



T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**REPRODUKTİF ve MENOPOZAL DÖNEM SERVİKAL YAYMA
ve KAN ÖRNEKLERİNDE DNA HASAR TESPİTİNİN
MİKRONÜKLEUS ve KOMET TESTLERİ ile
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Okan SANCER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

I. DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR

II. DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Zehra SAFİ ÖZ

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi tarafından 4500-YL1-15 proje numarası ile desteklenmiştir.**

Tez. No: 139

ISPARTA-2016

KABUL ve ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji**
Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma,
aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 12/07/2016

Tez Danışmanı

: Yrd. Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR

Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji
AD

Üye

: Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK

Üye

: Yrd. Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR

Üye

: Yrd. Doç. Dr. Mustafa SOYÖZ

ONAY: Bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri
üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.


Doç. Dr. Mustafa KAYAN
Enstitü Müdürü

BEYAN

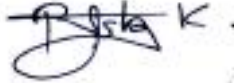
Bu tez çalışmamın kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışım olmadığını, bu tezdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tezi Hazırlayan
Okan SANCER



Tez I. Danışman

Yrd. Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR



Tez II. Danışman

Yrd. Doç. Dr. Zehra SAFİ ÖZ



ÖNSÖZ

Yaşlanma insan yaşamında olduğu kadar bütün varlıkların belirli bir dönemini kapsamaktadır. Yaşlanan insanda fiziksel değişimlerin yanı sıra metabolik ve psikolojik yapısında da değişimler olmaktadır. Dolayısıyla hormonal ve metabolizma yapısında meydana gelen değişiklikler yaşlı kişilerde bazı sağlık sorunlarını ortaya çıkarmaktadır. Günümüzde artan kanser hastalıkları ise bunun başında gelmektedir.

Yaşlanma ile birlikte artan oksidatif stres, hormon değişimleri ve çeşitli faktörler DNA hasarına yol açabilmektedir. DNA hasarının önlenmesi yaşlanmayla beraber meydana gelen sağlık sorunlarının en aza indirgenmesinde ve sağlıklı bir yaşamın sürdürülebilmesinde son derece önemlidir.

Reproduktif ve menopoz döneminde bulunan kişilerde yaşlanma, yaşlanmayla artan oksidatif stres ve estrogen, progesteron gibi çeşitli hormon seviyelerindeki değişimler ile DNA hasarı meydana gelmektedir. Çalışmamızda hastalardan alınan kan ve servikal yayma örneklerinde yaşlanmayla görülebilen DNA hasarını tespit etmeye çalıştık. DNA hasar tespitinde hala altın standart olarak kullanılan, Mikronükleus ve Comet testleri maliyetinin oldukça düşük olması ve kısa sürede sonucun belirlenmesi ile hastaların erken dönemde tedavi olmalarına imkan sağlaması amacı ile kullanılmıştır. Çalışmamızın literatüre katkı sağlayacağı ve ileride yapılacak olan yeni çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

Okan SANCER
Isparta, 2016

TEŞEKKÜR

Hoşgörüsü ve desteği ile her konuda bana yardımcı olan, engin tecrübe ve bilgilerinden yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK'e, her konuda yardım ve bilgilerini esirgemeyen Doç. Dr. Nilüfer ŞAHİN CALAPOĞLU hocama, beni yüksek lisansta danışmanlığına kabul eden, tez süresi boyunca hakkını ödeyemeyeceğim iyilikleri ve desteği ile her konuda bana yardımcı olan, bilimsel çalışmanın gereklerini öğreten değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR'a, ve eş danışmanım Yrd. Doç. Dr. Zehra SAFİ ÖZ'e, gerekli materyallerin toplanmasında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Esra Nur TOLA'ya, istatistik değerlendirmelerinde yardımcı olan Doç. Dr. Mustafa CALAPOĞLU'na ve ismini sayamadığım tüm Tıbbi Biyoloji ve Genetik ailesine çok teşekkür ederim.

Ayrıca, her adımında yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen anneme, babama ve kardeşime teşekkürü bir borç bilirim. Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi BAP Koordinasyon birimi tarafından 4500-YL1-15 proje numarası ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI	i
BEYAN	i
ÖNSÖZ	ii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kadın Yaşamının Dönemleri	4
2.2. Reprodüktif ve Menopozal Dönemde Meydana Değişimler	6
2.3. Kadın genital organ sitolojisi	10
2.4. DNA Hasarı	12
2.5. DNA Hasarına Neden Olan Etkenler	13
2.6. Mutasyon	13
2.7. DNA Hasarının Hücrede Oluşturduğu Yanıtlar	15
2.8. DNA Hasar Tespit Yöntemleri	16
2.8.1. Comet Metodu ve Tarihsel Gelişimi	16
2.8.2. Comet Testinin Kullanım Alanları	18
2.8.3. Mikronükleus Tekniği ve Tarihi Gelişimi	19
2.8.4. Mikronükleus Tekniği Kullanım Alanları	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM	23
3.1. Örneklerin Alınması	23
3.2. Comet Metodunda Kullanılan Çözelti ve Lamların Hazırlanması	24
3.3. Comet Analizi Basamakları	26
3.3.1. Hücresel Materyalin Hazırlanması	26
3.3.2. Mikroskop Lamlarının Hazırlanması	26
3.3.3. Lizis	27
3.3.4. Alkali Ortamda DNA Süperkoil Yapısının Açılması ve Elektroforez	27

3.3.5. Nötralizasyon.....	27
3.3.6. Lamların Boyanması	27
3.3.7.Lamların Değerlendirilmesi	28
3.4. İstatistiksel Analiz	30
3.5. Mikronükleus Yönteminde Kullanılan Boya ve Lamların Hazırlanması	30
4. BULGULAR.....	32
5. TARTIŞMA.....	44
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	47
ÖZET	49
ABSTRACT.....	50
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ.....	58
EK.....	59
Etik Kurul Kararı.....	59

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BN: Binükleus

DMSO: Dimetilsülfoksit

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit

E₂: Estradiol

FSH: Folikül Stimulan Hormon

KR: Karyoreksiz

LH: Luteinizan Hormon

LDL: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

LMA: Düşük Erime Noktalı Agaroz

µl: Mikrolitre

Mm: MiliMolar

MN: Mikronükleus

NaOH: Sodyum Hidroksit

Na₂EDTA: Sodyum Etilendiamin Tetraasetik Asit

NMA: Normal Erime Noktalı Agaroz

NPB: Nükleoplazmik Köprü

PAP: Papanicolaou

PBS: Fosfat Tamponu

pH: Power of Hydrogen

Rpm: Dakikadaki Dönüş Sayısı

ROM: Reaktif oksijen Metabolitleri

ROT: Reaktif Oksijen Türleri

TNSA: Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırmaları

TÜİK: Türkiye İstatistik Kurumu

UV: Ultra Viyole

%: Yüzde

8-OHdG: 8- Hidroksi-2-deoksiguananin



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Menopoz ve Yaşlanmaya bağlı olarak kadında görölen yakınmalar.....	7
Tablo 2. Stok Fosfat Tamponunun Hazırlanması.....	24
Tablo 3. Stok Lizis Çözeltisinin Hazırlanışı.....	25
Tablo 4. Alkali Elektroforez Tamponunun Hazırlanışı	25
Tablo 5. Papanicolaou boyama yöntemi.....	31
Tablo 6. Çalışma kapsamındaki tüm hastaların jinekolojik yakınmaları ve yüzdeleri	37
Tablo 7. Çalışma kapsamındaki tüm hastaların klinik bilgileri ve yüzdeleri	37
Tablo 8. Reprodüktif, Menopoz ve kontrol gruplarına ait kuyruk uzunluğu karşılaştırması	39
Tablo 9. Reprodüktif, Menopoz ve kontrol, gruplarına ait Kuyruk DNA Yüzdesi karşılaştırması	40
Tablo 10. Reprodüktif, Menopoz ve kontrol gruplarına ait Kuyruk Momenti karşılaştırması	41
Tablo 11. Reprodüktif ve Menopoz gruplarına ait Binökleus(BN), Mikronökleus(MN) ve Karyoreksiz (KR) parametrelerine ait istatistiksel değerler	43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Kadın yaşamı dönemleri	4
Şekil 2. Epitel hücrelerin farklılaşması	11
Şekil 3. Comet metodu basamakları	17
Şekil 4. Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MN'ler	19
Şekil 5. MN içeren binükleat hücrenin oluşumu.....	20
Şekil 6. Mikronükleus ve nükleoplazmik köprü oluşumları	21
Şekil 7. Comet Testinde Kullanılan Parametreler.....	28
Şekil 8. Comet Hasar Derecelerinin Sınıflandırılması.....	29
Şekil 9. Kontrol Grubunda 6 Numaralı Bireye Ait Hasarsız Comet.....	32
Şekil 10. Menopoz Grubunda 83 Numaralı Bireye Ait 1. Derece Hasarlı Comet	33
Şekil 11. Menopoz Grubunda 5 Numaralı Bireye Ait 4. Derece Hasarlı Comet	33
Şekil 12. 17 Nolu Hastaya Ait Mikronükleus İçeren Çok Katlı Epitel Hücresi	34
Şekil 13. 20 Nolu Hastaya Ait Binükleus (BN) İçeren Çok Katlı Epitel Hücresi	34
Şekil 14. 22 Nolu Hastaya Ait Karyoreksiz (KR) İçeren Çok Katlı Epitel Hücresi	35
Şekil 15. 18 Nolu Hastaya Ait Epitel Hücresi (E) ve Döderlein Basilleri (D)	35
Şekil 16. Çalışma kapsamındaki hastaların yaş ortalamaları	38
Şekil 17. Reprodüktif, Menopoz ve kontrol, gruplarına ait ortalama kuyruk uzunluğu	39
Şekil 18. Reprodüktif, Menopoz ve kontrol gruplarına ait ortalama Kuyruk DNA Yüzdesi. 40	
Şekil 19. Reprodüktif, Menopoz ve kontrol gruplarına ait ortalama Kuyruk Momenti.....	42

1. GİRİŞ

İnsanlığın varoluşundan itibaren toplumun ana unsuru kadındır (1). Bir toplumun sağlıklı olabilmesi için öncelikle sağlıklı nesillere gereksinim vardır (2) Genetik bilginin taşınarak, nesilden nesile aktarılmasını sağlayan Deoksiribonükleik Asit (DNA) üzerinde sürekli hasar meydana gelmektedir. Meydana gelen hasar DNA onarım sistemleri tarafından onarılmakla birlikte, hasarın çok fazla olduğu veya onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda, DNA sekans değişiklikleri, (3) kromozom aberasyonları ile sonuçlanabilen tek veya birden fazla nükleotid değişiklikleri ve bunların sonucu olarak da rekombinasyon, mutasyon, doku hasarı, yaşlanma ve kanser oluşabilmektedir (4).

Aerobik organizmalarda oksijen kullanımının doğal sonucu olarak; başta mitokondrial elektron transportu olmak üzere, doğal uyaranlara karşı fagositik aktivasyon, biyosentez ve yıkım gibi olaylar sırasında reaktif oksijen metabolitleri (ROM) meydana gelmektedir. Organizmanın yapısal ve fonksiyonel biyomoleküllerinin oksidatif stres altına girmesi ise ROM oluşumuna yol açmaktadır. Zaman içerisinde çeşitli nedenlerden dolayı lipidler, karbohidratlar ve proteinler gibi insanın her hücresindeki DNA, günde yaklaşık 10.000 kez serbest radikal saldırısına maruz kalmaktadır. Serbest radikaller, DNA yapısındaki deoksiriboz fosfat iskeletinde hasara, pürin ve pirimidin bazların spesifik modifikasyonuna ve DNA-protein çapraz bağlanmalarına neden olmaktadır. Deoksiriboz iskeletinin oksidasyonu; baz salınımını ve DNA zincir kırıklarını indüklerken, oksidatif baz modifikasyonları mutasyonlara yol açabilmektedir (5).

Menopozda ilerleyen yaşa bağlı olarak; serbest radikal oluşum miktarındaki artış, antioksidatif savunmalardaki azalma ve zarara uğramış moleküllerin uzaklaştırılmaması veya bu moleküllerin tamirindeki azalmalar, oksidatif stres miktarında artışa neden olmaktadır (6). Oksidatif stres, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup sonuçta doku hasarına neden olmaktadır (7). Ortalama insan ömrünün son yüzyılda arttığı ve menopoz yaşının sabit kaldığı göz önüne alınacak olursa, kadınların

yaşamının büyük bir bölümünü postmenopozal dönemde geçireceği açıktır (8). Menopozal dönemde kadınların sosyoekonomik durum, stresli yaşam olayları ve menopozla ilişkin olumsuz inanışları menopoz dönemini kadın için daha zor hale getirebilmektedir (9). Menopoz da hormon dengesinin değişmesi sonucu overlerden steroidlerin salgılanmasının azalması, estrogen yapımının yavaş yavaş azalarak sonuçta reproduktif dönemde görülen siklik kanamaların kesilmesiyle sonuçlanır. Kadınlar reproduktif dönem boyunca estrogenin olumlu etkisi nedeniyle birçok sağlık problemlerinden korunurlar. Menopoz döneminde ovaryumda artık estrogen yapılmaması, hormonun etkili olduğu sistemlerde yıkıcı etkilere yol açar. Estrogen düzeyindeki değişim doğrudan veya dolaylı olarak diğer hormon düzeylerini ve metabolizmayı da etkiler. Estrogenin azalması ile birlikte vajinada alkalik pH oluşur ve vajen florası bozulur (1). Florada bulunan laktobasillerin (Döderlein basiller) azalması sonucunda patojen mikroorganizmaların vajende kolonizasyon riski artar. “Bakteriyel diskordans” denilen bu olayla beraber vajinal enfeksiyon görülebilir (10,11).

Son yıllarda tıp ve biyoloji alanlarında geliştirilen ‘Tek Hücre Jel Elektroforez’ / ‘Comet Analizi’ ve Mikronükleus gibi yöntemler sayesinde DNA’da hasar olup olmadığı, varsa hasar seviyelerinin anlaşılması mümkün hale gelmiştir (12). ‘Tek Hücre Jel Elektroforez’ ya da ‘Comet analizi’ tekniğinde hücreler, agaroz jelle kaplı olan lamplara gömülür. Bu hücreler yüksek tuz tamponu ve deterjanlar tarafından lizis edilir. Nötral koşullar altında kromatinler elektroforez yöntemiyle serbest kalır. DNA; floresan boya ile boyandıktan sonra (ethidium bromide) “kuyruk” ve “baş” yapılarının oluşturduğu bir comet meydana gelir (13). Zincir kırılmasıyla oluşan baş ve kuyruktaki DNA miktarı orantılıdır. Bu yöntem hemen hemen tüm ökaryot hücrelerinde özellikle DNA’da erken ortaya çıkan ya da tamir edilememiş hasarları bulmaya yardımcı olur (14).

Mikronükleus analiz yöntemi ise; herhangi bir mutajene maruz kalan lenfosit hücrelerinde meydana gelen disentrik kromozomlar, asentrik parçaları veya mitotik iğdeki hatalar nedeniyle kutuplara çekilemeyen kromozomların sitoplazmada yoğunlaşması sonucu oluşan ana nükleusun dışında fakat nükleus yapı ve boyanma özelliklerini yansıtan küçük küresel yapıların belirlenmesi olarak bilinmektedir (15).

Servikal yaymalarda epitel hücrelerinin enfeksiyon etkenleri, mikronükleus ve diğer hücresel değişiklikler açısından ışık mikroskobu ile değerlendirilebilmektedir (16).

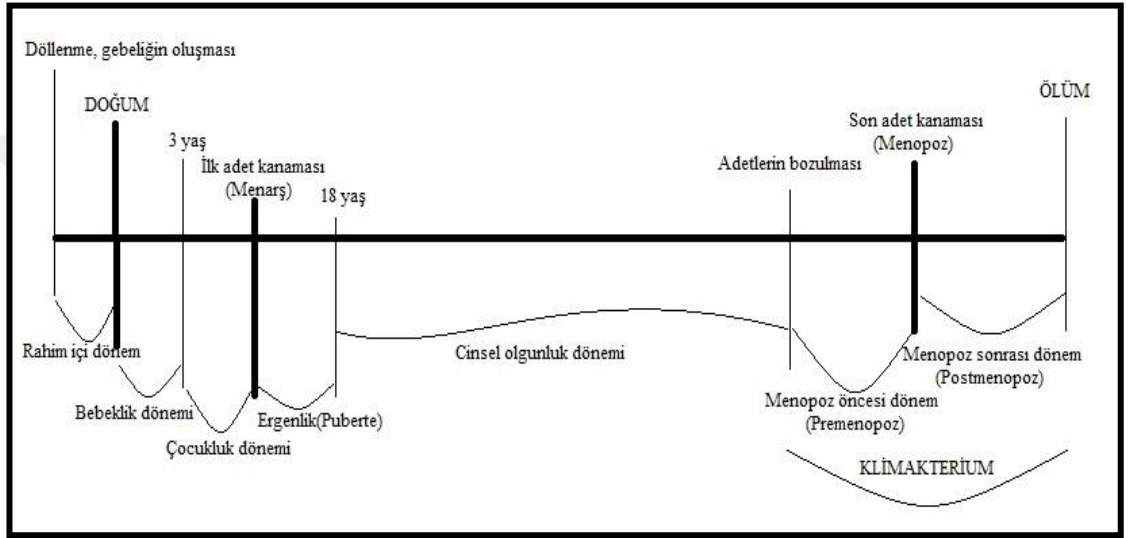
Bu çalışmada reproduktif dönem ve menopoz döneminde olan hastaların servikal epitel hücrelerinde, mikronükleus ve diğer nükleer değişikliklerin ışık mikroskopik değerlendirilmesi (karyoreksiz, karyolizis, karyopiknozis vb.) ayrıca kandaki lökosit hücrelerinde olması muhtemel DNA hasarının Comet analiz yöntemiyle değerlendirilmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kadın Yaşamının Dönemleri

İnsan yaşamı bir süreç olarak düşünüldüğü zaman bu süreç belirli dönemlere ayrılarak incelenir. Çünkü her dönem farklı özellikler gösterir ve her dönemde insan fiziksel ve duygusal gelişimler içerisindedir (8).



