

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**SİGARAYA MARUZ KALAN PASİF İÇİCİ
DURUMUNDAKİ ÇOCUKLARDA KOTİNİN DÜZEYİ
İLE DNA HASARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Mehmet KILIÇ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Kabil SHERMATOV

ŞANLIURFA

2011

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**SİGARAYA MARUZ KALAN PASİF İÇİCİ
DURUMUNDAKİ ÇOCUKLARDA KOTİNİN DÜZEYİ
İLE DNA HASARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Mehmet KILIÇ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Kabil SHERMATOV

Bu tez, Harran Üniversitesi Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 1033 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA
2011

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimime ve tez hazırlamama sonsuz katkıda bulunan değerli hocam Doç. Dr. Kabil SHERMATOV'a,

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniğindeki uzmanlık eğitimim süresince her türlü konuda desteğini esirgemeyen, tecrübe ve deneyimlerini paylaşan değerli hocalarım; Prof. Dr. A. Himmet KARAZEYBEK, Prof. Dr. Akın İŞCAN, Prof. Dr. Ahmet KOÇ, Doç. Dr. Dost ZEYREK, Doç. Dr. Alpay ÇAKMAK, Doç. Dr. Ali AYÇİÇEK, Doç. Dr. Ali ATAŞ, Yrd. Doç. Dr. Mustafa SORAN, ve Yrd. Doç. Dr. Mahmut ABUHANDAN'a

Tez çalışmalarımıdaki yardım ve desteklerinden dolayı Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki sevgili hocam Prof. Dr. Abdurrahim KOÇYİĞİT'e ve laboratuvar çalışmaları esnasında yardımlarından dolayı Biyokimya AD. çalışanlarına, Dr. Hakim ÇELİK ve biyolog Abdullah TAŞKIN'a,

Uzmanlık eğitimimin değişik zamanlarında birlikte ekip ruhu içerisinde keyifli ve verimli şekilde çalışma fırsatını bulduğum ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, bazıları şu anda uzman, bazıları ise uzman adayı olan tüm asistanlık dönem arkadaşlarıma,

Eğitimim boyunca ilk günden beri şefkat ve desteklerini her zaman gördüğüm, yoğun iş yükümü hafifletmede bizlere sürekli yardımcı olan kliniğimizin tüm kıymetli hemşire ve sağlık memurlarına; çalışma ortamımızın temiz, rahat ve güvenli olmasına katkısı olan tüm personelimize,

Tıp eğitimim boyunca desteklerini ve dualarını esirgemeyen sevgili rahmetli babam İsa'ya, rahmetli annem Sariye'ye ve sevgili kardeşlerime,

Asistanlık eğitimim boyunca her türlü destek ve katkılarını esirgemeyen, sevgili eşim Hacer'e, canım oğlum İsa emir'e, canım kızım Sariye ceren'e,

...içtenlikle TEŞEKKÜRLERİMİ sunarım.

Dr. Mehmet KILIÇ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	İ
İÇİNDEKİLER	İİ
TABLolar DİZİNİ	İV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
SİMGE VE KISALTMALAR	VI
ÖZET	VIIİ
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Dünya’da ve Türkiye’de Sigara	2
2.2. Pasif Sigara Dumanın Tanımlanması ve Bileşenleri	3
2.3. Pasif Sigara İçiciliği ve Çocuklarda Oluşturduğu Riskler	5
2.4. Sigara Dumanı Maruziyetinin Ölçümü	7
2.5. DNA Yapı ve Fonksiyonu	12
2.5.1. DNA Hasarı Oluşum Nedenleri	15
2.5.2. DNA Hasarı Tipleri	17
2.5.2.1. Deaminasyon	18
2.5.2.2. Depürinasyon	18
2.5.2.3. Alkilasyon	19
2.5.2.4. T-T ve T-C Dimerleri Oluşumu	20
2.5.2.5. Replikasyon Hataları	20
2.5.2.6. Çift İplik Kırıkları Oluşumu	20
2.5.2.7. Oksidatif Hasarın Neden Olduğu DNA Hasarı	21
2.5.3. DNA Tamir Mekanizmaları	23
2.5.4. DNA Hasarının Tespiti	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Mononükleer Lökositlerin Seperasyonu	27
3.2. Comet Assay Yöntemi ile DNA Hasar Tayini	27
3.3. Yapılan İstatistiksel Analizler	29
4. BULGULAR	30

5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇLAR	38
7. EKLER	39
7.1. Anket Formu	39
8. KAYNAKLAR	41

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Çalışmadaki çocukların ortalama yaş, ağırlık, boy ve BMI değerlerinin karşılaştırılması	30
Tablo 2. Grupların idrar kotinin, DNA hasarı düzeyleri	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. DNA'nın çift sarmallı yapısı	12
Şekil 2. DNA'da replikasyon oluşumu	14
Şekil 3. Deaminasyon oluşumu	18
Şekil 4. Depürinasyon oluşumu	19
Şekil 5. Guanindeki kimyasal hasar bölgeleri	20
Şekil 6. Çift iplik kırıkları	21
Şekil 7. 8-hidrosguanin ve FapyGuo'nun oluşum mekanizmaları	22
Şekil 8. DNA hasarı sonucu oluşan süreç	23
Şekil 9. Sigara dumanına maruz kalmaya göre çocukların idrar kotinin seviyeleri	31
Şekil 10. Sigara dumanına maruz kalmaya göre çocukların DNA hasarı seviyeleri	32

SİMGE VE KISALTMALAR

AAD:	Ana Akım Dumanı
AB:	Avrupa Birliği
ABD:	Amerika Birleşik Devletleri
ABÖS:	Ani Bebek Ölüm Sendromu
AU:	Arbitrary Unit
Ark.:	Arkadaşları
YAD:	Yan Akım Dumanı
BMI:	Vücut Kitle İndeksi
OS:	Oksidatif Stres
cm:	Santimetre
CO:	Karbonmonoksit
ÇSD:	Çevresel Sigara Dumanı
DNA:	Deoksiribonükleik asit
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
FEV1:	1. Saniyedeki zorlu Vital Kapasite
GGST:	Global Gençlik Sigara Taraması
T:	Timin
A:	Adenin
C:	Sitozin
G:	Guanin
HO [•] :	Hidroksil
OONO [•] :	Peroksinitrat
IUGG:	İntrauterin Gelişme Geriliği
IG:	İmmünoglobulin
Kg:	Kilogram
m ² :	Metre kare
MDA:	Malondialdehid
ng:	Nanogram
O ₂ :	Oksijen
O ₂ ⁻ :	Süperoksit Radikali
NER:	Nükleotid Eksizyon Tamiri

