collins, A., (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat. Res.*, 288(1):47-63.
- Michalska, J., Motykiewicz, G., Pendzich, J., Kalinowska, E., Midro, A., Chorazy, M., (1999). Measurement of cytogenetic endpoints in women environmentally exposed to air pollution. *Mutat. Res.*, 445(2):139-145.
- Mortelmans, K. and Zeiger, E., (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay, *Mutat. Res.*, 455: 29-60.
- Mukherjee, B., Dutta, A., Roychoudhury, S., Ray, M.R., (2013). Chronic inhalation of biomass smoke is associated with DNA damage in airway cells: involvement of particulate pollutants and benzene, *J. Appl. Toxicol.*, 33: 281–289.
- Nakayama, T., Kaneko, M., Kodama, M., Nagata, C., (1985). Cigarette smoke induces DNA single-strand breaks in human cells, *Nature*, Apr 4-10;314(6010):462-464.
- Olive, P.L., Frazer, G., Banáth, J.P., (1993). Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay, *Radiat. Res.*, 136(1):130-136.
- Öztuna, F., (2004). Sigaranın Hücresel Etkileri, *Toraks Dergisi*, Ankara, Akciğer arşivi, 2:111-116.
- Phillips, D.H., (2002). Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues. *Carcinogenesis*, 23(12):1979-2004.
- Piperakis, S.M., Visvardis, E.E., Sagnou, M. and Tassiou, A.M. (1998). Effects of smoking and aging on oxidative DNA damage of human lymphocytes. *Carcinogenesis*, 19, 695–698.
- Pluth, J.M., Ramsey, M.J., Tucker, J.D., (2000). Role of maternal exposures and newborn genotypes on newborn chromosome aberration frequencies. *Mutat. Res.*, 465(1-2): 101-111.
- Preston, R.J. and Hoffman, G.R., (2001). Genetic toxicology. Chapter:3/9. Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons. Sixth ed. *Klaassen CD. Ed. McGraw-Hill NY*; s:321-350.

- Rossner, P., Boffetta, P., Ceppi, M., Bonassi, S., Smerhovsky, Z., Landa, K., Juzova, D., Srám, R.J., (2005). Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer. *Environ. Health Perspect*, 113(5):517-520.
- Salonen, K. and Lahdetie, J., (1993). No effect of maternal smoking in early pregnancy observed on chromosome aberrations in chorionic villus samples. *Mutat. Res.*, 298(4):285-289.
- Sardas, S., Karahalil, B., Akyol, D., Kukner, S., Karakaya, A.E., (1995). The effect of smoking on sister chromatid exchange rate of newborn infants born to smoking mothers. *Mutat. Res.*, 341(4): 249-253.
- Sasikala, K., Rosalin, F.R., Jude, A.L.C., Kumar, R.A., Sudha, S., Devi, M.V., Balachandar, N., Beegam, K.A.S., Meenakshi, N.M., Begum, A., (2003). Active and passive smokers a haematobiochemical and cytogenetic study. *Int. J. Hum. Genet.*, 3(1):29-32.
- Satman, I., Yılmaz, T., Sengul, A., (2002). Population based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the Turkish Diabetes Epidemiology Study (TURDEP), *Diabetes Care*, 25:1551-1556.
- Shaposhnikov, S., Frengen, E., Collins, A.R., (2009). Increasing the resolution of the comet assay using fluorescent in situ hybridization a review. *Mutagenesis*, 24(5):383-389.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., (1988). "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells", *Exp. Cell Res.*, 175: 184-191.
- Söylemez, E., Kayaaltı, Z., Aliyev, V., Söylemezoğlu, T., (2012). Effect of cigarette smoking on DNA damage according to nine comet assay parameters in female and male groups. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 65 (1).
- Stephan, G. and Pressl, S., (1999). Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes from healthy subjects as detected in first cell division. *Mutat. Res.*, 446(2):231-237.
- Şekeroğlu, Z.A. ve Şekeroğlu, V. (2011). "Genetik Toksikite Testleri" *Tübbav Bilim Dergisi* Cilt:4, Sayı:3, Sayfa:221-229.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Mıyamae, Y., Rojas, E., Ryu, Jc., Sasaki, Yf. (2000). Single cell gel/ comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen*. 35: 206–221.
- Vanparys, P., Vermeiren, F., Sysmans, M., Temmerman, R., (1990). "The micronucleus assay as a test for the detection of aneuploid activity", *Mutat. Res.*, 244: 95-103.
- Vasquez, M., and Tice, R.R. (1997). Comparative analysis of apoptosis versus necrosis using the single cell gel (SCG) assay, *Environ. Mol. Mutagen.*, 29(suppl 28): 53