Şekil 1. Kadın yaşamı dönemleri (Aydemir İH., 2007)

Kadın hayatı, kesin sınırları olmamakla birlikte beş dönemde incelenebilir.

A- Çocukluk Dönemi 0-8 yaş

Çocukluk dönemi büyüme süreci olduğu için bu dönemde enerji ve protein gereksinimi yüksektir. En hızlı büyüme çağı en çok enerji harcanan zamandır ve vücut dokularının büyümesi sürekli protein sentezini gerektirdiğinden, vücut dokusuna en hızlı çevrilebilen kaliteli proteinin sağlanması zorunludur (8).

B- Ergenlik Dönemi 9-18 yaş (Puberte ve Adölesan)

Bu çağda, vücut biçiminde büyük değişiklikler meydana gelir. Kızlarda, dış genital organlarda ilk gelişme genellikle memelerde görülür. Bunlardan hemen sonra böbrek üstü bezinden üretilen androjen hormonlarının etkisiyle vulva ve pubik kılları, peşinden de koltuk altı kılları oluşmaya başlar. Bu dönemin en önemli olayı menarş adı verilen ilk menstruasyon kanamasının olmasıdır (8).

C- Cinsel Olgunluk Dönemi 19-49 yaş

Bu dönem yaklaşık 30 yılı yani kadının en üretken ve aktif olduğu yılları kapsar. Bu dönemde 400-500 kadar ovulasyon meydana gelir. Folikül oluşması, ovulasyon, korpus luteum oluşumu ve menstruasyon düzenli olarak devam eder ve anne olmanın sevinci de yine bu dönemde yaşanır (8).

D- Klimakterium ve Menopoz Dönemi 50-64 yaş

Yaş dönümü de denilen klimakterium kadının yaşlanma süreci içinde üreme çağından, üreme sonrası çağa geçişi gösteren bir evre olup 40 yaş civarında başlar ve 20 yıl kadar sürer. Diğer bir deyişle klimakterium, kadın yaşamının reproduktif dönemi ile yaşlılık dönemi arasında yer alan, beynin yaşlanması sonucunda overdeki morfolojik ve fonksiyonel değişimlere bağlı olarak hormonal dengenin farklılaşması sonucu ortaya çıkan semptomlar ile karakterize bir geçiş dönemidir (17). Klimakterium dönemi başlıca üç bölüm altında incelenmektedir (8).

A-Premenopoz: Bu dönemde, ovariumlar artık eski çalışma gücünü yavaş yavaş kaybeder. Menstrual siklus düzeni kaybolur ve fertilité şansı düşer. Düzensiz sikluslar birkaç ay veya birkaç yıl sürebilir (1).

B-Menopoz: Menopoz, kadınların üreme çağından, over fonksiyonlarındaki gerilemeye bağlı üreme yeteneğinin kaybolduğu çağa geçtiği bir yaşam dönemidir (18).

C-Postmenopoz: Menopozdan yaşlılık dönemine kadar geçen süredir (8). Bir kadının postmenopozal dönemde olabilmesi için 12 aylık amenore periyodunu tamamlamış olması gerekir. Bu dönemde artık vejetatif ve pisişik bozukluklar ortadan kalkar. Yaşlılığa bağlı olarak organik hastalıklar görülür (1).

E-Yaşlılık dönemi (64 yaş ve üzeri)

Yaşlılık organizmanın geriye dönüşü olmayan bir şekilde yıpranması ve işlevlerinin bozulmaya başlaması şeklinde tanımlamaktadır. Doku ve hücrelerdeki yaşlanma dikkate alınarak 64 yaş ve daha yukarı yaştaki bireylerin yaşlılık döneminde oldukları kabul edilir (1). Her dönemin kendine özgü özellikleri olmasına karşın, adolesan ve menopoz dönemleri kadın yaşamındaki etkileri ile en önemli dönemlerdir (18).

2.2. Reprodüktif ve Menopozal Dönemde Meydana Değişimler

Reprodüktif dönem kadının en üretken ve aktif olduğu yılları kapsar. Bu dönemde 400-500 kadar ovülasyon meydana gelir. Folikül oluşması, ovülasyon, korpus luteum oluşumu ve menstruasyon düzenli olarak devam eder ve anne olmanın sevinci de yine bu dönemde yaşanır (8). Bebeklik, çocukluk, ergenlik, yetişkinlik dönemlerinin kendine özgü fiziki ve duygusal özellikleri olduğu gibi menopoz döneminin de kendine özgü özellikleri bulunmaktadır (19). Vücutta değişen estrogen, progesteron ve diğer hormon düzeyleri ile ortaya çıkmaya başlayan sıcak basması, uyku bozuklukları, yorgunluk, duygu durum değişiklikleri, üriner ve cinsel sorunlar kadınların yaşam kalitesini olumsuz olarak etkilemekte (2) ve bu dönem, kadınlarda yaşlılığa geçişin en önemli başlangıç noktasını göstermektedir (19).

Menopoz, menstrual siklusların kesilmesinden sonraki dönemdir. İnsan yaşamı bir süreç olarak düşünülürse "menopoz dönemi" kadınlar için mutlaka geçirilecek olan dönemlerden birisini oluşturmaktadır. Postmenopoz ise bu noktadan sonraki yılları tanımlamaktadır. Menopozla beraber kadının over fonksiyonlarındaki gerilemeye bağlı olarak üreme yeteneği kaybolur (19-20).

Tablo 1. Menopoz ve Yaşlanmaya bağlı olarak kadında görülen yakınmalar (Aydemir İH., 2007).

Menopoza bağlı yakınmalar	Yaşlılığa bağlı yakınmalar
Duygu durum değişiklikleri ➤ Menopoz ve yaşlanma ile ilgili endişeler	Diyabetes mellitus
Vazomotor yakınmalar ➤ Sıcak basması ➤ Gece terlemeleri	Kas iskelet hastalıkları ➤ Osteoporoz ➤ Osteoartrit ➤ Dejeneratif kemik ve eklem hastalıkları
Genitoüriner sistem yakınmaları ➤ Vajinal kuruluk ➤ Üriner inkontinans ➤ Cinsel işlev bozuklukları	Duyu organları hastalıkları ➤ Katarakt ➤ Glokom ➤ İşitme problemleri
Yaşam kalitesinde azalma	Beyin ve sinir sistemi hastalıkları ➤ Serebrovasküler hastalıklar ➤ Parkinson hastalığı
Uyku bozuklukları	Kanserler
Kardiyovasküler hastalıklar	Kronik akciğer hastalıkları
	Kalp damar hastalıkları

Dünyada, menopoz yaşı yaklaşık 45-55 yaşları arasında iken ülkemizde 45-47 yaşlarında olduğu belirtilmektedir. 2008 yılı Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırmaları (TNSA) ülkemizde 48-49 yaş grubu kadınların %42'sinin, menopoza girdiğini göstermektedir, Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2009 verilerine göre kadınlarda beklenen yaşam süresi 76.1 yıldır. Ortalama yaşam süresindeki artışa paralel olarak 76 yıl yaşayacağı ön görülen bir kadın, ömrünün 1/3'lük dilimini estrojen, progesteron ve diğer çeşitli hormonların yapımından yoksun geçirmektedir (17-21).

Estrojenler, 18 karbonlu steroid hormonlardır. Estrojen kadınlarda, estradiol, estriol ve estron olmak üzere üç ana formda bulunur ve bir seri enzim reaksiyonları sonucu androjenlerden sentezlenmektedir. estradiol testosterondan, estron da androstenedion'dan sentezlenmektedir. Menarş ile menopoz arasında kanda bulunan

başlıca estrojen formu estradioldür (E_2). E_2 reseptörleri hem kadın üreme organlarında hem de vasküler duvarlarda bulunur. Böylece bu dokular da E_2 için hedef doku olmaya başlarlar. İnsan uterin damarları, safen venleri ve koroner arter duvarlarında bol miktarda E_2 reseptörleri bulunmaktadır (22). Estradioldan daha zayıf etkili olan estron, menopoz sonrası dönemde daha fazla miktarda bulunur (23). Estrojenin, DNA molekülüne bağlanma yeteneğinde olduğu bilgisine 1960-1970'lerde metabolik aktivasyon mekanizmasının çözülmesinden sonra ulaşılmıştır. Radyoaktif etiketli sentetik estrojenler ya da doğal hormonlar kullanılarak estrojen/estrodolün DNA ipliğinde ve proteinlerde yer aldığı bilgisine ulaşılmıştır (24).

Hipotalamus-hipofiz-gonad eksenindeki değişimler premenopoza ilişkin menstruel düzensizlikten sorumludur. Bugünkü bilgilerimize göre overler gittikçe yaşlandığı için over foliküllerinden kaynaklanan steroid yapımında azalma başlar. Estrojen üretiminin azalmasıyla birlikte önce Folikül Stimulan Hormon (FSH), daha sonra da Luteinizan Hormon (LH) yükselir. FSH yükselmesine bağlı folliküler faz kısalmır, daha sonra overlerde foiküllerin çok fazla azalmasından dolayı FSH arttığı için folliküler faz uzar. Anovulatuvar sikluslar artar, oligomenore gelişir veya düzensiz kanamalar ortaya çıkar. Estrojenin daha da düşmesi ile menstrasyon kesilir ve postmenopozal dönem başlar. Yaş ilerledikçe over foliküllerinin giderek daha da azalmasıyla FSH'ın yanı sıra LH seviyelerinde de artış başlar. Overlerdeki estrojen üretimi menopoz sonrası devam etmemektedir. Bununla birlikte postmenopozda estrojen seviyeleri önemli ölçülerde olabilir, bu üretimin ana kaynağı androstenedion ve testosteronun ekstrasglanduler dokularda estrojene dönüşümüdür (17). Andstenedionun estrojene çevirim yüzdesi vücut ağırlığıyla ilişkilidir. Çünkü androjenlerin estrojene aromatisasyonu özellikle yağ dokuda gerçekleşir. Obez vakalarda hem yağ dokuda periferik aromatisasyon ile estrojene dönüşüm arttığından hem de seks hormon bağlayıcı globülin seviyesindeki düşmenin etkisiyle estrojen seviyeleri rölatif olarak arttığından endometirum kanseri daha sık görülmektedir. (17).

Normal metabolizma sırasında serbest radikaller vücutta sürekli olarak üretilmekte olup, bunun sonucunda membran fosfolipidlerinin peroksidasyonu, membran proteinlerinde, karbohidrat ve DNA moleküllerinde çeşitli hasarlar

meydana getirmektedir. Estrojenlerin, serbest radikal temizleyicilerinin fenol halkalarından hidrojen atomunu alma gücüne sahip olmasına bağlı olarak, membranlardaki fosfolipidlerin peroksidasyonunu ve düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonunu inhibe etmesi nedeniyle, anti-oksidatif etkileri olduğu rapor edilmiştir (22). Antioksidan enzim düzeylerindeki azalma ve/veya DNA onarım mekanizmalarında defekt olması oksidatif DNA hasarının artmasına yol açmaktadır . Oksidatif hasara bağlı olarak DNA’da tek ve çift dal kırıkları, abazik alanlar, baz modifikasyonları (baz katılımı, bazlarda yeniden düzenlenme), şeker hasarı meydana gelebilir (25).

Estrojen, vajen epitelinin proliferasyonu ve epitel hücrelerinde glikojen depolanmasını sağlamaktadır. Glikojenin toplanması da laktik asit oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Glikojenin enzimatik ve laktobasillerle yıkımı ile ortaya çıkan laktik asit vajen pH’sını 3.5-4.5’e düşürmektedir. Asidik ortam başta laktobasiller olmak üzere vajen florasının gelişimini uyarmaktadır (26). Laktobasillerin vajinayı patojenlerin kolonizasyonundan, epitele yapışmalarını engelleyerek ya da üremelerini inhibe eden maddeler salgılayarak koruduğuna inanılmaktadır (27). Ayrıca vajinanın normal florasında yaygın olarak bulunan laktobasiller, menopoz sonrası dönemde belirgin olarak azalmakta ve vajinada üropatojen mikroorganizmaların kolonizasyonu izlenmektedir. Bunun sonucu olarak patojen mikroorganizmalara karşı laktobasillerin bariyer görevi ortadan kalkmaktadır. Ayrıca süperficial hücrelerde azalma, parabazal hücrelerde ise artma görülür (17-28). Postmenopozal dönemde eströjen azlığı nedeniyle vajina epiteli incedir ve pH 6-8 arasındadır. Bu durumda özellikle bakteriyel enfeksiyonlara zemin hazırlayıcı bir faktördür. Ayrıca postmenopozal dönemde vajen dokusunda oluşan atrofi, vajenin travma ve enfeksiyonlara hassas hale gelmesine neden olmaktadır (26). Çeşitli tarama yöntemlerinin kullanımı sayesinde erken dönemlerde displazi henüz kansere dönüşmeden tespit edilebilmekte ve tedavi süreci daha basit hale indirgenebilmektedir (29).

2.3. Kadın genital organ sitolojisi

Vajina, ektoserviks, labia majör ve labia minör, çok katlı yassı epitelle kaplıdır ve burada bulunan epitel tabakası da bazal membran üzerinde yerleşim gösterir. Hormanlar tüm epitel hücre tabakalarına özellikle de endometrium ve çok katlı yassı, epitelin bulunduğu kısımları etkilemektedir. Çok katlı yassı epitel bazal, parabazal, intermediate, prekornifiye ve kornifiye olmak üzere beş hücre tabakasından meydana gelmektedir (30).

A) Bazal hücre tabakası: Bu hücre tabakası tek katlı küçük kübik hücrelerden meydana gelmiştir. Sitoplazmaları bazofilik, çekirdekleri oval ve iri görünümündedir. Aktif olarak mitoz bölünmenin gözlemlendiği bu hücre tabakası epitelin yenilenmesini sağlar. Bu tabakayı oluşturan hücreler bazal membrana sıkıca bağlandıkları için vajinal yaymalarda pek görülmezler (30).

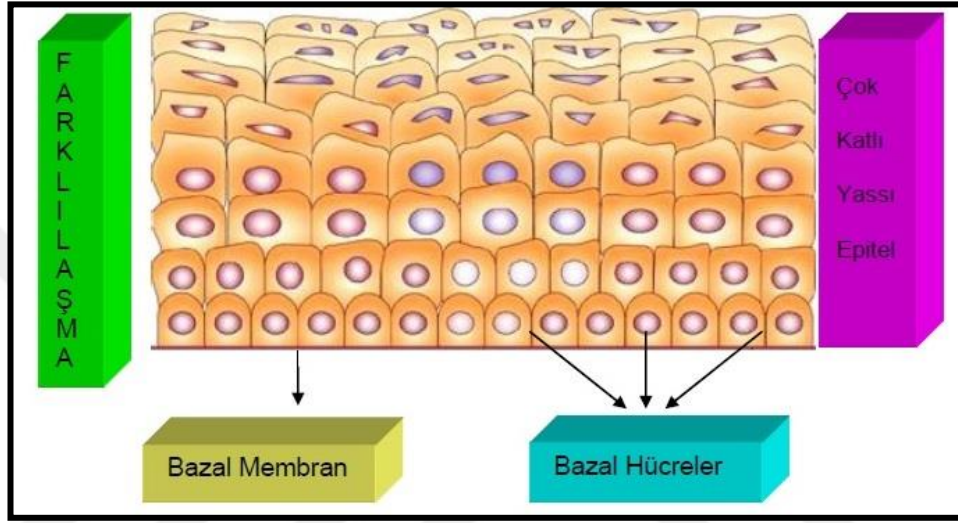
B) Parabazal hücre tabakası: Çok köşeli hücrelerden meydana gelmiştir. İki üç sıradan ibarettir. Hücre çekirdekleri ve çekirdekçikleri belirgindir. Sitoplazma bazofiliktir ve küçük vakuoller içerir. Bu hücre tabakasında hücreler birbirlerine sitoplazmik uzantılar yaparak köprü gibi yapılarla bağlanırlar, bol miktarda desmozom içerirler. Bu nedenle bu hücre tabakası histolojik olarak “stratum spinosum profundum” olarak da bilinmektedir (30).

C) İntermediate hücre tabakası : Bu tabakayı bol glikojen içeren, vakuollü ve bazofilik sitoplazmalı hücreler oluşturmaktadır. Hücreler yassılaştırmış, yuvarlak çekirdekli ve yüzeysel hücrelere göre daha iridir (30).

D) Prekornifiye hücre tabakası : Bu hücre tabakası birkaç kattan oluşur. Prekornifiye hücreler çok sıkı bir şekilde bir araya gelmiş ve yassılaştırmıştır. Koyu boyanan ve keratohiyalin olarak adlandırılan küçük granüller içeren hücrelerdir. Hücre merkezi glikojence zengindir (30).