BER:	Baz Eksizyon Tamiri
SCE:	Kardeş Kromozom Değişimi
SS:	Standart Sapma
PAHs:	Polisiklik Aromatik Karbon
ROS:	Reaktif Oksijen Türleri
ÜSYE:	Üst Solunum Yolu Enfeksiyonu

ÖZET

SİGARAYA MARUZ KALAN PASİF İÇİCİ DURUMUNDAKİ ÇOCUKLARDA KOTİNİN DÜZEYİ İLE DNA HASARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Dr. Mehmet KILIÇ

Uzmanlık Tezi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Amaç: Sigaraya maruz kalma; hem yaygınlığı hem de önlenabilir olması bakımından oldukça önemlidir. Risklerini tanımlamak ve sigara karşıt müdahalelerin yararlarını saymak için pasif sigara içiminin kesin biyokimyasal ölçümlerine gerek vardır. Sigaraya maruz kalmış sigara içmeyen kişilerde ve aktif sigara içicilerinde kotinin nikotinin en önemli ve en güvenilen biyomarkeridir. Sigara içimi sırasında çok sayıda serbest radikal ve reaktif oksijen ürünleri açığa çıkmaktadır. Sigara içimi veya maruziyetinin DNA hasarı üzerine çalışmalar yapılmış, ancak bu çalışmalarda kotinin düzeyi ile korelasyon kurulmamıştır.

Bu çalışmada amacımız sigaraya maruz kalan çocuklarda kotinin düzeyi ölçülerek maruziyet derecesini belirlemek ve maruziyet derecesiyle DNA hasarı arasındaki ilişkiyi belirleyerek sigaranın muhtemel karsinojen etkisini ortaya koymaktır.

Yöntem: Çalışmaya toplam 54 çocuk alındı. Çalışmada sigara maruziyetini değerlendirmek için anket ve idrar kotinin seviyelerinin tespiti yapılmıştır. Çocukların idrarından kotinin düzeyleri kemilüminesan yöntemiyle, periferik venöz kandan izole edilen mononükleer lökosit DNA incelemesi (comet assay) için kan örnekleri alındı. SPSS 11,5 kullanılarak istatistiksel analizler yapıldı. P değerinin <0,05 olması anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular: Ortalama idrar kotinin ve DNA hasarı düzeyleri sigaraya maruz kalan grupta sigaraya maruz kalmayan gruba göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Ortalama kotinin düzeyi ile DNA hasarı düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulundu.

Sonuç: Comet analizinin bu araştırmadaki sonuçları, pasif içici konumundaki çocukların bu riske maruz kalmayanlara göre genotoksisite bakımından risk altında olduklarını

kuvvetle düşündürmektedir. Bu araştırmanın ilk verileri ışığında ileride bu konuda comet yöntemiyle kapsamlı çalışmaların yapılması, daha somut yorumlara olanak sunabilecektir.

Çalışmamızda sigara dumanına maruz kalan pasif içici durumundaki çocuklarda maruziyet derecesinin objektif bir kriteri olan idrar kotinin düzeyi ile DNA hasarı arasında anlamlı pozitif korelasyonun bulunması kotininin pasif içici çocuklarda DNA hasarı açısından ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Pasif sigara, çocuk, kotinin, DNA hasarı

SUMMARY

EVALUATION OF DNA DAMAGE BY MEASURING URINARY COTININ IN CHILDREN EXPOSED TO PASSIVE CIGARETTE SMOKE

Dr. Mehmet KILIÇ

Residency Thesis, Department of Pediatrics

Aim: Exposure to cigarette smoke is important for its prevalence and preventability. Direct biochemical measurements of passive smoking are needed to define the risks associated with passive smoking and benefits of interventions against it. Cotinin is the most important and reliable biomarker of nicotine exposure in both active smokers and nonsmokers exposed to cigarette smoke. Many free radicals and reactive oxygen species are released into the tissue after smoke exposure. Several studies have searched for the association between cigarette smoking and/or exposure and DNA damage but cotinin level was not used for comparison.

The aim of this study was to measure cotinin to determine the degree of smoke exposure in children and define the association between the degree of exposure and DNA damage to reveal the potential carcinogenicity of it.

Method: The study group consisted of 54 children. To determine the degree of cigarette smoke exposure, all children were reviewed by a questionnaire and their urinary cotinin levels were measured. The urinary cotinin level was determined by chemiluminescence method. Mononuclear leucocytes were isolated from venous blood and DNA damage was measured by the Comet Assay. SPSS 11.5 was used for statistical analyses and $P < 0.05$ was considered significant.

Findings: Mean urinary cotinin level and DNA damage was higher in the group exposed to cigarette smoke as compared to children without any exposure. Mean cotinin level and DNA damage were found to be positively correlated.

Results: Results of the Comet analysis indicate that passive smokers of pediatric age group are more prone to genotoxicity than nonsmokers. The findings of this study suggest that more detailed studies using Comet analysis will allow for more concrete results in the future.

The finding of positive correlation between urinary cotinin and DNA damage in passive smoking children shows that urinary cotinin can be a reliable biomarker of DNA damage in these children.