- Vineis, P., Hoek, G., Krzyzanowski, M., (2007). Lung cancers attributable to environmental tobacco smoke and air pollution in non-smokers in different European countries: a prospective study. *Environ. Health*, 6:1-7.
- Vineis, P., and Husgafvel-Pursiainen, K. (2005). Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis*, 26(11):1846-1855.
- WHO, (2002). Regional Office for Europe. European strategy for tobacco control, Copenhagen.
- WHO, (2008). Report on The Global Tobacco Epidemic, p:19.
- Wogan, G., Hecht, S., Felton, J., Conney, A., Loeb, L, (2004). Environmental and chemical carcinogenesis, *Semin. Cancer Biol.*, 14: 473-486.
- Wu, F.Y., Wu, H.D, Yang, H.L., Kuo, H.W., Ying, J.C., Lin, C.J., Yang, C.C., Lin, L.Y., Chiu, T.H., Lai, J.S, (2007). Associations among genetic susceptibility, DNA damage, and pregnancy outcomes of expectant mothers exposed to environmental tobacco smoke. *Sci. Total Environ.*, 386(1-3):124-33.
- Wu, H.J., Chi, C.W., Liu, T.Y., (2005). Effects of pH on Nicotine-Induced DNA Damage and Oxidative Stres, *Journal of Toxicology and Enviromental Health Part A:Current Issues* 68:17-18, 1511-1523.
- Yıldız, L. ve Kılıç, H., (2000). Sigaranın Klinik ve Biyokimyasal Etkileri, *T. Klin Tıp Bilimleri*, 20: 306-312.
- Zalata, A., Yahia, S., El-Bakary, A., Elsheikha, H.M., (2007). Increased DNA damage in children caused by passive smoking as assessed by comet assay and oxidative stress. *Mutat. Res.*, 629(2):140-147.
- Zhu, C.Q., Lam, T.H., Jiang, C.Q., Wei, B.X., Lou, X., Liu, W.W., Lao, X.Q. and Chen, Y.H., (1999). Lymphocyte DNA damage in cigarette factory workers measured by the comet assay. *Mutat. Res.*, 444, 1-6.

Ek 1.

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR BELGESİ

(Çalışma grubu için)

“SİGARA İÇEN KİŞİLERDE GENOTOKSİK HASARIN COMET YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ” isimli bir çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışma, araştırma amaçlı olarak yapılmaktadır. Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırmanın ne amaçla yapılmak istendiğini ve nasıl yapıldığını, sizinle ilgili bilgilerin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neler içerdiğini bilmeniz önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okuyun ve sorularınıza açık yanıtlar isteyin. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir.

- **Çalışmanın amaçları ve dayanağı nelerdir, benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?**

Bu çalışmada söz konusu mutajenik riskin oluşup oluşmadığının tespitine yönelik olarak; son yıllarda geliştirilen ve DNA'daki çok küçük harabiyetlerin bile hassas biyogöstergesi olduğu kabul edilen ve kısa sürede yanıt alınan Comet inceleme tekniği ile sigara içmeyen sağlıklı kişilerle, sigara içen kişilerin DNA hasarı bakımından karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Araştırmaya dahil edileceklerin gruplandırması aşağıdaki şekildedir.

Gönüllülerin Niteliği ve Sayıları

I. Grup (Sigara içen yetişkinler): Bilinen herhangi bir kronik rahatsızlığı bulunmayan ve halen herhangi bir ilaç kullanmayan, 20yaş üstü kadın ve erkek gönüllüler :30 kişi

II. Grup (Sigara içmeyen sağlıklılar):

Yaşadığı evde sigara içicisi olmayan, bilinen herhangi bir kronik rahatsızlığı bulunmayan ve halen herhangi bir ilaç kullanmayan, 20 yaş üstü kadın ve erkek gönüllüler :20 kişi

Bu araştırma tek merkez tarafından yürütülen multidisipliner bir çalışmadır.

Multidisipliner araştırmaya katılan birimler :

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı

- **Bu çalışmaya katılmam mıyım?**

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Eğer katılmaya karar verirseniz bu yazılı bilgilendirilmiş olur formu imzalamanız için size verilecektir. Şu anda bu formu imzalaranız bile

istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Eğer katılmak istemezseniz veya çalışmadan ayrılırsanız, doktorunuz tarafından size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

- **Bu çalışmaya katılırsam beni neler bekliyor?**

Hasta Seçimi: Tüm kişiler göğüs hastalıkları uzmanı tarafından incelenecek ve kaydedilecektir. Sigara içme alışkanlığı olan, en az 10 adet/gün sigara içen gönüllülerden 5 ml venöz kan örneği alınacaktır. Bu kişilerle benzer sosyodemografik özelliklere sahip ancak sigara içmeyen gönüllüler ise kontrol grubunu oluşturacaktır. Bu kişilerde de araştırmanın veri toplama süreci, sigara içen gruplardakiyle aynı şekilde planlanacaktır. Ailesinde herhangi bir kalıtsal hastalığı bulunanlar araştırmaya alınmayacaktır.