E) Kornifiye hücre tabakası : “ Stratum corneum” olarak da bilinen bu hücre tabakasında kornifiye hücreleri mikroskopta sitoplazmaları ince ve eozinofilik boyanmış, hücre hacmi artmıştır. Çekirdekleri büzülerek kromatin detayı

göstermeyecek şekilde küçülmüş olarak görülürler. Bu tipteki hücre çekirdekleri ”piknotik çekirdek” adını alır. Bu tabakayı oluşturan hücreler yassılaştırılmış ve keratohiyalin miktarı, glikojen oranı, hormonal durum, enfeksiyon ve pH gibi faktörlere göre hücre morfolojisi değişiklik gösterir. Kornifiye hücre sitoplazmalarında zaman zaman görülen siyah nokta veya kahverengi granüllerin, lipid içerdiği ve östrojene bağlı olduğu belirtilmektedir (30).



Şekil 2. Epitel hücrelerin farklılaşması (Safi,2004).

2.4. DNA Hasarı

Genomik DNA'nın bütünlüğü, farklı DNA hasarlarına neden olan ultraviyole, X-ışınları, kimyasal bileşikler gibi çevresel ajanlar ile sürekli tehdit altındadır. Hücresel metabolizmanın yan ürünü olarak üretilen serbest radikaller gibi endojen ajanlar da DNA hasarına neden olmaktadır (31). Serbest radikaller oksijenden oluşan radikallerdir ve bunlara reaktif oksijen türleri (ROT) adı verilmektedir. Süperoksit anyonu, hidroksil radikali, nitrik oksit, lipid peroksit, hidrojen peroksit bilinen ROT'lerdir. Hücrede oksijenin %90'ı oksidatif fosforilasyonun merkezi olan mitokondrielerde tüketilir. Bunların % 2'si ROT adını alan ürünlere dönüşür. ROT, DNA, protein, lipidler ve yapılarıdaki tüm moleküllere saldırır. DNA molekül oksidasyonu ile hücre bölünmesinin durması, kontrolsüz büyüme, malignan hücrelerin oluşumu, lipid peroksidasyonu ile hücre membranının hasarı gerçekleşir (30). ROT'un neden olduğu 100'den fazla oksidatif DNA hasarı tanımlanmıştır (31). Bu hasara uğrayan bazlar arasında 8-hidroksi-2'- deoksiguanozin (8-OHdG) oldukça duyarlı ve en sık karşılaşılan oksidatif DNA hasarı belirteçidir (31, 32). Hücre tüm DNA hasarlarına farklı metabolik yollar ile cevap verir. Ağır DNA hasarları apoptoz yolunu aktive ederek hücreyi ölüme götürmesinin yanı sıra, hücre DNA hasarlarını, DNA tamir mekanizmaları ile onarabilmektedir. DNA hasarı replikasyon sırasında tamir edilemezse mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa neden olur. DNA'da birçok özgün değişimi içine alan genomik kararsızlık, hem kanserin hem de yaşlanmanın önemli bir nedenidir (31).

Bakteri, maya ve memeli hücrelerinde zincir kırıklarını kantitatif olarak değerlendiren nötral veya alkali şartlarda DNA hasarını ölçen bir çok metod tanımlanmıştır. Nötral şartlarda DNA çift zincir yapısını korumakta ve bu nedenle sadece çift zincir kırıkları saptanabilmektedir. Alkali şartlara bağlı metotlarda, çift zincir DNA'da açılma olayı gerçekleşmekte ve çift zincir kırıkları, tek zincir kırıkları ve alkali labil bölgeler saptanabilmektedir (33).

2.5. DNA Hasarına Neden Olan Etkenler

A. Endojen (spontan) Etkenler

1. Yanlış eşleşmeler, insersiyon/delesyonlar
2. Kimyasal değişiklikler: deaminasyon, metilasyon
3. Baz kayıpları: depurinasyon/depirimidasyon
4. Oksidatif Hasar: 100.000 /hücre/gün
5. Replikasyon hataları

Deamine bir bazın onarılamaması durumunda nokta mutasyonları görülebilir. DNA'dan her gün yaklaşık 5000 pürin bazı (adenin ve guanin) glikozil bazıları hidrolize olduğu için kaybolur. Bu olaya depurinasyon adı verilir. Benzer şekilde DNA dizisinde sitozinin urasile deaminasyonu günde yaklaşık 100 baz çiftini etkiler. Endojen etkenlerle oluşan hasar onarılmaz ise somatik mutasyonlar ortaya çıkar (34).

B. Ekzojen (çevresel) Etkenler

1. Kimyasal ajanlar: aflotoksin, benzopren, kemoterapi ilaçları, alkilleyici ajanlar, vinil klorid, mustard gazları v.b
2. Fiziksel ajanlar: UV radyasyon, iyonize radyasyon vb (34).

2.6. Mutasyon

Mutasyon; gen ya da kromozomda meydana gelen kalıcı kalıtılabilir sonuçlara yol açan değişikliklerdir. Herhangi bir genin, bir kromozom üzerinde yerleştiği bölge, lokus olarak adlandırılır. Her gen, biri anneden diğeri babadan gelen ve allel olarak adlandırılan, iki alternatif kopyadan oluşur. Genleri, DNA dizileri oluşturur ve sıklıkla protein olan ürünleri, hücre yapısı, fonksiyonlarının düzenlenmesi, enzim aktivitesi ve metabolik yolların kontrolünde rol oynar (35).

Mutasyonlar, somatik ve kalıtsal mutasyonlar olarak ikiye ayrılır:

Somatik mutasyonlar: Üreme hücreleri dışındaki diğer vücut hücrelerinde oluşan mutasyonlardır. Çoğunlukla organizmanın yalnızca bir kesiminde görülür. Somatik mutasyon kanser oluşumuna zemin hazırlaması yönünden son derece önemlidir (36).

Kalıtsal mutasyonlar: Kuşaktan kuşağa aktarılabilen ve üreme hücrelerinde meydana gelen mutasyonlardır (36).

Genetik materyalde meydana gelebilen mutasyonları üç ayrı grupta ele alabiliriz:

- 1) Genom mutasyonları
- 2) Kromozom mutasyonları
- 3) Gen içi mutasyonları

1) Genom mutasyonları: Kromozomların sayısal anomalisinden oluşur. Bu hatalara yol açan üç farklı mekanizma vardır. Mitotik veya mayotik bölünmenin anafaz evresinde birbirinden ayrılması gereken kromozomların aynı anda, beraber hareket etmesi “nondisjunction (ayrılmama)” olarak bilinir. Normal bir gamet ile fertilizasyon sonucu ortaya çıkan zigotun trizomik (üç kromozom) veya monozomik (tek bir kromozom) olması nondisjunction sonucudur. Sayısal anomalilere neden olan ikinci bir mekanizma ise “anafaz lag” sonucu kromozom kayıplarıdır. Bir kromozomun kaybı sonucu hücreler mozaik bir yapıya sahip olur. Bir grup hücre normal kromozom sayısını taşıırken (öplöid) diğer hücre grubu monozomiktir. Üçüncü bir mekanizma poliploidi olarak adlandırılır. Bu durumdaki sayısal hatalarda, hücrelerde tüm bir genomun kendi katsayıları vardır. İnsanlarda triploidi ($3n=69$) gözlenebilir (36).

2) Kromozom mutasyonları: Kromozomların yapısal anomalilerini oluşturur. Yapısal değişiklik tek bir kromozomu içerebilir (intrakromozomal). Intrakromozomal hatalar arasında; parasentrik ve perisentrik inversiyonlar, ring (halka) kromozomlar, izokromozomlar sayılabilir. Sentrik füzyon ve resiprokal translokasyonlar ise belli basit interkromozomal anomalilerdir. Kromozomal aberasyona neden olan ajanlar için “klastojen” denir (36).

3) Gen içi mutasyonlar: Karyotip analizi ile saptanamayacak ölçüde; DNA üzerinde baz düzeyindeki mutasyonlardır. Bu mutasyonlara neden olan üç farklı mekanizma

vardır. Bunlar; baz değişimleri, delesyon (baz kaybı) ve insersiyon (baz eklenmesi) dur. Baz değişimleri, transisyon ya da transversiyon şeklinde olur. Transisyon bir pürin bazının diğer bir pürin bazı ile veya bir primidin bazının diğer bir primidin bazı ile yer değiştirmesi sonucu oluşur. Transversiyon ise bir pürin bazı yerine primidin bazı veya pirimidin bazı yerine pürin bazı gelmesidir. Transisyon veya transversiyon sonucunda yanlış anlamlı (missense) veya anlamsız (nonsense) mutasyonlar ortaya çıkar (36).

2.7. DNA Hasarının Hücrede Oluşturduğu Yanıtlar

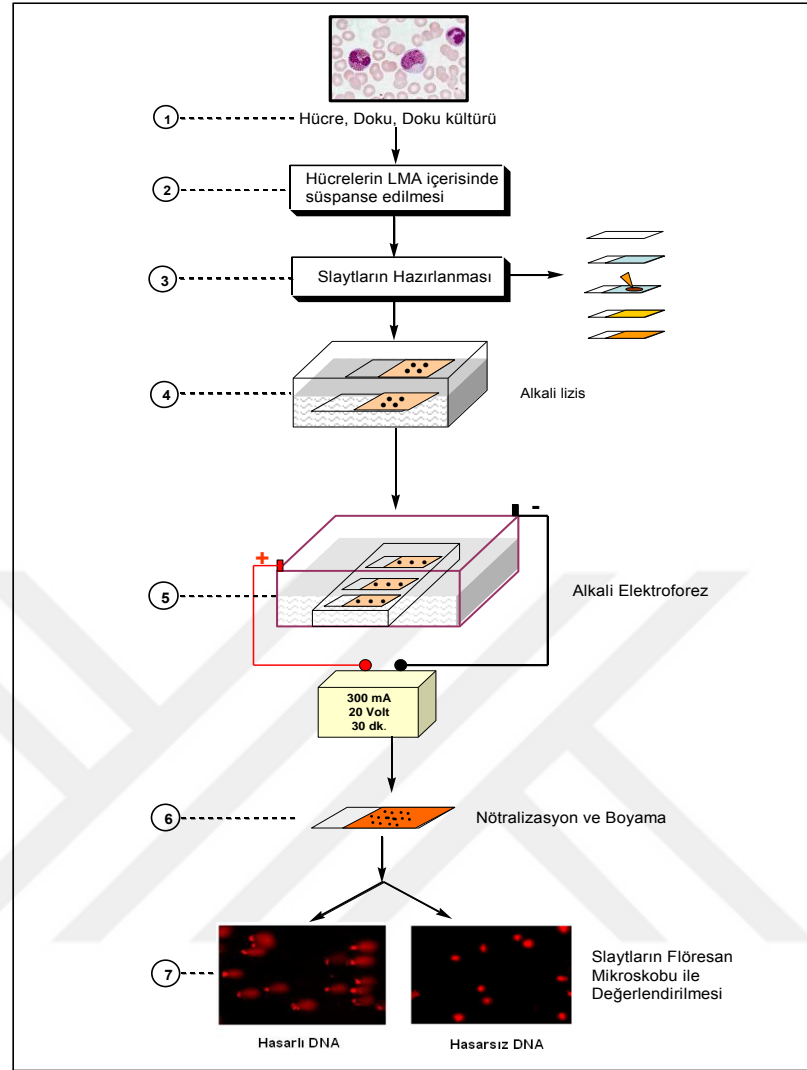
Hücrede DNA hasarı oluştuğunda dört önemli yanıt oluşur;

1. Hasarlı DNA'nın çıkarılarak DNA çift zincirinin doğru bir şekilde yeniden yapılandırılması [DNA onarımı],
 2. DNA hasarı kontrol noktalarının aktivasyonu ile hücre döngüsünün ilerlemesinin engellenmesi, bu şekilde hasarlı genetik materyalin onarımına imkan sağlanması ve hasarlı kromozomların genetik geçişinin önlenmesi,
 3. Hücredeki gen transkripsiyon düzeylerinin hücrenin yararına olacak şekilde değişmesi [transkripsiyonel cevap],
 4. Ciddi olarak hasar görmüş hücrelerin elenmesi [programlı hücre ölümü, apoptoz]
- Bu yanıtlardan herhangi birinin işlev görmemesi hücre düzeyinde genomik kararsızlıkla, organizma düzeyinde ise genetik hastalıklar, kanser veya yaşlanma ile sonuçlanır (34).

2.8. DNA Hasar Tespit Yöntemleri

2.8.1. Comet Metodu ve Tarihsel Gelişimi

Tek hücre jel elektroforezi DNA hasarlarının ve onarımının tespitine tek aşamada izin veren bir yöntemdir. Bu teknik tek hücrenin agarozda yerleştirilmesini takip eden hücre lizisi, elektroforez, mikroskopta inceleme ve görüntüleme yoluyla analizinden oluşmaktadır (37). DNA'lar dairesel formdan kuyruklu yıldıza benzer forma kadar çeşitli derecelerde görüntüler oluşturduklarından yöntem "kuyruklu yıldız" anlamına gelen "Comet Assay" adı verilmiştir (38). DNA tek ve çift zincir kırıklarının, alkali-kararsız bölgelerinin ve kesip çıkarma onarım bölgelerinin ve zincir içi çapraz bağların tespiti için Comet Assay yönteminde değişiklikler yoluyla yeni teknikler geliştirilmiştir. Tek hücre jel elektroforez tekniği DNA hasarının tespiti için yaygın olarak kullanılmaya başlayan bir metod haline gelmektedir. Gelişimi Rydberg ve Johanson'un agaroz ile ışınlanmış Çin hamster hücrelerini karıştırarak alkali bir çözeltide lizise uğrattıktan sonra akridin oranj ile boyayıp DNA zincir ayrışmasının uzayışını gözlemlemesiyle başlamıştır (37).



Şekil 3. Comet metodu basamakları (Şahin T., 2008)

Daha sonra, Ostling ve Johanson tarafından, hücrelerin nötral bir deterjan çözeltisinde lize uğratılması ve akridin orange ile floresans değerlendirmeden önce hücrelere düşük bir elektriksel alan uygulanması ile bu metod modifiye edilmiştir (37). Araştırmalar sonucunda nötral deney şartlarının denatürasyonu hızlandırmadığı ve bunun sadece çift bağ hasarının tanınmasına yol açtığı gözlenmiştir. Bu ise genotoksisite hakkında daha az hassas sonuçlar elde edilmesine yol açmıştır. Bu nedenle konu üzerinde çalışmalar devam etmiştir. Günümüzde uygulanan “Comet Assay” Singh ve arkadaşları (1988) tarafından geliştirilmiş olan, tek ve çift zincir kırıklarının tanımlanmasına olanak sağlayan yöntemin alkali versiyonu bulunmuştur (39). Yeni dizayn hücrelerde, DNA hasar büyüklüğünün direkt olarak tespitini

sağlamaktadır (40). Zira alkali ortamda bağların çözülmesi ve DNA moleküllerinin denatürasyonu daha kolaydır. Bu DNA’da tek bağ hasarına neden olur. Bu nedenle son yıllarda tercih edilen yöntem alkali ortamda DNA hasarını çalışmak olmuştur (41).

Singh’in yönteminde düşük erime noktalı agaroz (LMA) içerisinde hazırlanan hücre süspansiyonu lam üzerine, agaroz jel ile sandviç modeli oluşturacak şekilde aktarılıp pH 10’da deterjanlar ve yüksek tuz konsantrasyonları kullanılarak parçalama işlemi gerçekleştirilmektedir. Daha sonra ise alkali koşullar altında kısa bir süre elektroforez uygulanmaktadır. Parçalama işlemi ile nükleer materyal dışındaki hücre bileşenleri uzaklaştırılmış olur. Çok küçük miktardaki non-histon protein varlığında bile DNA süpersarmal halinde iken, alkali koşullarda kırıkların bulunduğu bölgelerden açılmaya başlar. DNA hasarı yüksek olan hücrelerdeki DNA göçü daha fazladır ve bu göç kuyruklu yıldız benzer. DNA hasarına uğramış hücre, kafa ve kuyruk olarak iki kısımdan meydana gelmiştir. “Kafa” bölgesi çekirdek dışına göç etmeyen, “kuyruk” ise parçalanmaya ve yapısal kayba bağlı olarak çekirdek dışına göç etmiş DNA’yı belirtir. Belli bir bölgedeki DNA miktarı o bölgedeki floresan yoğunluğu ile doğru orantılıdır (42).