Key Words: Passive cigarette smoking, child, cotinin, DNA damage

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sigara dumanı; her yerde karşılaşılabilecek ve oldukça yüksek oranda toksik çevresel bir kirleticidir. Sigara dumanına maruz kalma; hem yaygınlığı hem de önlenebilir olması bakımından oldukça önemlidir. Sigara içiciliğinin annenin gebeliğinde sigara kullanmasının, gebeliğe bağlı komplikasyonlar riskini artırması, intrauterin gelişme geriliği gibi hem anne hem de çocuk açısından zararlı sonuçlar doğurduğu, çeşitli organlarda malignensiye neden olduğu ve diğer birçok yan etkisi olduğu bilinmektedir (1). Düşük düzeyde çevresel sigara maruziyetinde bile çocuklarda solunumsal hastalıklar, astım ve diğer benzer problemler, ani çocuk ölümü sendromu, düşük doğum ağırlığı, lipid profilinde bozulma ve hemoglobin konsantrasyonunda azalma gibi zararlı etkiler görülebilir (2-6). Sigara dumanının 4000'den fazla bilinen ve bilinmeyen birçok kimyasal bileşeni vardır ve bunlar eksojen olarak yüksek miktarda serbest radikal oluşumuna neden olur (7). Sigara dumanı ile ilişkili artmış reaktif oksijen ürünlerinin üretiminin oksidan savunma sistem kapasitesini aşarak proteinler, lipidler ve DNA'da oksidatif hasarla sonuçlandığı bilinmektedir(8).

Aktif sigara içicilerinde ve sigara dumanına maruz kalmış sigara içmeyen kişilerde nikotinin en önemli ve en güvenilen biyomarkırı kotinindir (9). Çocuklarda pasif sigara içiciliği; yol açtığı diğer sağlık sorunlarının yanı sıra, genotoksisiteye bağlı potansiyel kanserojen etki bakımından da hayati önemdedir (10). Mutajenik etkinin hassas göstergesi olan DNA hasarı, ileride bu kişilerin kanser geliştirme olasılığının daha yüksek olması bakımından klinik önemi göz ardı edilmemelidir (11). Sigara içimi veya sigara dumanına maruziyetinin DNA üzerine etkisini araştıran az miktarda çalışmalar yapılmış olsada, Türkiye'de sigara dumanı etkisinde kalmanın objektif göstergesi olan kotinin düzeyi ile DNA hasarı arasındaki maruziyet derecesini inceleyen çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışmada amacımız sigaraya maruz kalan çocuklarda kotinin düzeyi ölçülerek maruziyet derecesini belirlemek ve maruziyet derecesiyle DNA hasarı arasındaki ilişkiyi belirleyerek sigaranın muhtemel karsinojen etkisini göstermektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dünya’da ve Türkiye’de Sigara

Sigara dumanına maruz kalma; hem yaygınlığı hem de önlenebilir olması bakımından oldukça önemlidir. Sigara içerdiği toksik maddelerin miktar ve çeşitliliği, kullanım sıklığı ve süresinin yol açtığı sorunlarla ilişkisi, bu sorunların halk sağlığını tehdit eden boyutları, yaptığı bağımlılık türü ve tedavi alternatifleri, önlenebilir sık ölüm nedenlerinin arasında yer alması, kullanıcı dışındakileri de tehdit eden toksik etkileri gibi birçok bakımdan hakkında çok sayıda ayrıntılı incelemeler yapılmış, yorumlarda bulunulmuştur (12,13). Bununla birlikte sadece içiciler sigara dumanı nedeniyle hastalanıp ölmemektedir, sigara içmeyenler de çevresel sigara dumanı ile kirlenen havayı soluyarak hastalık ve ölüm riski altında kalmaktadırlar.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre her yıl 4 milyon kişi sigaraya bağlı bir hastalıktan dolayı vaktinden erken ölmektedir ve 2030 yılına ulaşıldığında bu sayının yılda 10 milyona çıkması beklenmektedir. İki bin yirmili yıllarda dünyada sigaraya bağlı olan ölümlerin % 70’inin gelişmekte olan ülkelerde olacağı hesaplanmaktadır (14). Sigara tüketimi, dünyada her 8 saniyede bir kişinin ölümüne neden olmaktadır.

Pasif sigara içimi; kişilerin sigara içilen bir ortamda istemsiz olarak tütünün yanma ürünlerini soluyarak maruz kalması olarak tanımlanmaktadır (15). Pasif sigara içimi; çevresel sigara dumanı (ÇSD) maruziyeti, ikinci el sigara içimi ya da edilgen sigara içimi olarak da adlandırılır (16,17).

Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) erişkinlerin % 26,5’i sigara içerken, 2 ay-11 yaş grubu çocukların % 43’ünün evinde en az bir aktif sigara içicisinin bulunduğu bildirilmektedir. Gelişmiş ülkelerde sigara içimi azalmakta iken, gelişmekte olan ülkelerde ise artmaktadır (17).

Türkiye’de 2008 Aralık ayında yapılan Küresel Yetişkin Sigara Araştırmasına göre, toplumda 15 yaş ve üstü olanların % 31’i sigara içmektedir (% 48 erkek, % 15’i kadın). Sigara kullanımını 25 - 44 yaş arası insanlar arasında daha yaygındır; bu yaş grubunun % 40’ı sigara içtiklerini belirtmişlerdir (18). Sağlık Bakanlığı Madde Bağımlılığı Şube Müdürlüğü tarafından yapılan "Türkiye Küresel Gençlik Tütün Araştırması-2003" çalışmasına göre, pasif

içicilik yönünden çarpıcı sonuçlarla karşılaşmıştır. Buna göre öğrencilerin % 91,1'i halka açık yerlerde sigara dumanına maruz kalmıştır, % 68,8'i babasının, % 39,7'si ise annesinin evde sigara içtiğini ifade etmiştir (19). Avrupa Tütün Kontrolü Raporu 2007'ye göre ise Türkiye'deki 13-15 yaş grubunun sigara dumanından pasif etkilenim prevalansı evde % 81,6, ev dışında ise % 85,9'dur (20).