Zamanlama çizelgesi:

-

YAPILACAK İŞ	AYLAR												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Literatür Taraması	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Örneklem seçimi, Materyal temini ve Deneysel Çalışma		*	*	*	*	*	*	*	*				
Verilerin Değerlendirilmesi									*	*	*		
Sonuç ve RAPOR											*	*	

-

- **Çalışmada yer almamın yararları nelerdir?**

Araştırmadan tıbbi olarak bir yarar sağlaması söz konusu değildir; yalnızca araştırma amaçlıdır ve doğrudan yarar görülmesi ya da tedavinin seyrinin değiştirilmesi beklenmemelidir.

- **Bu çalışmaya katılmamın maliyeti nedir?**

Çalışmaya katılmakla herhangi bir parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

- **Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak?**

Araştırmacılarımız kişisel bilgilerinizi; araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ve kimlik bilgileriniz çalışma boyunca araştırmacılarımız tarafından gizli tutulacaktır. Çalışmanın sonunda, araştırma sonucu ile ilgili olarak bilgi istemeye hakkınız vardır. Yazılı izniniz olmadan, sizinle ilgili bilgiler başka kimse tarafından görülemez ve açıklanamaz. Çalışma sonuçları çalışma tamamlandığında bilimsel yayınlarda kullanılabilir, ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

- **Daha fazla bilgi, yardım ve iletişim için kime başvurabilirim?**

Çalışma ile ilgili bir sorunuz ya da çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğunda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI :

GÖREVİ : TELEFON :

(Gönüllünün/Hastanın Beyanı)

PAÜ TF Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında, Doç. Dr. Ayşe Gaye Tomatır tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili **yukarıdaki bilgiler** bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

- a. Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi. Bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.
- b. Sorumlu araştırmacı/hekime haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim. Bu çalışmaya katılmayı reddetmem ya da sonradan çekilmem halinde hiçbir sorumluluk altına girmeyeceğimi ve bu durumun şimdi ya da gelecekte gereksinim duyduğum tıbbi bakımı hiçbir biçimde etkilemeyeceğini biliyorum.*(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemin uygun olacağını bilincindeyim).*
- c. Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı/hekim, çalışma programının gereklerini yerine getirme konusundaki ihmali nedeniyle tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabilir.
- d. Çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak, bu tür durumlarda kimliğim kesin olarak gizli tutulacaktır.
- e. Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili olarak herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.
- f. Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Görüşme tanığı

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Bilgilendiren Araştırmacı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Ek 2.

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR BELGESİ
(Sağlıklı kontrol grubu için)

Doç. Dr. Ayşe Gaye Tomatır'ın sorumlu araştırmacısı olduğu, SİĞARA İÇEN KİŞİLERDE GENOTOKSİK HASARIN COMET YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ" isimli bir araştırma yapılması planlanmaktadır.

Çalışmanın amacı söz konusu mutajenik riskin oluşup oluşmadığının tespitine yönelik olarak; son yıllarda geliştirilen ve DNA'daki çok küçük harabiyetlerin bile hassas biyogöstergesi olduğu kabul edilen ve kısa sürede yanıt alınan Comet inceleme tekniği ile sigara içmeyen sağlıklı kişilerle, sigara içen kişilerin DNA hasarı bakımından karşılaştırılmasıdır.

Bu çalışmanın bilimsel olarak yürütülebilmesi için, araştırmaya katılan hasta kişiler dışında, sağlıklı kişilerden 5 ml kan alınmasına gereksinim vardır. Bu sayede, hasta kişilerin verileri, siz sağlıklı kişiler ile karşılaştırılabilecektir.

Bu çalışmaya, "**sağlıklı kontrol grubu**" olarak katılmayı kabul ederseniz, sizden istenen tek şey, bir kez 5 ml kan vermenizdir.

Vereceğiniz kanda, DNA hasarı araştırılacaktır. Araştırmamız sizden elde edilen sonuçları, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimliğiniz gizli tutulacaktır.

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Eğer katılmaya karar verirsiniz bu yazılı bilgilendirilmiş olur formu imzalamanız için size verilecektir.

(Katılımcının Beyanı)

PAÜ TF Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında, Doç. Dr. Ayşe Gaye Tomatır tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili **yukarıdaki bilgiler** bana aktarıldı ve ilgili metni okudum.

Bu koşullarla "sağlıklı kontrol grubu" olarak, bir kez, 5 ml kan vermeyi kabul ediyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı:

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih: Katılımcı ile görüşen araştırmacı:

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel:

İmza: Tarih:

ÖZGEÇMİŞ

Elif Gülşah Karahan, 9 Kasım 1983 tarihinde Denizli'de doğdu. İlköğrenimini Mareşal Fevzi Çakmak İlkokulu'nda, orta öğrenimini Atatürk Ortaokulu'nda, lise öğrenimini Cumhuriyet Lisesi Yabancı Dil Ağırlıklı Programında tamamladı. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü'nden 2008 yılında lisans diplomasını aldı. Yüksek lisans eğitimine 2011 yılının Ocak ayında Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda başladı.