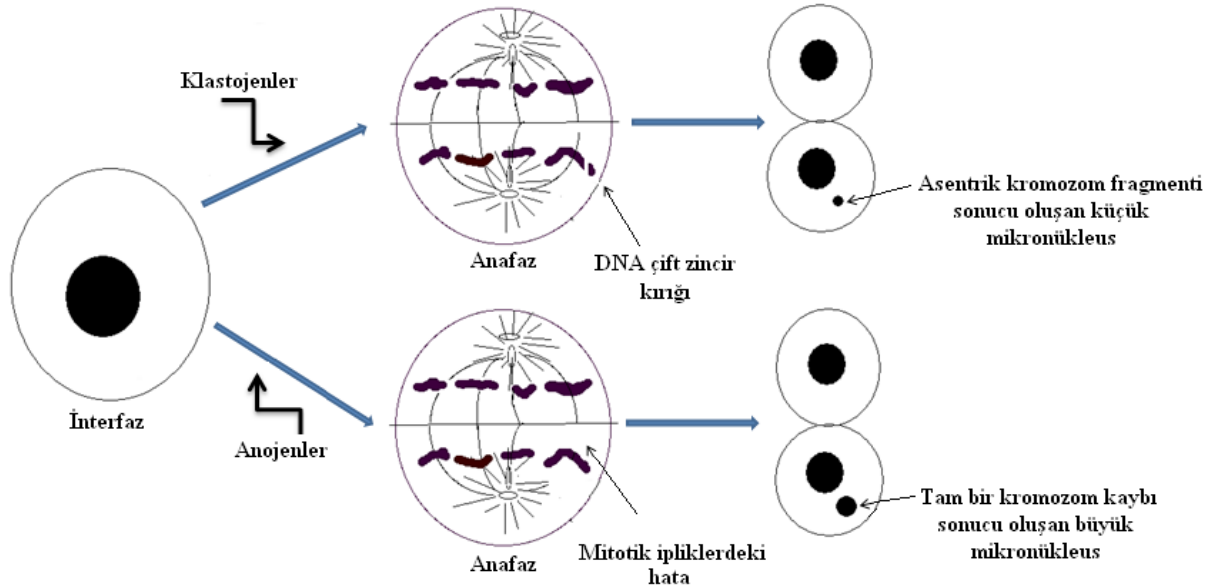
2.8.2.Comet Testinin Kullanım Alanları

Son yıllarda gelişen Comet tekniği, çeşitli ajanların yol açtığı DNA tek ve çift zincir kırıklarının tespiti için kullanılan hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Tek hücre jel elektroforez (Single cell gel electrophoresis) tekniği olarak da adlandırılan Comet yöntemi, birçok memeli hücresinde çeşitli ajanların indüklediği DNA hasarı ve onarım bozukluğunun tayinini amaçlayan çalışmalarda kullanılmaktadır. DNA kırıklarının tayini prensibine dayanan bu yöntem, pek çok fiziksel ve kimyasal mutajenin özellikle insanlarda yol açtığı DNA hasarının tayininde, kanser hastalarında DNA hasarının derecesini ve tamirini tespit etmede, bazı kalıtsal hastalıkların prenatal tanısında, bazı hastalıklarda artmış DNA hasarını belirlemede kullanılan bir biyoizlem testidir. Ayrıca genotoksinleri ilk etki bölgelerde değerlendirebilmesi, hemen hemen tüm ökaryotik hücrelere uygulanabilmesi, düşük hasar seviyesini ölçebilmesi, az sayıda hücre örneği gerektirdiği için hızlı, basit ve

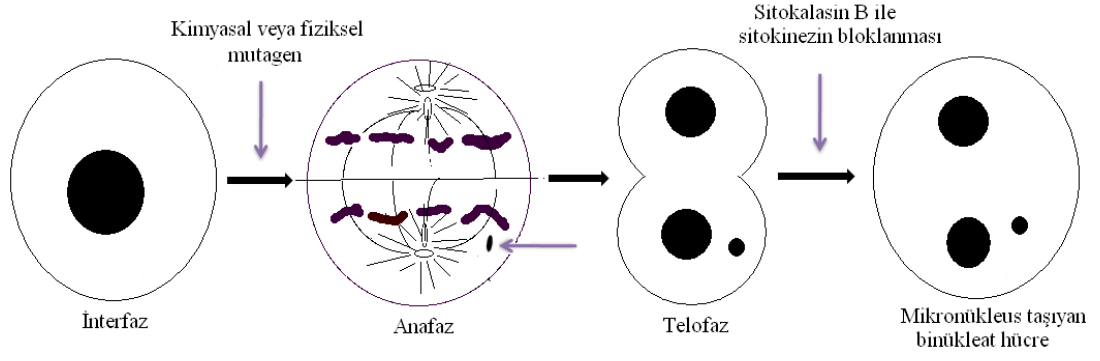
ucuz bir yöntem olması gibi avantajlarından dolayı geniş bir kullanım alanına sahiptir (43). Fairbairn ve arkadaşları (1995), comet yönteminin biyoloji, tıp ve toksikoloji alanında birçok tahlil uygulamalarında kullanılan geniş yelpazede yararlı bir test olduğunu vurgulamışlardır (44). Collins ve arkadaşları comet testinin kolay ve duyarlı olmasından dolayı insan biyolojik izlemelerinde büyük miktarda farklı veri türlerinin toplanabilirliğini belirtmişlerdir (45).

2.8.3.Mikronükleus Tekniği ve Tarihi Gelişimi

Mikronükleuslar, hücre bölünmesi sırasında herhangi bir kromozom parçasının mitotik ipliklere tutunamaması sonucu sitoplazmada asentrik kromozom fragmentlerinden ve/veya tam kromozomlardan köken alan kardeş nükleus yapısının oluşmasını ifade etmektedir (46). MN; ilk olarak Howell ve arkadaşları tarafından eritrosit sitoplazmasında bulunan nükleer materyal parçaları olarak tanımlanmış ve Jolly tarafından tarafından Howell-Jolly cisimcikleri olarak adlandırılmışlardır. Mikronükleus adını diğer hücre tiplerinde gözlemlendikten sonra almışlardır (47,48).



Şekil 4. Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MN'ler (Şekeroğlu ve ark., 2011)

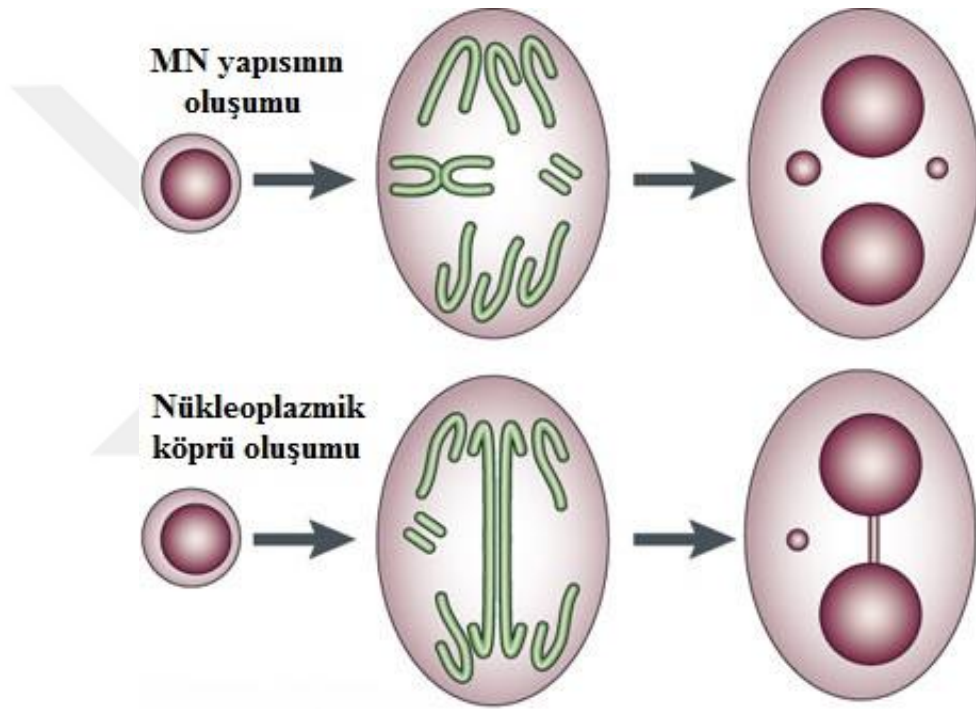


Şekil 5. MN içeren binükleat hücrenin oluşumu (Şekeroğlu ve ark., 2011)

MN testi 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde ve daha sonra Haddle ve arkadaşları tarafından kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır (46). MN oluşumunun temelini, DNA hasarı oluşturmaktadır. Organizmanın çeşitli mutajenik, klastojenik ve karsinojenik ajanlara maruz kalması sonucunda DNA'da harabiyet meydana gelmektedir. Genetik hasar ölçümünde, MN testinin toksikolojide, diyetle, ilaç sanayide, kanser riski oluşumu şüphesinde, radyoterapide önemi anlaşılmıştır. DNA hasar oranının in vivo ve in vitro olarak belirlenmesinde, en ekonomik ve pratik tekniklerden biri haline gelmiştir (47). Üstüner (2011), mikronükleus testinin kanser tedavisi sırasında ve genotoksisite belirlemede kullanılabileceğini, kromozom kırığı ve apoptoz-kanser yolağındaki mekanizmaların aydınlanmasında da faydalı olacağını belirtmiştir (47). Demirel ve Zamani (2002), MN oluşum sıklığındaki artışın, genetik materyalde oluşan hasarın bir göstergesi olarak değerlendirildiğine değinmiştir (46). Ambroise ve arkadaşları (2013) Papanicolaou boyama yöntemine (PAP) göre boyanmış yaymalarda mikronükleus değerlendirmesi ile elde ettikleri sonuçların rutin servikal kanser taramasında çok faydalı bir biyobelirteç olduğuna değinmişlerdir. Binükleuslu hücre sayımının ise bu basit testin prediktif değerini arttırdığının da altını çizmişlerdir (49).

MN testinin geniş bir araştırma ortamı bulduğu diğer bir alanda yaşlanmadır. Yaş artışıyla anöploidi sıklığı arasında yakın bir ilişki vardır. Bireyin yaşam içerisinde maruz kaldığı çevresel ajanların etkisiyle kromozomların normal bölünmeden saptığı belirlenmiştir. Her hücrenin mitotik aktivitesi yaş ilerledikçe

yavaşlamakta ve mitoz bölünmede iğ iplikçiklerinde katalizör görevi yapan enzimlerde dejenerasyon oluşmaktadır. Fenech ve arkadaşları ise, NPB (NucleoPlasmic Bridge: Nükleoplazmik Köprü) oluşumlarının anafazda kromozomların sentromerlerin zıt kutuplarına çekilmesi sırasında gerçekleştiğini ve bir ya da daha fazla NPB'lerin yanındaki 1'li veya 2'li MN'ların % 60'ından daha fazlasının asentrik kromozom parçasından orijin aldığını göstermişlerdir. Bu oluşumların moleküler mekanizması ise şimdiye kadar tam olarak ortaya belirlenememiştir (47).



Şekil 6. Mikronükleus ve nükleoplazmik köprü oluşumları (Fenech M., 2007).

MN testi insanlarda genotoksisiteyi belirlemek amacıyla çoğunlukla periferel kan lenfositlerinde uygulanır. Çünkü yapılan çalışmalarda, kanser hastalarından alınan periferel kan lenfositlerindeki MN frekansında belirlenen artış, kanser oluşan hedef dokudaki MN frekansı kadar bulunmuştur (50).

2.8.4. Mikronükleus Tekniği Kullanım Alanları

MN; hücre bölünmesi esnasında özellikle mutajenik ve klastojenik etkilerle oluşan, anafazda gecikmiş ve kondanse olmuş kromozom fragmentlerinden oluşmaktadır. Başlangıçta MN yöntemi kimyasal ajanların kandaki etkilerini in vitro olarak tespit etmek için kullanılmaya başlamış daha sonra geliştirilen modifiye metodlarla diğer dokulardan da MN sıklığı bakılmaya başlanmıştır (51). 1980'den sonra özellikle deney hayvanlarıyla gerçekleştirilen kontrollü çalışmalarda, kimyasal ve fiziksel ajanların sebep olduğu sitogenetik harabiyetin güvenilir bir göstergesi olarak kullanılan MN çalışmalarının sayısı çok hızlı bir şekilde artmıştır (46). İnsan periferel lenfositleri, yanak epitel hücreleri ve fare kemik iliği hücreleri gibi farklı hücrelerle yapılabilen bir testtir. Bu nedenle yapılan genotoksik çalışmalarda, insan periferel lenfositlerinde MN frekansındaki artış ile kanser sıklığı arasında pozitif bir korelasyon olduğu gözlenmiştir (52).

Genotoksisite testlerinden biri olan MN, çeşitli mekanizmalarla doğrudan ya da dolaylı olarak genetik materyalde meydana gelen hasarları saptamak amacıyla geliştirilmiş in vitro ve in vivo testlerden oluşmaktadır. Genotoksisite testleri esas olarak genomu etkileyebilecek UV ve irradyasyon gibi fiziksel etkenlerin, parazitik enfeksiyonların, sigara, pestisitler, ilaçlar, gıda katkı maddeleri, nanomateryaller gibi birçok kimyasal ajanın genotoksik ve kanserojenik potansiyellerinin tespitinde, ilaçların hem piyasaya sürülmeden önce hem de ilaç kullanan kişilerdeki genetik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada, bazı hastalıklarda artmış DNA hasarının tespitinde, genetik hasar ile hastalıklar arasındaki ilişkinin belirlenmesinde, kanserden korunmada, kansere duyarlılığın tayininde ve takibinin yapılmasında biyoizlem testleri olarak kullanılmaktadır (43).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum polikliniğine başvuran 30 reproduktif dönem, 30 menopozal dönem hastalarından ve kontrol grubu için sağlıklı 30 kişiden olmak üzere toplam 90 kişiden oluşmaktadır. Örnek alınmadan önce hastaların yaş, son adet tarihi, geliş şikayetleri, ek hastalıkları, oral kontraseptif ya da hormon replasman tedavisi alıp almadıkları, gebelik- doğum ve abort sayıları gibi klinik bilgileri kaydedilmiştir. Hastalardan alınan rutin servikal sürüntü örneklerinden 2 adet yayma hazırlanmıştır. Yaymalardan biri rutin değerlendirme için Patoloji laboratuvarına gönderilirken diğeri Mikronükleus sayımı için Tıbbi Biyoloji laboratuvarına getirilmiştir.

Ayrıca aynı hastalardan Comet testi için heparinli tüpe 2 ml kadar kan alınmıştır. Alınan sürüntü örneklerinde ve heparinli tüpe alınan 2 ml kandan Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında DNA hasarı tespit edilmesi için örnekler 2 saat içerisinde çalışılmış ve gerekli işlemler ardından mikroskopta değerlendirilmesi yapılmıştır.

Toplanan materyellerde, Comet Testi Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda, Mikronükleus Testi ise Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız için Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Tıp Fakültesi Etik Kurulu Başkanlığından 15.07.2015 tarih ve 165 sayılı kararı ile etik kurulu izni alınmıştır.

3.1. Örneklerin Alınması

Çalışmamızda Comet ve Mikronükleus Testleri olmak üzere iki farklı yöntem uygulanmıştır. Comet testi için heparinli tüpe alınan yaklaşık 2 ml kan örnekleri Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında 2 saat içerisinde çalışılmıştır. DNA hasarının tespit edilmesi için örnekler gerekli işlemler ardından mikroskopta değerlendirilmeye tabi tutulmuştur. Her hasta için hazırlanan iki lamdan toplam 100 hücre fotoğrafı çekilmiştir. Fotoğrafi

çekilen örnekler Open Comet programında değerlendirilmiş ve gerekli istatistik programları IBM SPSS V20 programında gerçekleştirilmiştir.

Mikronükleus yöntemi için tahta spatula ve servikal fırça (cytobrush) yardımı ile ektoserviks ve endoservikal kanaldan kazıma ve sürme tekniği ile örnekler alınmış, ayrı lamlara yayılarak saf alkolde tespit edilmiştir. Lamlar Papanicolaou boyama metoduna göre boyanmış ve lamel kapatılarak ilk sitolojik incelemeleri yapılmıştır. Tespit edilen Mikronükleus alanları işaretlenmiş ve elde edilen bulgular IBM SPSS V20 programında değerlendirmek üzere kaydedilmiştir.

3.2.Comet Metodunda Kullanılan Çözelti ve Lamların Hazırlanması

Fosfat Tamponu(PBS) Hazırlanışı

Fosfat tamponu tablo 2’de belirtilen kimyasallar tartılarak 1 litre distile su içerisinde çözünmesi ile stok solüsyon hazırlanmış ve +4 °C’de saklanmıştır. Çalışma solüsyonu olarak kullanılacağı zaman PBS 1:10 oranında distile su ile seyreltilerek kullanılmıştır.

Tablo 2.Stok Fosfat Tamponunun Hazırlanması

Kullanılan Kimyasal	Miktar (gr/L)
NaCl	80 gr
KCl	2 gr
KH₂PO₄	2 gr
Na₂HPO₄-7H₂O	29 gr
Tris HCl	32 gr

Lizis Çözeltisi Hazırlanışı

Lizis çözeltisi tablo 3’te belirtilen kimyasallar tartılarak 1 litre distile su içerisinde çözünmesi ile stok solüsyon hazırlanmış ve +4 °C’de saklanmıştır. Stok lizis çözeltisinde önce EDTA’nın çözülmesi çözeltinin hazırlanmasında kolaylık

sağlamaktadır. Çalışma solüsyonu Triton X-100'den 1 ml, DMSO'dan 10 ml ve stok lizis solüsyonundan 89 ml karıştırılarak pH:10 olacak şekilde hazırlanır.

Tablo 3. Stok Lizis Çözeltisinin Hazırlanışı

Kullanılan Kimyasal	Miktar (gr/L)
2.5 M NaCl	73.5 gr
100 mM Na₂ EDTA	18.6 gr
10 mM Trizma Base	0.6 gr

Alkali Elektroforez Tamponunun Hazırlanışı

Alkali Elektroforez Tamponunun çözeltisi tablo 4'te belirtilen kimyasallar tartılarak 1 litre distile su içerisinde çözünmesi ile solüsyon hazırlanmış taze olarak hazırlanmış ve +4 °C'de saklanmıştır. Çözeltinin kullanılmadan önce soğuk ve Ph'sının >13 olmasına dikkat edilmelidir.

Tablo 4. Alkali Elektroforez Tamponunun Hazırlanışı

Kullanılan Kimyasal	Miktar (gr/L)
300 mM NaOH	12 gr
1 mM EDTA	0.36 gr

Nötralizasyon Çözeltisi

97 gr Trisi üzerine 1 L distile su ilave edilmesi ile hazırlanır. Hazırlanan çözelti +4'te muhafaza edilir. pH'sı 7.5 olmak üzere distile su ile 1:1 oranında karıştırılarak kullanıma hazır hale gelmektedir.