Türkiye'nin de bulunduğu çok sayıda ülkede sigara dumanına maruziyeti önlemek ve sigara tüketimini azaltmak amacıyla bir takım yasal düzenlemelere gidilmiştir. Örneğin, ülkemizde 4207 Sayılı Kanun gereğince, "kapalı mekânlarda tütün ve tütün mamullerinin içilmesi yasaklanmış olup, 5326 sayılı Kabahatler Kanunu'nun 39. maddesinde ise kamu hizmet binalarının kapalı alanlarında tütün mamulü tüketen kişiye idari para cezası verilmesi" hükmüne bağlanmıştır (21). Gün geçtikçe bu konudaki sınırlamaların boyutu da giderek artmaktadır. Söz konusu diğer düzenlemeler ile birlikte, 4207 Sayılı Kanunun kapsamı daha da genişletilerek, "Okul, dersane ve kursların açık alanları ile lokanta, kahvehane, kafeterya ve birahane gibi yerlerde sigara içimini yasaklayan "5727 Sayılı Tütün ve Tütün Mamullerinin Zararlarının Önlenmesine Dair Kanunda Değişiklik Yapılması Hakkında Kanun" Resmi Gazete'nin 19 Ocak 2008 sayısında yayınlanmıştır ve yayın tarihinden itibaren 4 ay sonra yürürlüğe girmiş; lokanta, kahvehane, kafeterya gibi yerlerdeki sigara yasağının uygulanması başlamıştır (22).

2.2. Pasif Sigara Dumanının Tanımlanması ve Bileşenleri

Pasif sigara içiciliği çevresel tütün dumanı yoluyla gelen birçok zararlı etken nedeniyle çocukların sağlığını etkilemektedir. Sigara dumanının 4000'den fazla bilinen ve bilinmeyen birçok ögesi vardır ve bunlar eksojen olarak yüksek miktarda serbest radikal oluşumuna neden olurlar (7). Sigara dumanının bileşimi, sigaranın hammaddesi olan tütünün bileşimiyle aynı değildir. Bu, tütünün yanması sırasında içerdiği kimyasalların kısmen ya da tamamıyla başka bileşiklere dönüşmesi ile ilişkilidir. Sigara dumanının bileşimi, tütünün türüne, tütünün üretim aşamasında geçirildiği işlemlere, sigaranın filtreli olup olmamasına, sarıldığı kağıdın hammadde özelliklerine, kağıt ve tütünün nem derecesine, sarılma tekniğine, nefes çekme sıklığına, derinliğine, yanma hızı ve sıcaklığına ve benzeri çok sayıda faktöre bağlı olarak değişir. Nikotin; karbonmonoksit; katran fazındaki karsinogenik maddeler ve bu fazdaki iritanlar olmak üzere 4 önemli bileşeni sigara dumanının toksisitesinde ön plandadır (23,24).

Nikotin, *Nicotiana tabacum* bitkisinin tütün olarak bilinen kurutulmuş ve özel işlemlere tabi tutulan yapraklarındaki bir çeşit alkaloiddir. İlk kez Amerika kıtasında yetiştirilmekle birlikte, tütün 16. yüzyılda Avrupa kıtasına ve daha sonra dünya üzerindeki diğer coğrafyalara yayılmıştır. Sigara için kullanılan tütün % 0,5- 3 oranında nikotin ihtiva eder. Kimyasal yapısı; N- metil piroolidin halkası ve piridin halkasından oluşur (25,26).

Sigara içildiğinde iki farklı tip duman üretilmektedir. Bunlardan biri sigara içen kişi tarafından aktif olarak içine çekilen ve yanan sigaranın ağızlığında da bulunan “ana akım” ve diğeri ise yanma bölgesinden çevreye sigaradan pasif olarak yayılan “yan akım”dır (27). İşlem görme açısından ana akımda, biri duman - gaz fazı, diğeri de tanecikli madde (katran) olmak üzere iki kısım mevcuttur (28).

Yan akım dumanı (YAD) oluşurken yanma ısısı daha düşük olduğu için YAD'nda ana akım dumanına (AAD) göre çok daha fazla kimyasal madde mevcuttur, örneğin hayvanlar için karsinojenik olduğu gösterilmiş olan nitrosodimetilamin'in yan akım dumanında ana akım dumanına göre 20-100 kat daha fazla bulunmaktadır (29). Yapılan çalışmalar her bir sigara içim türünde etkilenilen dumanda YAD'nın AAD'na göre daha tehlikeli olduğunu göstermektedir. AAD ve YAD'da nikotin bileşikleri de farklıdır. AAD'nda nikotin partikül fazındayken, çevresel sigara dumanında ise sıvı faza geçmiştir. Diğer bir önemli fark ise ÇSD'nda partiküllerin boyutunun (0,01-1,0 µm) ana akım dumanına (0,1-1,0 µm) göre daha küçük olmasıdır (30).

Sigara dumanında nikotin, nem ve karbonmonoksit çıktıktan sonra geri kalan maddelerin tümünün belirgin karsinojenik etkileri vardır. Dumanın katran fazı olarak adlandırılırlar ve içeriğinde aromatik nitrozaminler, aromatik aminler, polisiklik hidrokarbonlar gibi çok sayıda bileşim bulunur. Bu tür maddelerin içerisinde kanserojenik etkisinin belirgin olduğu iyi bilineni, sigara üretimi aşamasında ve içilmesi sırasında yanma sonucu oluştuğu düşünülen ve tütüne spesifik N-nitrozaminler olarak adlandırılan N-nitrozonornikotin ve metilnitrozamin piridil butanon gibi bileşimlerdir. Bunların dışında da kanserojenik etkileri çok iyi bilinen ve sigara dumanında bulunan başka maddelere örnek olarak radyoaktif polonyum (Po^{210}), siyanur, akrolein, fenol bileşikleri gibi daha bir çok maddeyi saymak mümkündür (26, 27, 32).

Sigara dumanındaki kanserle ilişkili maddelerden diğeri şunlardır: Arsenik, Benzen, Krom, Nikel, Vinilklorur, 4-aminobifenil, Benzo(a)piren, Kadmiyum, Formaldehit, N-Nitrozodietilamin, Asetaldehidibenzopiren, Parakrezol, N-Nitrozometiletamin, N-

Nitrozonornikotin, N-Nitrozopiperidin, N-nitrozopirrolidin, Orto-toluidindir. Sigara dumanının kanserojen dışındaki diğer hasarlayıcı etkilerine yol açan maddelerden bazıları: Nikotin, Karbonmonoksit, Azotoksitler, Amonyak, Hidrojensiyanyur ve Akroleindir (33).

2.3. Pasif Sigara İçiciliği ve Çocuklarda Oluşturduğu Riskler

Sigara içimi yalnız içene değil, aynı ortamda bulunan diğer insanlara da zarar vermesi ve bu durumdan en çok çocukların etkilenmesi bakımından önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir. Kendisi sigara içmediği halde işyerinde, insanların toplu olarak buldukları kapalı yerlerde ve evde sigara içen kişilerin dumanına maruz kalarak bu dumanda bulunan tüm zararlı maddelerin solunması “pasif içicilik” olarak tanımlanabilir. Bu tanımlamanın diğer bir şekli de çevresel sigara dumanı (environmental tobacco smoke- ETS) olarak bilinir. Sigara içenin nefesini vermesiyle dışarıya saldığı dumana ve içine çekmeler arası kül tablasında yanık halde duran sigaranın kapalı mekana tüterek saldığı dumana “ikinci el duman” denir. Pasif içicilik, filtreli ya da filtresiz düşük katranlı ya da düşük nikotinli sigara dumanına maruz kalma, dumanın oranı, kapalı yerin boyutu, solunan miktar, maruz kalma süresi gibi çok değişik faktörlerden etkilenmektedir. Pasif içicilik, aktif sigara içene göre daha az şiddette olmakla beraber, benzer kronik sağlık sorunlarına yol açabilir (12, 25, 33, 34, 35).

Dünyadaki tüm çocukların yaklaşık % 40’ına tekabül eden tahminen 700 milyon çocuk evde sigara dumanına maruz kalmaktadır (36). Pasif sigara dumanının dünyada yılda 600000 erken ölüme neden olduğu tahmin edilmektedir; bu rakam dünyada her yıl doğum esnasında ölen kadın sayısına yaklaşık olarak yakın bir sayıdır (37). ABD’nde her yıl tüm sigarayla ilgili ölümlerin yaklaşık % 11’i olanı (yaklaşık 50 bin ölüm) pasif sigara dumanına atfedilmektedir (38). Avrupa Birliğinde (AB) işyerinde sigara dumanına maruziyetin yılda 7600 ölüme neden olduğu tahmin edilmekte olup evdeki maruziyetin de ilave 72100 ölüme neden olduğu bildirilmektedir (39).

ABD Sağlık Bakanlığı’na bağlı çalışan Ulusal Toksikoloji Programı Kurumu 2002 yılında yayımlanmış olduğu 10. Ulusal Raporunda “ikinci el dumanın bile kanserojen olduğunu” bildirmiştir (40).

Çocukların, anne ve babalarının içtikleri sigaranın dumanına maruz kalışı, bazen çocuk daha anne karnında iken başlayabilmektedir. 20 haftalık doğum haftasından önce fetal kayıp olarak tanımlanan spontan abortus rölatif riski hamilelik esnasında sigara içenlerde 1/3

oranında artmıştır (41). Annenin sigara içmesi ile birlikte olan riskler preterm doğum, intrauterin gelişme geriliği (İUGG), düşük doğum ağırlığı, perinatal ve neonatal mortalite, ani bebek ölüm sendromu (ABÖS) ve muhtemelen konjenital malformasyonlardır (42).

Sigara içen kadınlarda içmeyenlere göre preterm doğum rölatif riski 1,2-1,6 arası değişmektedir. Hamilelik esnasında sigara içen kadınlardan doğan bebekler belirgin olarak içmeyenlerden doğanlardan 200-250 gram az ağırlıkla doğarlar (43). Annenin doğumdan sonra sigara içmesi durumunda ABÖS riski 2,3 kat, hem anne hemde babanın sigara içmesi durumunda 3,5 kat arttığı tespit edilmiştir. Bebeğin sigara içen annenin yanında yatması durumunda ABÖS riski bir miktar daha artmaktadır (30).

Çocukluk çağında sigara dumanına maruz kalma astım, otitis media, üst solunum yolu enfeksiyonu, azalmış pulmoner fonksiyonlar, nörogelişimsel değişiklikler, davranış problemleri ve okul başarısında azalma riski ile birlikte (44, 45). Çevresel sigara içimine maruz kaldığı için yılda 300000-1500000 civarında çocuğun alt solunum yolları enfeksiyonu geçirdiği ve 200000-1000000 çocukta da astım ataklarının sıklığının ve şiddetinin arttığı bildirilmiştir (46).

Sigara dumanına maruz kalma ve astım, 0-5 yaşları arasında 4331 çocuğun değerlendirildiği bir çalışmada incelenmiş, anneleri günde en az yarım paket sigara içen çocuklarda toplam 2,1 kat daha fazla astım görülme riskinin olduğu; ilk yaşta ise bu riskin 2,6 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. Sigara ve atopi ilişkisi de gösterilmiştir; anneleri sigara içen çocuklarda cilt testlerinde alerjik durum daha sık saptanmış; ebeveynleri sigara içen erkek çocukların kan IgE ve eozinofil düzeyleri daha yüksek bulunmuştur (47). ABD'nde bebeklerde oluşan pnömoninin % 50'sinin nedeninin pasif sigara dumanından etkilenme sonucunda oluştuğu saptanmıştır (48).

Anne-babanın sigara içmesi çocukta otitis media riskini artırmaktadır. Pasif içici altı aylık bebekler yılda ortalama 7,1 seröz otitis media atağı geçirirken, yanında sigara içilmeyen bebeklerin 5,8 atak geçirdiği görülmüştür. Pasif içicilerde seröz otitis media 28 günde iyileşirken, sigara dumanına maruz kalmayanlarda 19 günde iyileşmektedir (49). Pasif içicilik allerjik rinit belirtilerini artırmakta, allerjik riniti olmayan çocuklarda da burun tıkanıklığına yol açarak uyku kalitesini bozmaktadır.

Sigara dumanına maruziyet ile akciğer fonksiyonlarının azalması arasında ilişki bulunmuştur. 21 çalışmayı içeren bir meta analizde FEV1'de (1. saniyedeki zorlu vital

kapasite) % 1,4'lük, orta ekspiratuar akım hızında % 5'lik ve son ekspiratuar akım hızında % 4,3'lük azalma olduğu görülmüştür (50).