Boyama Solüsyonu

Boyama solüsyonunda etidyum bromür 1:100 oranında distile su ile seyreltilerek kullanılmıştır. Etidyum bromür DNA'ya bağlanma eğiliminde olan

kanserojen bir madde olduğu için kullanım sırasında dikkatli olunmasına özen gösterilmelidir. Lamların boyanması için 20-30 µl boya yeterli olmaktadır.

Düşük Kaynama Dereceli Agaroz (LMA) Hazırlanması

LMA, her lam için ortalama 80-100 µl olacak şekilde %0.75- 1 oranında PBS içerisinde ısıtarak çözünmesi gerçekleştirilmiştir.

Normal Kaynama Dereceli Agaroz (NMA) Hazırlanması

NMA, her lam için ortalama 100-120 µl olacak şekilde %1-1.5 oranında PBS içerisinde ısıtarak çözünmesi gerçekleştirilmiştir.

3.3. Comet Analizi Basamakları

3.3.1. Hücresel Materyalin Hazırlanması

DNA hasar çalışmalarında, hücreler histopak ile izole edildikten sonra kullanılır. Bu işlemde 1:1 oranında olacak şekilde ilk olarak histopak üzerine yavaşça kan örnekleri ilave edilir. 20 dak. 2000 rpm'de santrifüj yapılır. Santrifüj işleminin ardından lökositlerin süpernatant kısmında oluşturduğu bulanık kısım alınarak 1:1 oranında PBS ile karıştırılır ve 10 dak. 2500 RPM'de santrifüj işlemi yapılır. Daha sonra ortamdan süpernatant kısım uzaklaştırılır ve ependorfta kalan hücreler 25-30 µl PBS ile sulandırılır. Vücut sıcaklığına yakın sıcaklıkta hazırlanan LMA ile karıştırılan hücreler daha önce ön kaplama yapılmış NMA jelli lamlar üzerine yayılır.

3.3.2. Mikroskop Lamlarının Hazırlanması

Çalışmadan önce NMA, mikroskop lamlarına yayılır. Çalışma esnasında hücre ile süspansiyon hale getirilen LMA, NMA ile kaplanmış olan lamların üzerine yayılır ve üzerine lamel kapatılır. Agaroz jellerin donması için buz kasetinin üzerine 5-6 dakika bırakılır. Tamamlanan süre sonunda lameller yavaşça jel üzerinden alınarak lizis aşamasına hazır hale gelmiş olur.

3.3.3. Lizis

Hücreler lam üzerinde agaroz jele gömüldükten sonra sonra yüksek yoğunlukta tuz ve deterjan içeren lizis çözeltisinde bir saat bekletilir. Lizis sırasında kan ve doku örneklerinde mevcut olan eritrositlerin parçalanmasıyla açığa çıkan demire bağlı serbest radikal aracılı DNA hasarını önlemek için lizis çözeltisine % 10 oranında dimetil sülfoksit eklenir. Lizis işlemi sırasında membranlar parçalanır ve hücre içeriği çekirdekten uzaklaştırılır. DNA küçük bir miktar nonhiston proteinlerle birlikte yüksek süperkoil yapısında kalır. Lamalar birkaç defa uygun bir tampon ile yıkanarak hücresel artıklar, kalan deterjan ve tuzlar uzaklaştırılır (39).

3.3.4. Alkali Ortamda DNA Süperkoil Yapısının Açılması ve Elektroforez

Preparatlar elektroforez öncesinde çift sarmal DNA yapısının açılması için yüksek alkali özellikteki (pH>13) elektroforez tamponunda 15-20 dakika karanlık ve soğuk ortamda inkübe edilir. Alkali tampon içersinde çekirdekteki çift sarmal DNA, zincir kırıklarının bulunduğu noktalardan açılmaya başlar (53). Yürütme işlemi 25 V, 300 mA'de yaklaşık 25 dakika sürmüştür.

3.3.5. Nötralizasyon

Elektroforez işleminden sonra, jel pH'sının nötralizasyonu için lamalar nötralizasyon tamponu ile 5 dakika olmak üzere 2 kez yıkama işlemine tabi tutulmuştur.

3.3.6. Lamaların Boyanması

Boyama işlemi için etidyum bromür boyası kullanılmıştır. Boyama sonrasında floresan mikroskopta katottan anoda doğru göç eden hasarlı DNA parçaları kuyruklu yıldız şeklinde görüntülenirken, hasarsız DNA'lar ise dağılmamış daireler şeklinde görülmektedir.

3.3.7.Lamların Değerlendirilmesi

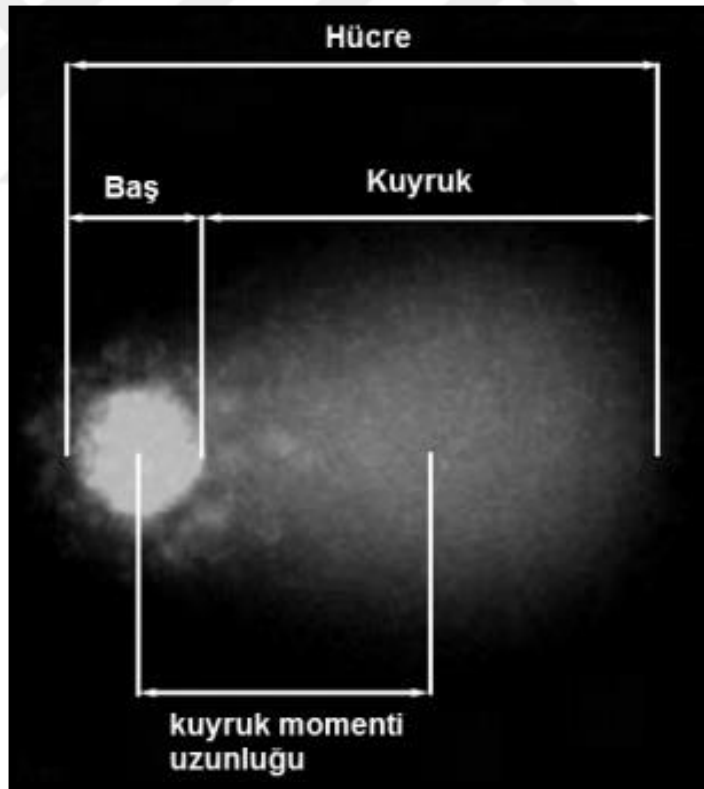
Lamlar boyandıktan sonra her kişiden hazırlanan iki preparattan rastgele 100 hücre seçilerek x40 büyütme, Zeiss İmager A1 marka floresan mikroskopta, Anabilim Dalımızda mevcut olan bilgisayar destekli Zen (Blue edition) programı kullanılarak incelenmiş ve elde edilen veriler Excel/SPSS programı ile değerlendirilmiştir.

Comet yönteminde değerlendirdiğimiz ölçüm parametreleri:

Kuyruk uzunluğu: DNA göçü ile oluşan kuyruk yapısını ifade eder. (54).

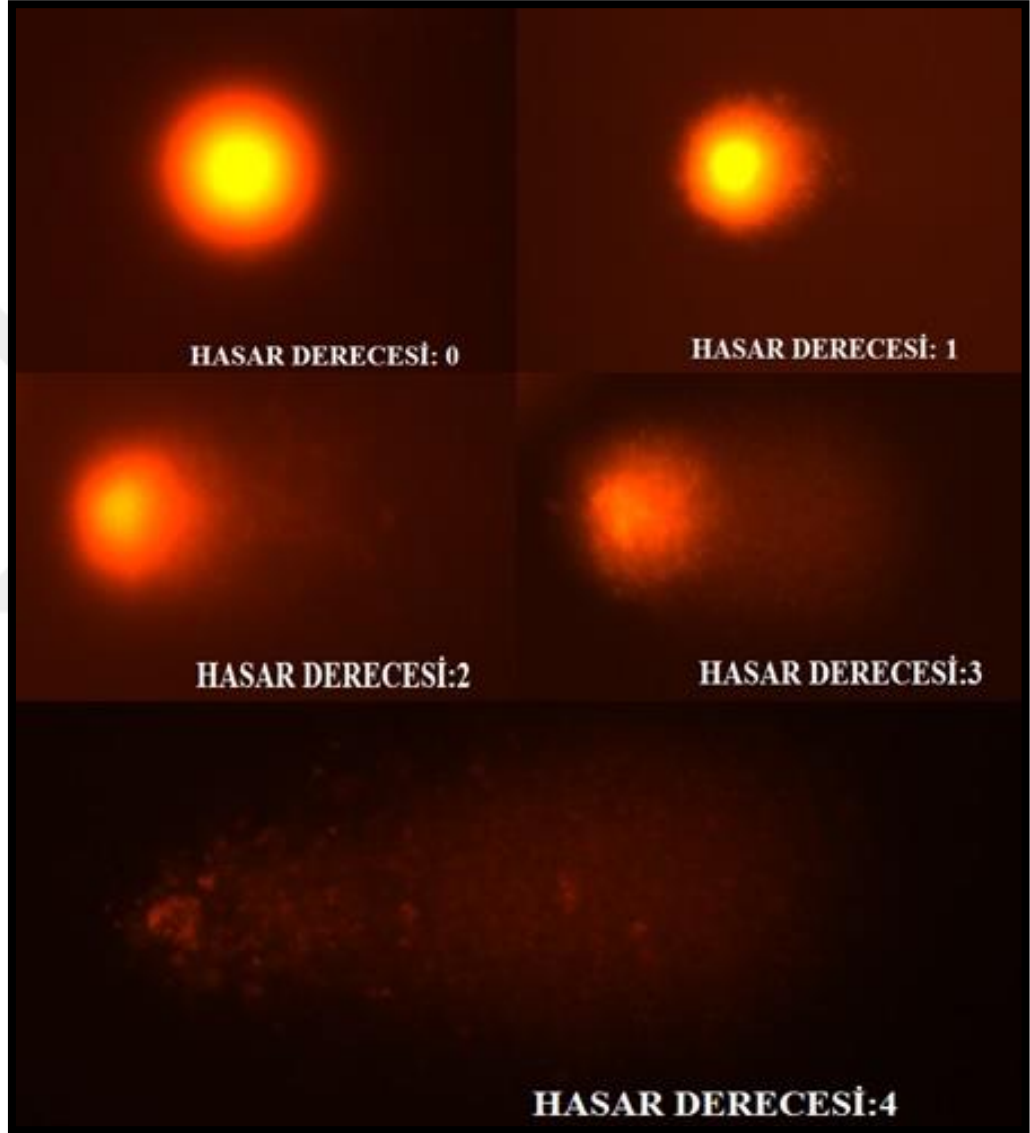
Ölçülen Kuyruk Momenti = Kuyruk uzunluğu X Kuyruk% DNA/100 (54).

Kuyruk DNA % = DNA göçü sonucunda kuyrukte bulunan DNA miktarını ifade eder (54).



Şekil 7.Comet Testinde Kullanılan Parametreler (Günel ve Gökalp-Muranlı,2013)

Comet yönteminde DNA hasar dereceleri 0-4 arasında sınıflandırılmıştır. En yüksek DNA hasar derecesi 4 ile en düşük DNA hasar derecesi 0 ile belirtilmiştir. Kuyruk uzunluğunun ve yoğunluğunun artmasıyla hasar derecesinde artışa paralel olarak kuruk uzunluğu ve yoğunluğunda artış görülmektedir. Başta ise DNA miktarında azalma görülmektedir.



Şekil 8. Comet Hasar Derecelerinin Sınıflandırılması

3.4. İstatistiksel Analiz

Hasarsız hücrelerde ve floresan şiddeti hücrenin baş tarafında yoğunlaştığı için çekirdek daha parlaktır. DNA'da kırıklar meydana gelmesi durumunda ise floresan çekirdekten negatif yükün olduğu yöne doğru yayılarak hücrenin kuyruk bölgesinde şiddetlenir. Comet testi, hasarlı hücrelerde floresanın baş taraftan kuyruğa geçişini yansıttığından DNA hasarının kantitatif olarak tespit edilmesinde kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu ve kuyruktaki DNA yoğunluğu önemli parametrelerdir (55). Kuyruk DNA yüzdesi, oluşan hasarın derecesi ile doğru orantılı olup hasarın şiddeti hakkında bilgi vermektedir (51).

Çalışmamızda Comet testi değerlendirmesinde 'Open Comet' programı ile hücrelerin kuyruk uzunluğu, kuyruk DNA yüzdesi ve kuyruk momenti parametreleri kullanılarak DNA hasarı olup olmadığı belirlendi. Bu parametrelerden elde edilen veriler IBM SPSS V20 programında One-Way ANOVA Post Hoc ve Tukey Testleri kullanılarak karşılaştırma yapıldı. $p < 0,05$ anlamlı olarak değerlendirildi.

Mikronükleus testi için ise benzer şekilde IBM SPSS V20 programı kullanılarak Independent Sample T Test kullanılarak karşılaştırma yapıldı. $p > 0,05$ anlamsız olarak değerlendirildi.

3.5. Mikronükleus Yönteminde Kullanılan Boya ve Lamların Hazırlanması

Boyama işlemi aşağıda verilen modifiye Papanicolaou boyama metodunun ardından lam ile kapatıldı, preparattan rastgele 1000 hücre seçilerek x40 büyütme, Insight kameralı, Nikon marka mikroskopta sitolojik incelemeler yapıldı. Preparatlar; mikronükleus, binükleus, karyoreksiz ve diğer nükleer anomaliler bakımından incelendi, şüpheli görülen alanlar işaretlendi. Bulgular SPSS programında değerlendirilmek üzere kaydedildi.

Tablo 5. Papanicolaou boyama yöntemi

1-Saf alkol	7-Saf alkol
2-Musluk suyu	8-Eozin asit
3-Hematoksilen- Eosin	9-Saf alkol
4-Musluk suyu	10-Saf alkol
5-Orange-G	11-Saf alkol
6-Saf alkol	12-Ksilol



4. BULGULAR

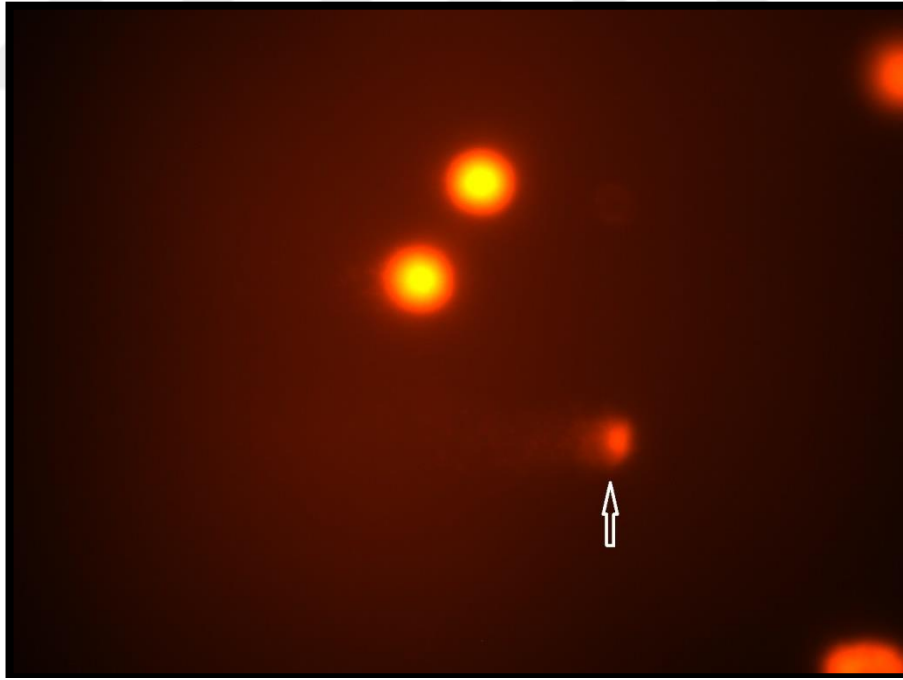
Çalışmamızda kullandığımız Comet ve Mikronükleus testlerine ait bazı hastalardan seçilen örnek görüntüler aşağıda listelenmiştir. Kontrol ve menopoz grubuna ait Comet görüntüleri Şekil: 9, 10, 11’de gösterilmiştir.