Pasif içici çocuklarda hastaneye yatmayı gerektiren ciddi enfeksiyonların sık olduğu da gösterilmiştir. Bir çalışmada 3 - 59 ay yaş grubu çocuklarda bu enfeksiyonların dört kat daha fazla görüldüğü gösterilmiştir (51). İngiltere'de her yıl 17000 çocuğun sigara dumanına maruziyet nedeniyle hastanelere yatırıldığı bildirilmektedir (52).

Doğum öncesi sigaraya maruz kalan bebeklerde hiperaktivite, dikkat eksikliği, heceleme, okuma ve matematik problemlerinin öğrenilmesinde zorlukları gibi entelektüel gelişimlerinde yetersizlikler görülür (53). Çocukların okul performansı ve zekâ skor testleri sigara dumanı maruziyetine bağlı olarak azalmaktadır. Bazı çalışmalarda sigara içenlerden doğan çocukların diğerlerine göre düşük zekâ skorlarına sahip oldukları tespit edilmiştir (54,55).

2.4. Sigara Dumanı Maruziyetinin Ölçümü

Yetişkinlerde yapılan çeşitli çalışmalarda da sigara maruziyeti değerlendirilirken, sadece kişisel bildirimlerin kullanılmasının gerçek verileri elde etmede yeterli olamayacağı, kişisel bildirimlerle birlikte serum veya idrar kotinin değerlerinin de belirlenmesinin gerektiği vurgulanmıştır (56,57). Aktif veya pasif sigara içiciliğini değerlendirmek için en sık kullanılan yöntem, bir nikotin metaboliti olan kotinin düzeyinin, serum, idrar veya tükürükte belirlenmesidir (9).

Sigara maruziyetinin ölçüm aracı kolay ölçülebilir olmalı ve maruziyetin derecesi, süresi ve sıklığını temsil etmelidir. İyi bir ölçüm aracı kaynağın gücü ile değişebilmeli ve makul bir mal oluşla kolay ve doğru bir şekilde ölçülmelidir. Sigara dumanına özel olmalı ve düşük konsantrasyonlarda bile hava veya biyolojik numunelerde tespit edilebilmelidir (58).

Sigara dumanına maruziyet 3 şekilde ölçülebilir:

- 1- Kişilerin maruz kaldığı havadaki sigara dumanı bileşenlerinin ölçülmesi (çevresel ölçüm)
- 2- Anket veya görüşmelerde maruz kalmanın kişi tarafından bildirilmesi yoluyla
- 3- Maruz kalmış bireylerin vücudunda sigara dumanı bileşenlerinin (biyomarkerların) konsantrasyonunun ölçümleri.

Çevresel ölçümler nikotin, partiküller ve bazı gazları içermektedir. Bunlar hava örnekleme monitörleri ile veya kişisel örneklemlerle elde edilebilirler. Bu metod suboptimaldır, zira monitörler sadece kısa periyotlarda kullanılabilir ve maruziyeti tam yansıtmayabilir. Buna ilaveten çevresel ölçüm vücuda ulaşan sigara dumanı dozunu yansıtmayabilir, sigara dumanından başka bileşiklerin kaynakları karışabilir ve zaman kaybına yol açar (59).

Sigara içiyor olmanın ve sigara dumanına maruziyetin kişisel bildirim ile değerlendirilmesi ya yazılı (kişinin doldurduğu anket) veya sözlü iletişim ile (kişisel görüşme) yapılmaktadır. Sigara kullanımı ve maruziyetinin değerlendirilmesinde en sık kullanılan araç anketlerdir. Bunlar birçok nedenden dolayı uygundur; maruz kalma bilgileri retrospektif olarak toplanabilir ki bu durum havayı kirleten konsantrasyonlar veya biyomarkerlarla ilgili elde ölçüm olmadığında değerlidir, uzun dönemli maruz kalma ile ilgili bilgiler verebilir, fazla sayıda kişiye uygulanması pahalı değildir ve bu nedenle geniş çaplı çalışmalar için uygundur. Bunlar birçok sigara çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılmışlardır (42).

Biyokimyasal ölçümlerle kişisel bildirim doğrulandığı çalışmaların yapılan meta analizinde erişkinlerin sigara içip içmemenin kişisel bildirimlerinin çalışmaların çoğunda genel olarak doğru olduğu sonucuna varılmıştır (60). Bununla birlikte yazarlar hamile kadınlarda yapılan çalışmalarını hariç tutmuşlardır, çünkü hamile kadınların sigara içme durumları sosyal sebeplerle kabul edilebilir bulunmadığından kişisel bildirim tam doğru sonuçlar vermeyebilir (61). Kişisel bildirim doğruluğunu güçlendirecek diğer faktörler görüşmecinin uyguladığı anketleme, gözlemsel çalışmalar, yetişkinler tarafından yapılacak bildirimler ve kotinin ile biyokimyasal doğrulamadır.

Bu avantajlarına rağmen anket bilgilerine dayanılarak yapılan kişisel bildirimlerin doğrulukları ile ilgili bazı kaygılarda vardır. Bunların en ciddi olanları; doğrulama standartlarının yokluğu, standartize edilmiş anket yokluğu ve maruziyetin yanlış sınıflandırılmış olmasıdır. Anketle toplanan bilgilerde en sık yapılan hatalar; kişinin maruziyeti doğru bir şekilde hatırlayamaması, bilgi eksikliği, kasıtlı olarak yanlış bilgi verme, peşin hükümlü olma ve hafıza yetersizliği olabilir (56). Sosyal cazibenin fazla olduğu durumlarda peşin hükümlülük çok yaygın olabilir (60).