Şekil 9. Kontrol Grubunda 66 Numaralı Bireye Ait Hasarsız Comet

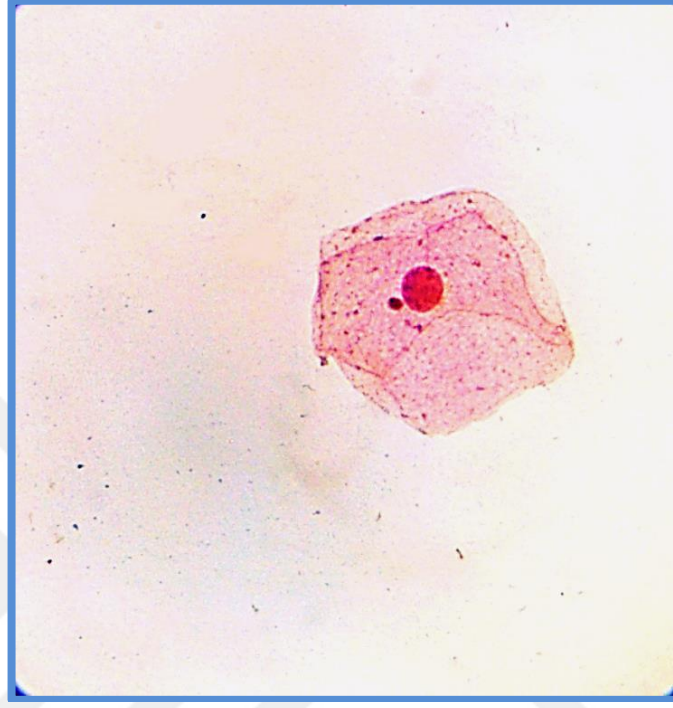


Şekil 10. Menopoz Grubunda 7 Numaralı Bireye Ait 1. Derece Hasarlı Comet



Şekil 11. Menopoz Grubunda 5 Numaralı Bireye Ait 4. Derece Hasarlı Comet

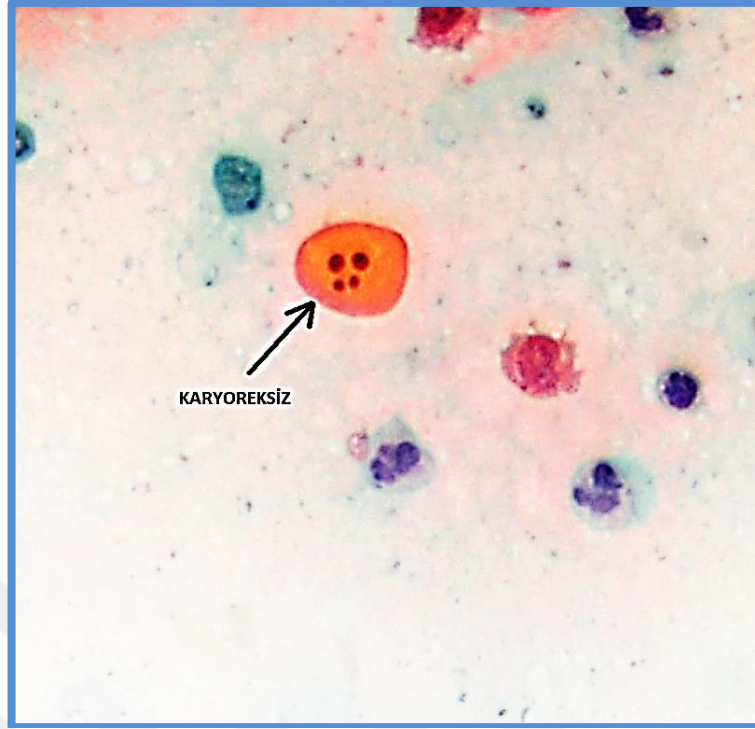
Reprodüktif ve menopozal gruba ait serviko-vajinal yaymaların mikroskobik incelemeleri sonucunda görülen mikronükleus, binükleus, karyoreksiz ve Döderlein basillerinin resimleri Şekil 12, 13,14, 15 ve 16’da gösterilmiştir.



Şekil 12. 17 Nolu Hastaya Ait Mikronükleus İçeren Çok Katlı Epitel Hücresi (PAP X 40)



Şekil 13. 20 Nolu Hastaya Ait Binükleus (BN) İçeren Çok Katlı Epitel Hücresi (PAP X 40)



Şekil 14. 22 Nolu Hastaya Ait Karyoreksiz (KR) İçeren Çok Katlı Epitel Hücresi (PAP X 40)



Şekil 15. 18 Nolu Hastaya Ait Epitel Hücresi (E) ve Döderlein Basilleri (D) (PAP X 40)

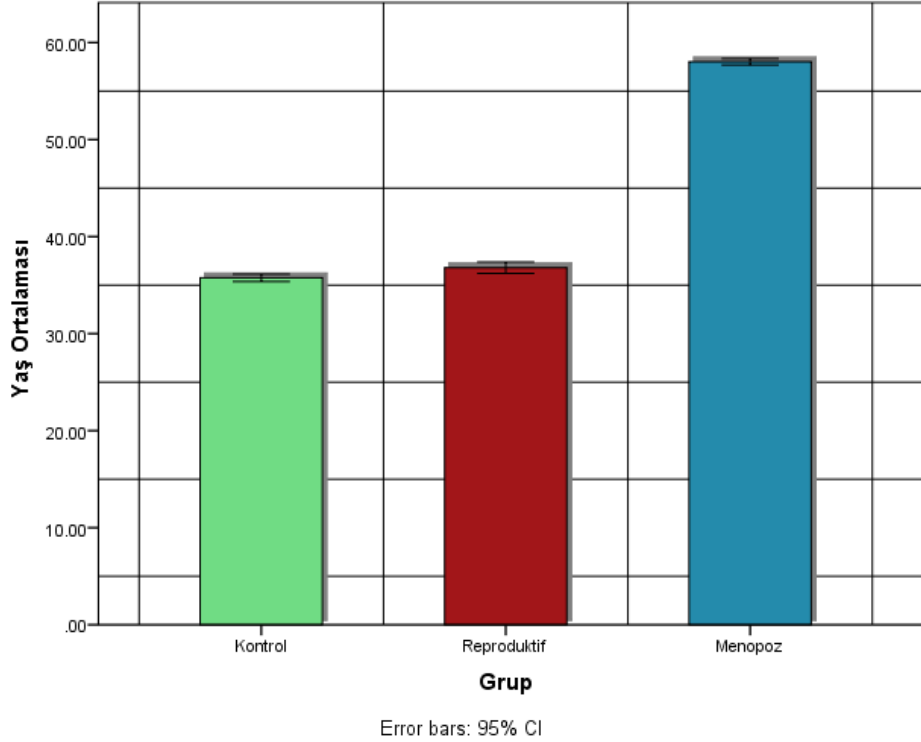
Çalışmaya, yaşları 19-68 arasında değişiklik gösteren 60 hasta ve 30 kontrol grubu kadın dahil edilmiştir. Reprodüktif dönemde bulunan 30 kişinin yaş ortalaması $36,56 \pm 9$ iken menopoza dönemdeki 30 kadının yaş ortalaması $57,26 \pm 5,8$ ve comet testinde kullanılan 30 kontrol grubu bireyin yaş ortalaması ise $36,03 \pm 5,94$ olarak hesaplanmıştır. Çalışmaya dahil edilen grupların yaş ortalamaları Şekil 16'da verilmiştir. Çalışmaya dahil olan kişilerin klinik bilgilerinden yararlanılarak Comet ve Mikronükleus testlerinde görülen DNA hasarı değerlendirmeye alınmıştır. Çalışma kapsamındaki tüm hastaların jinekolojik yakınmaları ve yüzdeleri Tablo 6'da, klinik bilgileri ve yüzdeleri Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 6. Çalışma kapsamındaki tüm hastaların jinekolojik yakınmaları ve yüzdeleri

JİNEKOLOJİK YAKINMALAR				
	Akıntı	Kaşıntı	Kasık ağrısı	Adet Düzensizliği
VAR	2 (%3.33)	2 (%3.33)	2 (%3.33)	5 (%9.33)
YOK	58 (96.6)	58 (96.6)	58 (96.6)	55 (%91.66)
TOPLAM	60	60	60	60

Tablo 7. Çalışma kapsamındaki tüm hastaların klinik bilgileri ve yüzdeleri

KLİNİK BİLGİLER					
	Rahim İçi Araç	Doğum Kontrol Hapı Kullanımı	Kürtaj	Abortus	Myom
VAR	10 (%16.6)	15 (%25)	21 (%35)	13 (%21.66)	6 (%10)
YOK	50 (%83.33)	45 (%75)	39 (%65)	47 (%78.33)	54 (%90)
TOPLAM	60	60	60	60	60



Şekil 16. Çalışma kapsamındaki hastaların yaş ortalamaları

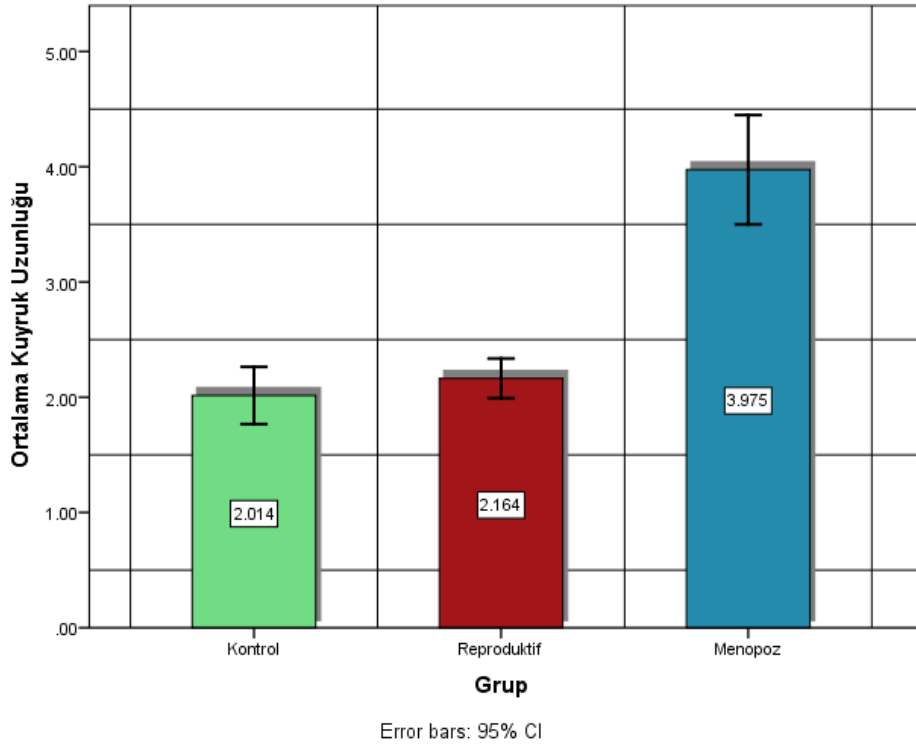
Çalışma kapsamındaki gruplar yaş bakımından karşılaştırıldığında menopoz grubunun diğer gruplara göre, reproduktif dönemin de kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$).

Comet testi sonuçlarının değerlendirilmesinde farklı parametreler kullanılmaktadır. Bu çalışmada yaygın olarak kullanılan kuyruk uzunluğu, kuyruk DNA yüzdesi ve kuyruk momenti parametreleri değerlendirilmiştir. Kontrol, reproduktif ve menopoz gruplarına ait comet parametreleri One-Way ANOVA Post Hoc ve Tukey Testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Tablo 8, 9 ve 10'da her bir grubun ortalama, standart hata, minimum ve maksimum değerleri verilmiştir.

Tablo 8. Reprodüktif, Menopoz ve kontrol gruplarına ait kuyruk uzunluğu karşılaştırması

	Grup	Mean	Std. Error	Minumum	Maximum
Kuyruk Uzunluğu	Kontrol	2.01	0.12	0	22
	Reprodüktif	2.16	0.08	0	14
	Menopoz	3.97	0.24	0	198

Kontrol, Reprodüktif ve Menopoz gruplarının kuyruk uzunluğu karşılaştırması yapıldığında menopoz grubunda kuyruk uzunluğu diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p < 0.05$), kontrol ve reprodüktif gruplar arasında benzer sonuçlar elde edilmiştir ($p > 0.05$). Şekil 17’de grafik bilgileri, gösterilmiştir. Bu sonuca göre menopoz grubu, diğer gruplara göre daha yüksek DNA hasar seviyesine sahiptir

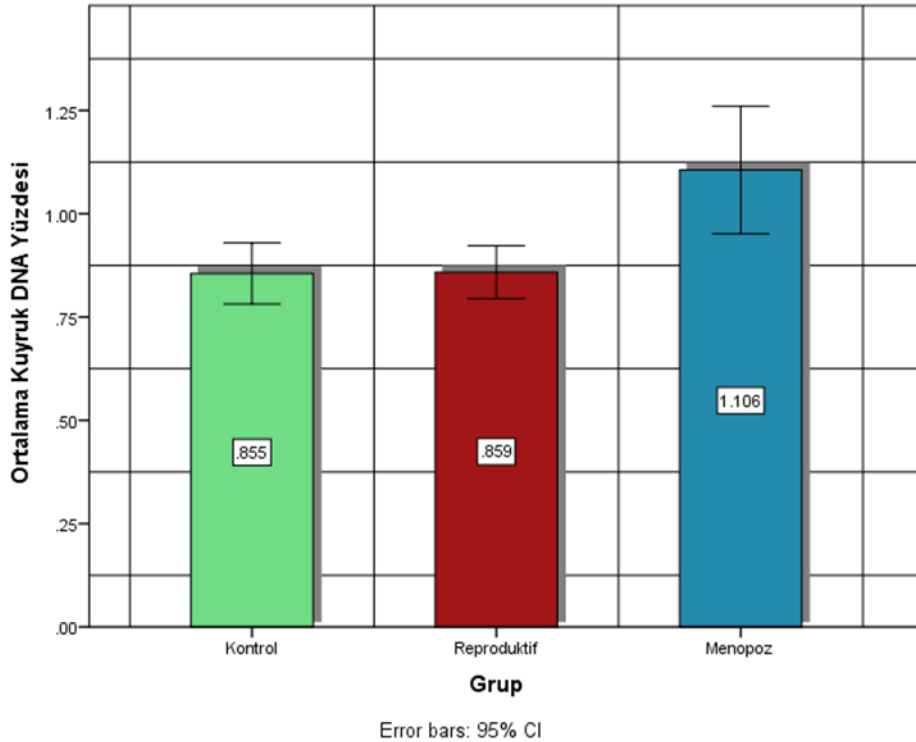


Şekil 17. Reprodüktif, Menopoz ve kontrol, gruplarına ait ortalama kuyruk uzunluğu

Tablo 9. Reprodüktif, Menopoz ve kontrol, gruplarına ait Kuyruk DNA Yüzdesi karşılaştırması

	Grup	Mean	Std. Error	Minumum	Maximum
Kuyruk DNA Yüzdesi	Kontrol	0.85	0.03	0	10.43
	Reprodüktif	0.85	0.03	0.1	11.34
	Menopoz	1.10	0.07	0	58.64

Kontrol, Reprodüktif ve Menopoz gruplarında kuyruk DNA yüzdesi karşılaştırması yapıldığında kuyruk uzunluğu, menopoz grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Kontrol ve reprodüktif grupları arasında benzer sonuçlar elde edilmiştir ($p > 0.05$). Şekil 18’de grafik bilgileri, gösterilmiştir. İstatistiki verilere göre menopoz grubu diğer gruplara göre daha yüksek DNA hasar seviyesine sahiptir.



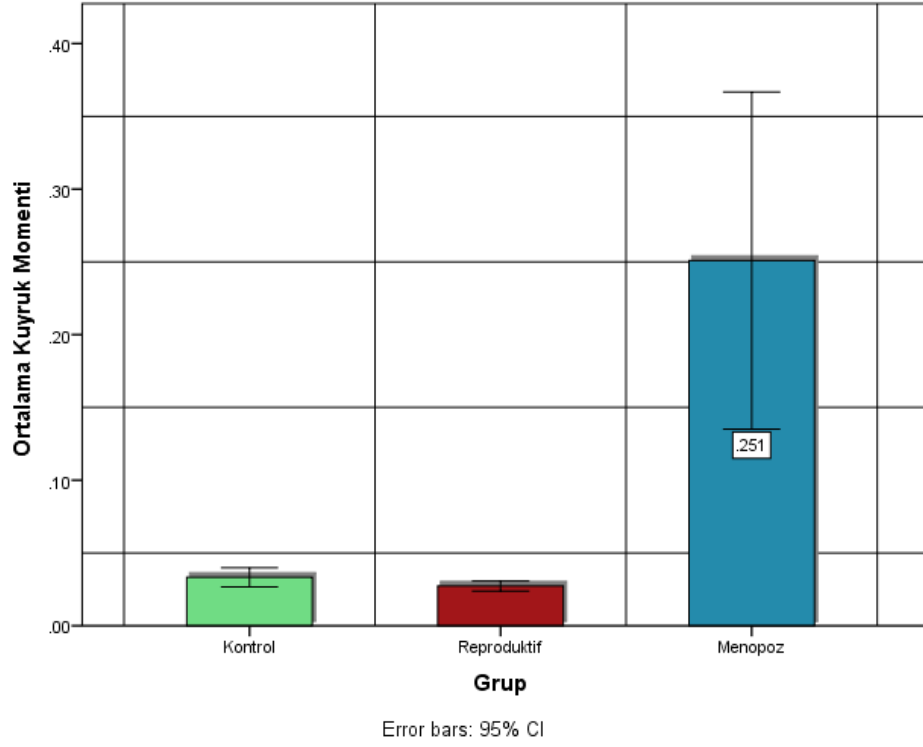
Şekil 18. Reprodüktif, Menopoz ve kontrol gruplarına ait ortalama Kuyruk DNA Yüzdesi

Tablo 10. Reprodüktif, Menopoz ve kontrol gruplarına ait Kuyruk Momenti karşılaştırması

	Grup	Mean	Std. Error	Minumum	Maximum
Kuyruk Momenti	Kontrol	0.03	0.08	0	1.46
	Reprodüktif	0.02	0.05	0	0.5
	Menopoz	0.25	2.06	0	38.55

DNA hasarının diğeri bir göstergesi olan kuyruk momenti karşılaştırması Reprodüktif, Menopoz ve kontrol gruplarında yapıldığında yine menopoz grubunda kuyruk momenti diğeri gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bulunurken ($p < 0.05$), kontrol ve reprodüktif grupları arasında benzer sonuçlar elde edilmiştir ($p > 0.05$). Şekil 19’da grafik bilgileri, gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre menopoz grubu diğeri gruplara göre daha yüksek DNA hasar seviyesine sahiptir.

DNA hasarının birer göstergesi olan üç farklı parametre, menopoz grubunda diğeri gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Artan yaş ile birlikte kuyruk uzunluğu, kuyruk DNA yüzdesi ve kuyruk momenti parametrelerinde ve dolayısıyla DNA hasarında artış görülmüştür. Yaş ile DNA hasarı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu görülmektedir ($p < 0.05$).



Şekil 19. Reproduktif, Menopoz ve kontrol gruplarına ait ortalama Kuyruk Momenti.

Mikronükleus testi, reproduktif ve menopoz grupları arasında, Binükleus(BN), Mikronükleus(MN) ve Karyoreksiz (KR) frekansları bakımından Independent sample T test kullanılarak karşılaştırılmıştır. Tablo 11.'de gruplara ait istatistiksel değerler yer almaktadır. Her iki grupta BN, MN ve KR yapılarına rastlanmasına rağmen verilerin analiz sonucu gruplar arasında benzer bulunmuştur ($p>0.05$).

Tablo 11. Reproduktif ve Menopoz gruplarına ait Binükleus(BN), Mikronükleus(MN) ve Karyoreksiz (KR) parametrelerine ait istatistiksel değerler

Sitomorfometrik parametreler	Reproduktif grup (n=30)		Menopoz grup (n=30)		P değeri
	mean \pm SD	median (min.–max.)	mean \pm SD	median (min.–max.)	
BN	0.11 \pm 0.08	0.1(0-0.2)	0.18 \pm 0.25	0.1 (0-0.7)	0.474
MN	0.087 \pm 0.08	0.1 (0-0.2)	0.03 \pm 0.08	0(0-0.2)	0.249
KR		-	0.1 \pm 0.24	0(0-0.6)	0.264

5. TARTIŞMA

Yaşlanma mekanizmasının temelini oluşturan faktörlerin nedeni tam olarak bilinmese de, yaşlanmada serbest radikallerin rol oynadığı genel olarak kabul edilmektedir. Reaktif oksijen türleri, hücre içerisinde meydana gelerek lipid, protein ve DNA gibi moleküllerde hasar oluşmasına sebep olmaktadır (56). DNA'da oluşan bu oksidatif hasar, mutagenезisin, karsinogenезisin ve yaşlanmanın göstergesidir. DNA'yı oluşturan bileşenler içerisinde Guanin (G) en düşük iyonizasyon potansiyeline sahiptir ve serbest radikallerden gelen etkilere karşı kolayca etkilenebilmektedir. Bu sebeple de ROS'un başlıca hedefi haline gelerek DNA replikasyonu sırasında GC'den AT'ye dönüşümü sonucu mutasyona eğilimini arttırmaktadır (57).

Oksidatif stress'in kanser, diyabet ve kalp hastalıkları başta olmak üzere pek çok patolojik tablonun ve yaşlanmanın patogenezi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Şiddetli ve kalıcı oksidatif stres varlığında gerçekleşen apoptozis, yaşlanma ile birlikte insidansı artan alzheimer, parkinson gibi benzer hastalıklara sebep olmaktadır. (58). Postmenopozal dönemde östrojen eksikliğine bağlı olarak çeşitli dokularda atrofi başlamakta ve sekonder seks karakterlerinde gerileme görülmektedir. Üriner sistemde de östrojen eksikliğine bağlı olarak mesane ve üretra mukozasında incelme başlar. Postmenopozal dönemde sık sık idrara gitme, sistit ve üriner sistem enfeksiyonu gibi durumlarda artış gözlenmektedir (59). Meydana gelen hastalıkların kısmen ya da tamamen önlenmesi yaşam biçimi modifikasyonları, risk etmenlerinin tedavisi, primer veya sekonder koruyucu uygulamaların düzenlenmesi ile mümkün olabilmektedir (58).

Araştırmamızın Comet test sonuçları da menopoz dönemindeki grubun DNA hasarının, reproduktif ve kontrol grubu kadınlara göre daha yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca, yaşlanmayla birlikte artan oksidatif stres ve değişen hormon düzeylerinin DNA hasarına sebep olabileceğini de ortaya koymaktadır. Yapılan çalışmalarda menopozal dönemde DNA hasarının arttığını göstermektedir. Öğüt ve Atay (2012), artan yaşla birlikte oksidatif stresin arttığını ve beraberinde birçok

hastalığa sebep olduğunu (58), Giovannellia ve ark. (2003), ratlarda yaptığı çalışmada Comet Testi değerlendirmesi sonucunda yaşlanmayla DNA'da hasar derecesinin arttığını belirtmiştir (60). Fidan çalışmasında (2008), Comet testinin hücre düzeyinde DNA hasar tespitinde kullanılan, hızlı, basit ve çok hassas bir yöntem olduğunu belirtmiştir (61). Ozcağı ve ark. (2005), hormon replasman tedavisi uygulanan postmenopozal dönemdeki kadınlarda DNA hasarını, Comet testi ile değerlendirmişler ve tedavinin DNA hasarını azalttığını bulmuşlardır (62). Oksidatif hasarı azalttığı bilinen karotenoidlerin (β -karoten, lutein, ve likopen) postmenopozal dönemdeki kişilere uygulandığı diğer bir çalışmada da Zhao ve ark. (2016) hastaların başlangıçtaki DNA hasar değerlerinde bir azalma olduğunu ve düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olduğunu bulmuşlardır (63). Göğüs kanserli ve sağlıklı kişilerin DNA hasarlarının karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada ise göğüs kanseri hastalarında artan Mikronükleus ve Comet değerlerinin sağlıklı bireylere göre, hasta bireylerde istatistiki açıdan sonuç anlamlı bulunurken, yaşla ilgili olarak anlamlı bulunmamıştır (64).

Yaş artışı ve çevresel ajanlarında etkisiyle normal kromozom bölünmesi etkilenecek anoploidi sıklığında artış meydana gelmektedir. Yaşlanma ile birlikte hücrelerin mitotik aktivitesi yavaşlamakta, mitoz bölünmede iğ iplikçiklerinde katalizör görevi yapan enzimlerde dejenerasyon oluşmaktadır (47). Mikronükleus tekniği, bu hasarların belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Nersesyan ve ark. (2002), yapmış oldukları bir çalışmada 10 post menopozal ve 10 sağlıklı Ermeni kadının bukkal ve servikal epitel hücrelerini MN ve diğer nükleer anomaliler açısından karşılaştırmış, MN frekansında önemli bir değişimin olmadığını fakat diğer nükleer anomaliler açısından farklılık olduğunu belirlemişlerdir (65). Casella ve ark. (2005), Hormon replasman tedavisi uyguladıkları kişilerde MN tekniği ile DNA hasarı arasındaki ilişkiyi incelemişler ve anlamlı bir sonuç elde edememişlerdir (66). Postmenopozal hormonal terapinin uterin serviks yüzey hücrelerinde genetik hasar üzerine etkilerini ortaya koyan bir çalışmada, Yüksel ve ark. (2007), hormon tedavisi alan ve kontrol grubu arasında MN sonuçlarının benzer olduğunu bulmuşlardır ($p>0.05$) (67).

Safi-Öz ve ark. Candida ile enfekte olmuş grubun servikal epitel hücrelerinde mikronükleer, nükleer anomaliler ve çekirdek / sitoplazma oranının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir (16). Üstüner (2011), mikronükleus testinin kanser tedavisi sırasında ve genotoksisite belirlemede kullanılabileceğini, kromozom kırığı ve apoptoz - kanser yolağındaki mekanizmaların aydınlanmasında da faydalı olacağını belirtirken (47), Demirel ve Zamani (2002), MN oluşum sıklığındaki artışın, genetik materyalde oluşan hasarın bir göstergesi olarak değerlendirildiğini bildirmişlerdir (46).

Yapılan diğer çalışmalarda da artan yaşla birlikte MN sıklığında artış olduğu rapor edilmektedir. Thierens ve ark. (1996) radyoloji çalışanlarında yaptığı çalışmada (68), Migliore ve ark. (1991) çevresel kontaminasyonlara maruz kalan tabakhane işçilerinde MN frekansının yaşla birlikte arttığını belirtmişlerdir (69). Çalışmamızda reproduktif ve menopoz grubunda mikronükleus, binükleus, karyoreksiz gibi yapılar tespit edilmiş olup istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir ($p>0.05$).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yaşlanma ile birlikte meydana gelen fizyolojik ve anatomik değişiklikler hastalıkların gelişmesini ve sonucunu etkilemektedir. Yirminci yüzyılda dünyada olduğu gibi ülkemizde de, enfeksiyon hastalıklarının kontrolü, beslenme ve sağlık hizmet olanaklarının gelişmesi ile ortalama yaşam süresinde artış meydana gelmiştir (58). Menopozda artan yaşla birlikte; serbest radikal miktarında artış söz konusudur. Çünkü hem antioksidatif savunma mekanizmalarında hem de zarara uğramış moleküllerin tamirinde görülen azalmalar, oksidatif stres miktarında artışa neden olmaktadır. Oksidatif stres, serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizlik sonucunda doku hasarına neden olmaktadır (6-7-63).

Çalışmamızda, menopoz grubunda yaşla birlikte artan DNA hasarı, comet testi ile değerlendirilmiş ve menopoz grubunda, reproduktif ve kontrol grubuna göre cometteki artış istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. İlerleyen yaşla birlikte, artan oksidatif stres ve hormon seviyelerindeki değişimin DNA hasarı oluşturduğu tahmin edilmektedir. DNA hasarı başta kanser olmak üzere birçok hastalığın kaynağı olarak bilinmektedir. Oksidatif hasarın yaşlanma ile artışı birçok kaynak tarafından doğrulanmaktadır. Bunun önlenmesi ya da en aza indirgenmesi için bireylerin beslenme ve uyku alışkanlıklarının düzenlenmesi, sağlık kontrollerinin düzenli yaptırılması, hatta ihtiyaç halinde hekim kontrolünde hormon tedavisi almaları önem arz etmektedir.

Kadınlar reproduktif dönemi boyunca estrogenin olumlu etkileri ile birçok sağlık problemlerinden korunmaktadırlar. İlerleyen yaşla birlikte estrogen miktarındaki azalma, bu azalmanın diğer hormon düzeylerini olumsuz etkilemesi ve hücrelerin yaşlanması ile DNA hasarı oluşmaktadır. Yapılan birçok çalışma menopoz döneminde ilerleyen yaşla birlikte MN frekansında artış olduğu göstermektedir.

Çalışmamızda, yaş ortalaması $57,26 \pm 5,8$ olan 30 kişiye ait menopozal dönem smear yaymalarında, mikronükleus ve diğer nükleer anomaliler hesaplanmış ve reproduktif döneme kıyasla anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Mikronükleus

testinde daha kapsamlı ve hassas bir araştırılma uygulanabilmesi için menopoz ve reproduktif grubunun örneklem sayısının arttırılması, bireylerin östrojen düzeylerinin saptanması ile elde edilen verilerin paralel olarak değerlendirmesi yapılacak olan yeni çalışmalar için yönlendirici olması açısından dikkat edilecek bir husustur.



ÖZET

Reproduktif ve Menopozal Dönem Servikal Yayma ve Kan Örneklerinde DNA Hasar Tespitinin Mikronükleus ve Komet Testleri ile Değerlendirilmesi

Son yıllarda dünyada ve ülkemizde kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve enfeksiyon hastalıklarındaki artış tartışılmaz bir gerçektir. Yaşla ilişkili biyokimyasal mekanizmalarda meydana gelen moleküler değişiklikler apoptozisi hızlandırarak oositlerin sayısını azaltmaktadır. Menapozla birlikte oosit sayısı azalmakta ve nükleusta dağınıklık, kromozom dekonansasyonu gibi nükleus anomalileri görülmektedir. Menapozda östrojen seviyesindeki azalma ve artan yaş; vasküler hastalıklara, kansere ve enfeksiyon artışına neden olabilmektedir. Özellikle post menopozal dönemdeki kadınlarda meme, kolon, akciğer kanserlerindeki artış ölümlerin en sık nedenlerindedir.

Bu çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalına başvuran hastalarda reproduktif ve menopoz dönemi arasındaki DNA hasarı ilişkisi araştırılmıştır. 30 reproduktif ve 30 menopoz grubunun DNA hasarı Comet metodu ile değerlendirilmiş ve 30 kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Menopoz grubunda DNA hasarı daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Mikronükleus testinde ise 30 reproduktif ve 30 menopoz döneme ait veriler karşılaştırılmış fakat DNA hasarı açısından bir fark tespit edilememiştir ($p>0.05$).

Anahtar Kelimeler: Comet, Mikronükleus, DNA Hasarı, Menopoz

ABSTRACT

Detection and Evaluation of DNA Damage with Micronucleus Test and Comet Assay in Cervical Smear and Blood Sample in Reproductive-Menopausal Period

There is an indisputable fact that increase in cancer, cardiovascular and infectious diseases around the world and our country in recent years. Molecular changes that occur in age-related biochemical mechanism, through the stimulation of apoptosis, reduces the number of oocytes. Together with menopause the number of oocytes decrease and is seen nucleus abnormalities like nucleus clutters and chromosome decondensation

In menopause, declining estrogen level and increasing age can cause vascular disease, cancer and infections. Breast, colon and lung cancer increase is the leading cause of death especially in post- menopausal period in women. In this study, Suleyman Demirel University School of Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology department patients admitted to the relationship between reproductive and menopause DNA damage was evaluated. 30 reproductive and 30 postmenopausal group's DNA damage was evaluated by Comet method and compared with control group. DNA damage was higher in postmenopausal group ($p<0.05$). In the micronucleus test 30 reproductive and 30 menopausal period data were compared but not difference in DNA damage was detected ($p>0.05$).

Keywords: Comet, Micronucleus, DNA damage, Menopause

KAYNAKLAR

1. Avcı S. Menopoz Dönemindeki Kadınlarda Menopoz Semptomlarının Yaşam Kalitesine Etkisi. Haliç Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, (Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ayşe Yıldız), 2013; 3-18.
2. Aydemir İH. Edirne İl Merkezindeki 40–59 Yaş Arası Kadınların Sağlıkla İlişkili Yaşam Kalitelerinin Değerlendirilmesi. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Aile Hekimliği Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Edirne, (Tez Danışmanı: Doç. Dr. H. Nezih Dağdeviren), 2007; 1.
3. Halliwell B, Aruoma OI. DNA Damage by Oxygen-Derived Species. Its Mechanism and Measurement in Mammalian Systems. *Febs Letters* 1991; 281(1,2): 9-19.
4. Bedir A, Bilgici B, Yurdakul Z, Gürsel ŞB, Alvur M. The Comparison of μ -Fadu and Comet Methods in DNA Damage Analysis. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi* 2004; 2(3): 97-103.
5. Fidan FA. DNA Hasar Tespitinde Tek Hücre Jel Elektroforezi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi* 2008; 8(1): 41-52.
6. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative Stress, Caloricrestriction and Aging. *Science* 1996; 273: 59-63.
7. Çavdaroğlu B, Köse N, Başkol G, Demir H. Evaluation of Protein and Lipid Oxidative Stress in the Patients with Postmenopausal Osteoporosis. *Dicle Medical Journal* 2014; 41 (1): 71-7.
8. Bayraktar-Görgel E, Çakıroğlu PF. Menopoz Döneminde Kadın. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi, 2007, s. 1-4.
9. Bezircioğlu İ, Gülseren L, Öniz A, Kındıroğlu N. Menopoz Öncesi ve Sonrası Dönemde Depresyon- Anksiyete ve Yitimi, *Türk Psikiyatri Dergisi* 2004; 15(3): 199-207.
10. Atmaca E, Aksoy A. Oksidatif DNA Hasarı ve Kromatografik Yöntemlerle Tespit Edilmesi. *Veteriner Fakültesi Dergisi* 2009; 20(2): 79-83.

11. Aydın M. Candida Cinsi Mantarlar (C. Albicans). Ed. Cengiz, Mısırlıgil, Aydın. Tıp ve Diş Hekimliğinde Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Yayınevi, 2004, s. 1109-1118.
12. Kocyigit A, Keles H, Selek S, Guzel S, Celik H, Erel O. Increased DNA Damage and Oxidative Stress in Patients with Cutaneous Leishmaniasis. Mutation Research 2005; 585(1-2): 71-8.
13. Vandghanooni S, Eskandani M. Comet Assay: A Method to Evaluate Genotoxicity of Nano-Drug Delivery System. BioImpacts 2011; 1 (2): 87-97.
14. Hovhannisyann GG. Fluorescence İn Situ Hybridization in Combination with The Comet Assay and Micronucleus Test in Genetic Toxicology. Molecular Cytogenetics 2010; 3 (17): 1-11.
15. Damla E. Myricetin'in Radyoprotektif Etkisinin Mikronükleus Yöntemiyle İn Vitro şartlarda İncelenmesi. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Edirne, (Yrd. Doç. Dr. Funda Sibel Pala), 2013; 2.
16. Safi Oz Z, Dogan Gun B, Ozdamar SO. Evaluation of Micronuclei, Nuclear Anomalies and Nuclear/Cytoplasmic Ratio of Exfoliated Cervical Epithelial Cells in Genital Candidiasis. Acta Cytologica 2015; 59: 180-6.
17. Tuna V. Cerrahi Menopoz ve Doğal Menopoz Olgularında Kan Lipid Profili, Trombotik Sistem, Arteriyel Elastisite ve Psikoseksüel Parametrelerdeki Değişiklikler. Bakırkoy Doğumevi Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Uzmanlık Tezi, İstanbul, (Tez Danışmanı: Dr. Ali İsmet TEKİRDAĞ), 2005; 9-15.
18. Özcan H, Oskay Ü. Menopoz Döneminde Semptom Yönetiminde Kanıta Dayalı Uygulamalar. Göztepe Tıp Dergisi 2013; 28(4): 157-163.
19. Fakıllı EF. Menopoza Girmiş Kadınların Beslenme Durumları ile Fiziksel Aktivite ve Beslenme Bilgi Düzeylerinin Belirlenmesi. Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Mendane Saka), 2013; 1.
20. Şen S, Usta E, Aygin D, Sert H. Yaşlılık ve Cinsellik Konusunda Sağlık Profesyonellerinin Yaklaşımları. Kadın Cinsel Sağlığı 2015; 60(17): 64-7.