Bebek ve çocuklarda sigara dumanına maruziyetin taşıdığı risklerin belirlenmesi hemen hemen daima anne-babanın kişisel bildirimlerine dayanmaktadır (62). Annelerin veya bakıcıların bebeklerin ya da çocukların sigara tüketimine maruz kaldıklarını inkar etme veya olduğundan düşük gösterme motivasyonları çok güçlü olabilir (63). Ebeveynler tarafından sigara dumanı maruziyetinin gerçek olandan az gösterilmesinin kullanılan dökümana ve çalışılan nüfusa bağlı olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmaların çoğunda idrar kotinini ile çocuğun sigara dumanına maruziyetinin ebeveynlerce bildirimleri arasında uyum iyi bulunamamıştır. Anket verileri ile sigara dumanı maruziyetinin prevalansı muhtemelen düşük tahmin edildiğinden sigara dumanına maruziyetin objektif değerlendirilmesi gereklidir. Bunlara ilaveten anne-babaya dayalı anketlerin çoğu maruz kalmayan ve hafif derecede maruz kalan çocukları doğru bir şekilde ayıramamaktadır. Özellikle pediatrik nüfus ve hamile kadınlar için aktif ve pasif sigaraya maruziyetin daha doğru bir şekilde değerlendirilmesi ön plana çıkmaktadır (64).

Risklerini tanımlamak ve sigaraya karşı müdahalelerin yararlarını saymak için pasif sigara içiminin kesin biyokimyasal ölçümlerine gerek vardır (27). İdeal olarak sigara dumanı maruziyetinin biyomarkerı sigara yanmasına spesifik olmalı ve vücutta yarı ömrü uzun olmalıdır. Biyomarkerın diğer özellikleri de şunlar olmalıdır; önceki maruziyetle ilişkili olmalıdır, sağlık etkileri olan bir ajan olmalı veya böyle bir ajanla kuvvetle birlikte olmalıdır, eser miktarlarda bile yüksek doğrulukla tespit edilmelidir, doz bağımlı olmalıdır, noninvazif metodlarla ölçülmelidir ve test pahalı olmamalıdır (58).

Sigara dumanı maruziyetinin biyomarkerları herhangi bir vücut sıvısı veya dokusundan sigara dumanının içerdiği metaboliti ölçen herhangi bir test ile belirlenebilir (65). Sigara dumanı maruziyetini ölçen birkaç muhtemel biyomarker öne sürülmüş olup, bunların arasında karboksihemoglobin, tiyosiyanat, karbonmonoksit (CO), DNA katım ürünlerini ve kotinini sayabiliriz (66).

Vücut sıvılarında tiyosiyanat ve karboksihemoglobin konsantrasyonları sigara dumanına maruz kalmanın ayrılmasında yeterince spesifik veya sensitif değildir (67). Jarvis ve çalışma arkadaşlarınca yapılan bir çalışmada tiyosiyanat ölçümü ile sigara içenlerle içmeyenler arasında ayırım çok zayıf derecede yapılabilmiş olup en sensitif ve spesifik test ise tüm vücut sıvılarında ölçülebilen kotininle yapılmıştır (68). Ekshale CO maruziyetin kullanılabilir başka bir biyomarkerıdır çünkü metabolik aktivasyona maruz kalmaz. Kişisel

sigara içme bildirimini ile CO ölçümü ve sigara içme ile idrar kotinin arasında yüksek korelasyonlar olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte nikotin maruziyetinin markeri olarak CO'in bazı dezavantajları da vardır. Çevrede sigaraya bağlı olmayan CO kaynakları da vardır, karbonmonooksitin yarı ömrü 4-5 saat gibi kısadır ki bu durum yakın tarihli maruziyetin biyomarkeri olduğu anlamı taşır, yanlış negatif sınıflandırma şansını artırır, düzensiz sigara içilme kalıplarını tespit etmede hassasiyeti düşük olur, arada sigara içenlerle hiç içmeyenlerin ayrılmasında bu markerin yeteneği azalmış olur (69). Diğer biyomarkerlarda da mevcut olan çeşitli problemler nedeniyle nikotin ve bunun metaboliti olan kotinin sigara dumanı maruziyetinin incelenmesinde geniş oranda kullanılan biyomarkeri olarak öne çıkmıştır.

Nikotin sigara dumanının primer bileşeni olup, potansiyel toksindir. Sigaranın majör bileşenidir ve sigara dumanına yüksek oranda spesifiktir (68). Kandaki yarı ömrü yaklaşık 2 - 3 saattir ve idrarla itrah edilir (9). Tek bir sigaranın yaklaşık 1 mg nikotin sağlayabildiği tahmin edilmektedir. Vücuttaki nikotin düzeyi inhalasyon kalıpları ve nikotin metabolizmasındaki bireyler arası farklılıklardan etkilenmektedir (70). İn hale edilen nikotinin yaklaşık % 5 - 10'u idrarla değişmeden atılır; kalanı ise karaciğerde metabolize edilir. Nikotin metabolizmasının ana şekli kotinine C - oksidasyondur. Nikotinin yaklaşık % 80'i bu yolla kotinine dönüşür. Nikotinin sigara dumanı maruziyet biyomarkeri olarak kullanımı sınırlıdır. Test pahalıdır ve vücut sıvılarında var olan miktarın düşük konsantrasyonlarda olması nedeniyle çok sensitif olmak zorundadır. Yarı ömrünün kısa olması uzun dönemli maruziyetin biyomarkeri olarak kullanılmasını yetersiz kılmaktadır (9). Nikotin alımı, metabolizma ve atılımındaki farklılıklar nedeniyle kişiler arası önemli derecede değişiklikler vardır. Nikotin plazma, tükürük ve idrarda ölçülmüş olup bunların seçimi planlanan çalışmanın özelliklerine bağlıdır.

Kotinin nikotinin esas metaboliti olup hem içme durumunun hem de sigara dumanına maruziyetinin değerlendirilmesinde seçilecek biyomarkerdir. Çeşitli biyolojik sıvılardaki kotinin değerleri son derece uyumlu olduğundan kan kotininin miktarı tükürük ve idrardaki kotinin ölçülerek de doğru bir şekilde tahmin edilebilir (9). Kotinin; genellikle kan, tükürük, idrar, saç ve semende ölçülür (71). Kotininin kanda yarılanma ömrü yaklaşık 19 - 40 saattir ve bu nedenle birkaç gün önceki (2 - 3 gün) sigara dumanı maruziyetini gösterebilir. Kotininin yarı ömrü bebek ve çocuklarda tipik olarak uzundur. ABD Çevre Koruma Ajansı 18 aydan

küçüklerde kotininin yarı ömrün 60 saate kadar, 18 aydan büyüklerde ise kotininin yarı ömrünün 40 saate kadar uzadığını bildirmiştir (72).