21. Sis-Çelik A, Pasinoğlu T. Klimakterik Dönemdeki Kadınların Yaşadıkları Menopozal Semptomlar ve Etkileyen Faktörler. Hacettepe Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Dergisi 2014; 16–29.
22. Bıçakçı T. Östrojen Replasman (ert) ve Hormone Replasman Tedavisi (hrt) Alan Postmenopozal Kadınlarda Serum sVCAM, sE-selektin, Leptin Düzeylerinin Menopozun Patofizyolojisi ve Oksidatif Stres Parametreleri ile İlişkisi. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıpta Uzmanlık Tezi, Aydın, (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Çiğdem Yenisey), 2007; 9-13.
23. Durmaz ÇÇ. Cerrahi Menopozdaki Hastalarda Kullanılan Çeşitli Östrojen Formlarının İnsulin Sensitivitesi Üzerine Olan Etkilerinin Değerlendirilmesi. Sağlık Bakanlığı Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi I. Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, İstanbul, (Tez Danışmanı: Op. Dr. Ramazan Dansuk), 2005; 10.
24. Roy D, Liehr GJ. Estrogen, DNA Damage and Mutations. Mutation Research 1999; 424: 107–115.
25. Barry L, Hamer MD, Maria V, Gibson MD. Vaginitis: Diagnosis and Treatment. American Family Physician 2011; 83(7): 807-815.
26. Balcı O, Çapar M. Vajinal Enfeksiyonlar. Turkish Journal of Obstetrics and Gynecology. 2005; 2(5): 14-20.
27. Turhan F. Vajinal Sekresyondan İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerine Ait Bazı Suşların Potansiyel Probiyotik Özelliklerin Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özlem Osmanağaoğlu), 2011; 7.
28. Altoparlak Ü, Kadanlı A, Kadanlı S. Menopoz Sonrası Dönemdeki Kadınlarda Üriner Sistem Enfeksiyonları ile Vajinal Kolonizasyonun İlişkisi. Mikrobiyoloji Bülteni 2004; 38: 377-383.
29. Gökalsan H, Uyar EE. PAP Smear ile Servikal Kanser Taraması. Türk Aile Hek Derg 2004; 8(3): 105-110.
30. Safi Z. Examination of Cellular Changes Belonging to Human Papillomavirus (Hpv) on Cervico-Vaginal Smears and Polymerase Chain Reaction (Pcr). Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara, (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şayeste Demirezen), 2004: 22-8.

31. Müftüoğlu M. DNA Tamiri ve Erken Yaşlanma Sendromları. Türk Biyokimya Dergisi 2003; 28 (1): 20-4.
32. Atmaca E, Aksoy Abdurrahman. Oksidatif DNA Hasarı ve Kromatografik Yöntemlerle Tespit Edilmesi. Y.Y.U. Veteriner Fakültesi Dergisi 2009; 20(2): 79-83.
33. Bedir A, Bilgici B, Yurdakul Z. Gürsel ŞB, Alvir M. The Comparison of μ -Fadu and Comet Methods in DNA Damage Analysis. Türk Klinik Biyokimya Dergisi 2004; 2(3): 97-103.
34. Onur E, Tuğrul B, Bozyiğit F. DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları. Türk Klinik Biyokimya Dergisi 2009; 7(2): 61-70.
35. Bozkaya Giray Ö. Pediatrik Genetik. DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi 2008; 22(3): 171-179.
36. Fındıklı Z. Bazı Gıda Katkı Maddelerinin İnsan Periferik Lenfosit Kültürü Üzerine Olan Etkisinin Comet Yöntemi ile Belirlenmesi. Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Sivas (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Şifa Türkoğlu), 2012: 24-5.
37. Ünlü S, Sağlar E. Tek Hücre Jel Elektrofrez Yöntemi İçin Alternative Güvenli Boyalar. Cumhuriyet Tıp Dergisi 2012; 34: 393-8.
38. Dikilitas M, Koçyigit A. Canlılarda “Tek Hücre Jel Elektrofrez” Yöntemi ile DNA Hasar Analizi (Teknik Not): Comet Analiz Yöntemi. Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 2010; 14 (2): 77- 89.
39. Atkaya ÇH. Yeni Depresyon ve/veya Dikkat Eksikliği ve Hiperaktivite Bozukluğu Tanısı Almış Erişkinlerde Psikotrop İlaçların (Psikostimülan, Antipsikotik, Antidepresan İlaçların) Periferik Lökositlerde Erken DNA Hasarına Etkisinin Comet Analizi Kullanılarak İncelenmesi. Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Uzmanlık Tezi, Denizli, (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hasan Herken), 2014: 35-6.
40. Şahin T. Subkronik Tiner İnhalasyonunun Ratlarda DNA Hasarı, Protein Oksidasyonu, Lipid Peroksidasyonu ile Bazı Biyokimyasal Parametrelerdeki Değişimleri ve Bunlara α -Lipoik Asitin Etkisinin Araştırılması. Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Afyon, (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Muhsin KONUK), 2008: 41.

41. Aksakal S. Gümüş ve kobalt nanopartiküllerinin ve iyonik formlarının genotoksik potansiyellerinin komet yöntemi ile araştırılması. Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, ((Tez Danışmanı: Prof. Dr. Bülent Kaya), 2014: 11.
42. Durmaz A, Dikmen N, Gündüz C. DNA Hasar Analizinde Tek Hücre Jel Elektroforezi (Komet Yöntemi). Arşiv 2010; 19: 236-243.
43. Atlı-Şekeroğlu Z, Şekeroğlu V. Genetik Toksikite Testleri. Tüfav Bilim 2011; 4(3): 221-9.
44. Fairbairn WD, Olive LP, O'Neill LK. The Comet Assay: A Comprehensive Review. Mutation Research 1995; 339: 37-59.
45. Collins A, Duşinska M, Franklin M, Somorovska' M, Petrovska H, Duthie S, Fillion L, Panayiotidis M, Raslova K, Vaughan N. Comet Assay in Human Biomonitoring Studies: Reliability, Validation, and Applications. Environmental and Molecular Mutagenesis 1997; 30: 139-146.
46. Demirel S, Zamani GA. Mikronükleus Tekniği ve Kullanım Alanları. Genel Tıp Dergisi 2002;12(3): 123-7.
47. Üstüner D. Kromozom Kırıkları ve Mikronükleus-Apoptoz Bağlantısı. Tüfav Bilim Dergisi 2011; 4(1): 64-9.
48. Arıkan Ş, Gülten T, Yakut T. Benzalkonyum Klorürün İnsan Lenfositleri Üzerindeki Genotoksik Etkisinin Araştırılması. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2012; 38(1): 13-8.
49. Ambrose MM, Balasundaram K, Phansalkar M. Predictive Value of Micronucleus Count in Cervical Intraepithelial Neoplasia and Carcinoma. Türk Patoloji Dergisi 2013, 29: 171-8.
50. Şekeroğlu V, Atlı-Şekeroğlu Z. Genotoksik Hasarın Belirlenmesinde Mikronükleus Testi. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 2011; 68(4): 241-252.
51. Yıldırım A, Yıldırım-Selman M. Matbaa Sanayinde Çalışan İşçilerin Bukkal Mukoza Hücrelerinde Mikronükleus ve Binükleotid Sıklığının Belirlenmesi. Tıp Araştırmaları Dergisi 2011 : 9(1): 25-8.

52. Yüzbasıoğlu D, Zengin N, Ünal F. Gıda Koruyucuları ve Genotoksisite Testleri. *Gıda Dergisi* 2014; 39(3): 179-186.
53. Söylemez E. Sigara Kullananlarda Kan Kadmiyum Düzeyi ve Lenfosit DNA Hasarının Belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, (Prof. Dr. Halil GÜMÜŞ), 2011; 22.
54. Güner U, Muranlı Gökalp DF. Balıklarda Tek Hücre Jel Elektrofözezi (Comet Assay). *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi* 2013; 3(9): 103-114.
55. Fenech, M. Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay. *Nature Protocols* 2007; 2: 1084-1104.
56. Lee JY, Chung YH, Kwak KH, Yoon S. The effects of *A. senticosus* supplementation on serum lipid profiles, biomarkers of oxidative stress, and lymphocyte DNA damage in postmenopausal women. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008; 375:
57. Yokuş B, Çakır ÜD. *nvivo* Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkeri; 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 2002; 22: 535-543.
58. Öğüt S, Atay E. Yaşlılık ve Oksidatif Stress. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.* 2012; 19(2): 68-74.
59. Saraçoğlu F. Menopoz ve Hormon Replasman Tedavisi Osteoporoz, Kardiyovasküler Hastalıklar, Karbonhidrat Metabolizması ve Kanseri Gelişimi vb. Üzerindeki Etkileri. *Turkish Journal of Geriatrics* 1998; 1(2): 76-88.
60. Giovannella L, Decorosib F, Dolaraa P, Pulvirentib L, Vulnerability to DNA damage in the aging rat substantia nigra: a study with the comet assay. *Brain research* 2003; 969 (1): 244-7.
61. Fidan FA. DNA Hasar Tespitinde Tek Hücre Jel Elektrofözezi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi* 2009; 8(1): 41-52.
63. Ozcağli E, Sardas S, Biri A. Assessment of DNA damage in postmenopausal women under hormone replacement therapy. *Maturitas* 2005; 51(3): 280-5.

64. Zhao X, Aldini G, Johnson EJ, Rasmussen H, Kraemer K, Woolf H, Musaeus N, Krinsky NI, Russell RM, and Yeum KJ. Modification of lymphocyte DNA damage by carotenoid supplementation in postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2006; 83: 163–9.
65. Santos RA, Teixeira AC, Mayorano MB, Carrara HHA, Andrade JM, Takahashi CS. Basal levels of DNA damage detected by micronuclei and comet assays in untreated breast cancer patients and healthy women. *Clinical and Experimental Medicine* 2010; 10(2,): 87-92.
66. Nersesyan KA, Vartazaryan SN, Arutyunyan MR. Micronuclei and Other Nuclear Anomalies in Exfoliated Buccal and Uterine Cervical Cells of Healthy Armenian Women. *Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine* 2002; 8(1): 12-6.
67. Casella M, Manfredi S, Andreassi GM, Vassalle C, Prontera C, Simi S, Maffei S. Hormone replacement therapy: One-year follow up of DNA damage. *Mutation Research* 2005; 585: 14–20.
68. Yüksel Ş, Haşçalık Ş, Çelik Ö, Yıldırım Hİ, Özşahin M, Sungurtekin Ü. Postmenopozal Hormonal Terapinin Uterin Serviks Yüzey Hücrelerinde Genetik Hasar Üzerine Etkileri. *Türkiye Klinikleri Journal of Gynecology and Obstetrics* 2007; 17(6): 431-5.
69. Thierens H., Vral A., De Ridder L. A cytogenetic study of radiological workers: effect of age, smoking and radiation burden on the micronucleus frequency. *Mutation Research* 1996; 360(2): 75-82.
70. Migliore L., , Parrini M., Sbrana I., Biagini C., Battaglia A., Loprieno N. Micronucleated lymphocytes in people occupationally exposed to potential environmental contaminants: the age effect. *Mutation Research* 1991; 256(1): 13-20.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı: Okan

Soyadı: SANCER

Doğum yeri: Isparta

Medeni durum: Bekar

E-mail : okansancer@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi, **Biyoloji** Bölümü (2007 – 2011)

Yüksek Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı (2013-2015)

Yüksek Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (2013-...)

Pedagojik Formasyon: 2012-2013, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Pedagojik Formasyon Eğitimi.

PROJELER

- 1- Süleyman Demirel Üniversitesi- BAP Koordinasyonları Birimi Yüksek Lisans Araştırma Projesi, Kovada Gölü (Isparta)'nın suyunda, sedimentinde, gölde yetişen karnı (Phragmites australis (Cav.) Trin.ex Steud. 1841)'de ve ağır metal düzeyinin belirlenmesi, 2014-2015.
- 2- Süleyman Demirel Üniversitesi- BAP Koordinasyonları Birimi Yüksek Lisans Araştırma Projesi, Reprodüktif ve Menopozal Dönem Servikal Yayıma ve Kan Örneklerinde DNA Hasar Tespitinin Mikronükleus ve Komet Testleri ile Değerlendirilmesi, 2015-2016

Yabancı dil: İngilizce (Orta e-YDS: 61,25)

EK

Etik Kurul Kararı


T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 72867572-050- 2226
Konu : Etik Kurul Kararı

21-07-2015

Sayın Yrd. Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Sorumlu araştırmacı olduğunuz "Reproduktif ve Menopozal Dönem Servikal Yayma ve Kan Örneklerinde DNA Hasar Tespitinin Mikronükleus ve Komet Testleri ile Değerlendirilmesi" isimli çalışmanızın kurumumuz tarafından uygun görüldüğüne ilişkin 15/07/2015 tarih ve 165 sayılı Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Kararı yazımız ekinde gönderilmiştir.
Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. Mustafa AKÇAM
Başkan

Ek : Etik Kurul Kararı (2 Sayfa)

S.D.Ü. Tıp Fakültesi Dekanlığı Doğu Kampüsü 32260 - İSPARTA
Tel : 0 (246) 2113704 Faks : 0 (246) 2371165
e-posta : tipetik@sdu.edu.tr İnternet Adresi : www.tip.sdu.edu.tr

Bilgi için : İ.Em YETİŞEN
Bilgisayar İşletmeni
Tel : 0 (246) 2113704

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

Araştırmanın Açık Adı Araştırmanın Protokol Kodu	Reproduktif ve Menopozal Dönem Servikal Yayma ve Kan Örneklerinde DNA Hasar Tespitinin Mikronükleus ve Komet Testleri ile Değerlendirilmesi. (15.07.2015 tarih ve 165 sayılı karar)
---	--

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı - (2012-KAEK-38)			
	AÇIK ADRESİ	S.D.Ü. Doğu Kampüsü Tıp Fakültesi Dekanlığı Binası – ISPARTA			
	TELEFON	246.2113704			
	FAKS	246.2371165			
	E-POSTA	tipeetik@sdu.edu.tr			
BASVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd. Doç. Dr. Pınar ASLAN KOŞAR			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı			
	VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ	Süleyman Demirel Üniversitesi Bilişsel Araştırma Projeleri Birimi			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	Yüksek Lisans Öğrencisi Biyolog Okan SANCER			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	- ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1 : <input type="checkbox"/>	FAZ 2 : <input type="checkbox"/>	FAZ 3 : <input type="checkbox"/>	FAZ 4 : <input type="checkbox"/>
		Gözişsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>	
		Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>	
In vitro tıbbi tani cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırmaya		<input type="checkbox"/>			
Diğer ise belirtiniz : Deneysel					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dil	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ ÖNÖLÜ OLUR FORMU	02.07.2015		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama			
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>	S.D.Ü. B.A.P. Birimine müracaat edilincek.		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>			
	ILAN	<input type="checkbox"/>			
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>			
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>			
	GVENİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>			
DİĞER	<input type="checkbox"/>				

Prof. Dr. Mustafa AKSOY

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

Araştırmanın Açık Adı		Reproduktif ve Menopozal Dönem Servikal Yayma ve Kan Örneklerinde DNA							
Araştırmanın Protokol Kodu		Hasar Tespitinin Mikronükleus ve Komet Testleri ile Değerlendirilmesi							
KARAR BELGELERİ	Karar No: 165		Tarih: 15.07.2015						
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.								
	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.								
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU									
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. Mustafa AKÇAM							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlgili		Katılım *		İzine
Prof. Dr. Mustafa AKÇAM	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mustafa TÜZ	Kulak Burun Boğaz Hast.	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Fatih GÜLTEKİN	Tıbbi Biyokimya	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	IZINLI
Prof. Dr. Serpil DEMİRCİ	Nöroloji	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	IZINLI
Prof. Dr. Metin TOPÇUOĞLU	Hukuk	SDÜ Hukuk Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mekin SEZİK	Kadın Hast. ve Doğum	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Zeynep Dilek AYDIN	İç Hastalıkları	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Yonca SÖNMEZ	Halk Sağlığı	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Halil AŞCI	Farmakoloji	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Derya YILDIRIM	Ağız Diş ve Çene Radyoloji	SDÜ Diş Hek. Fak.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Derya CEYHAN	Pedodonti	SDÜ Diş Hek. Fak.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	IZINLI
Uzman Dr. İbrahim ERSOY	Kalp Damar Cerrahisi	Isparta Kamu Hastaneleri Birliği	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Uzman Dr. Onur ÜNAL	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Isparta Kamu Hastaneleri Birliği	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Mühendis Halil KARAKOÇ	Biyomedikal	SDÜ Rektörlüğü	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	IZINLI
Osman PARÇAOĞLU	Sivil Üye	Esnaf	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* : Toplantıda Bulunma