İdrar pH'nın kotinin itrahi üzerindeki etkisi çok az olduğundan kotinin ölçümleri nikotin ölçümlerinden daha üstündür (73). Kendileri sigara içmeyen, sadece sigara dumanına maruz kalanlarda bile kotinin seviyeleri tespit edilecek kadar yüksek olabilir. ABD Çevre Sağlığı Tehlike Değerlendirme Ofisi aktif sigara içenlerle içmeyenler arasında kotinin konsantrasyonlarında en azından bir büyüklük farkı olması gerektiğini bildirmektedir. Bu ofisin yaptığı çalışmada sigara içmeyen ve maruziyeti olmayanlarda plazma kotinin seviyeleri 0,31 ng/ml iken maruz kalan sigara içmeyenlerde ise bu değer ortalama 1,99 ng/ml olarak bulunmuştur (74).

Kotinin ölçümleri için tükürük ve idrar örnek toplaması kişilere acı verici olmadıklarından yaygın kullanılır. Tükürüğün içeriğini etkileyen birçok faktör olduğundan sigara dumanı maruziyetini net temsil edecek standart örnek toplamak zordur. Ayrıca diyet, sigara içme süreci gibi faktörler tükürük kotinin seviyelerini etkileyebilir (75). Tükürük kotininin plazma kotinine korelasyonu yüksektir; tükürük ve serum kotinin değerlerinin hemen hemen eşit olduğunu destekleyen çalışmalar vardır. Kotininin böbrekte yoğunlaşmasına bağlı olarak idrar kotinin konsantrasyonunun plazma ve tükürük konsantrasyonundan 5-6 kat daha yüksek seviyelerine çıktığına inanılmaktadır (76).

Kan, tükürük ve idrarda kotinin referans aralıkları çevresel sigara dumanı maruziyetini 3 kategoride incelenmektedir; aktif içiciler, pasif içiciler ve maruziyeti olmayanlar. ABD Çevre Koruma Ajansı ve Bramer - Kallungal'e göre bu kategorilerdeki kotinin referans değerleri maruz kalmayanlarda kanda 0,09-0,7 ng/ml, tükürükte 0-5 ng/ml, idrarda <10 ng/ml; pasif içicilerde ise kanda 2-10 ng/ml, tükürükte 5-10 ng/ml, idrarda 10-100 ng/ml; aktif içicilerde ise kanda >10 ng/ml, tükürükte >10 ng/ml ve idrarda >200 ng/ml'dir (76,77).

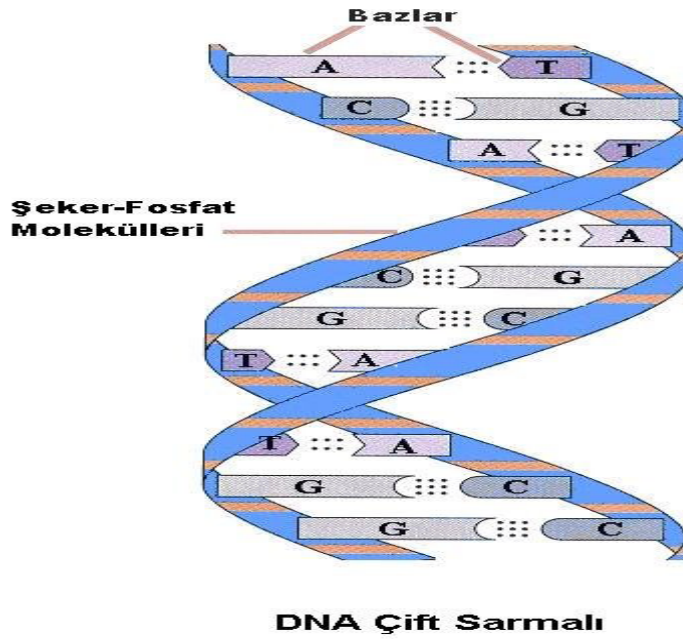
Birçok araştırmacı, nikotin ve kotinin konsantrasyonlarını elde etmede, plazma ve tükürüğe göre daha kolay olduğundan, idrar örneklerini kullanmayı tercih etmektedir (71). İdrardaki kotinin, tamamen sigaraya özel ve yalnızca iç metabolizma ürünü olduğundan, örneklerin toplanması sırasında dış ortam şartları ile kotinin düzeylerinde değişim olma olasılığı da düşüktür (78).

Biyolojik sıvılarda kotinin ölçümü için birçok yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan en sık kullanılanları; kolorimetri, kromotografi, kemilüminesan, radyoimmünoassay ve enzime bağlı immünosorbant belirlenmesi (ELISA). Kolorimetri spesifik olmaması nedeniyle en az istenen

metottur. Bu tekniklerden çeşitli vücut sıvılarından kotinin analizinde referans standart yöntem içiciler için gaz kromotografi-mass spektrometrisi; pasif içiciler içinse gaz likit kromotografisidir (79). Kemilüminesan yöntem’de yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip bir yöntemdir; sigara dumanı maruziyetini ölçmek için elverişli bir yöntemdir (80).

2.5. DNA Yapı ve Fonksiyonu

Kimyasal olarak DNA, nükleotid olarak adlandırılan basit birimlerden oluşan iki uzun polimerden oluşur (81). Bu polimerlerin omurgaları, ester bağları ile birbirine bağlanmış şeker ve fosfat gruplarından oluşur. Merdiven basamaklarının arasında gevşek hidrojen bağlarıyla birbirini çeken pürin ve pirimidin denilen azotlu bazlar bulunur. Bu basamaklar merdivenin kenarındaki şeker moleküllerine bağlıdır. Her bir şeker grubuna baz olarak adlandırılan dört tip molekülden biri bağlıdır (Şekil 1).



Şekil 1. DNA'nın çift sarmallı yapısı

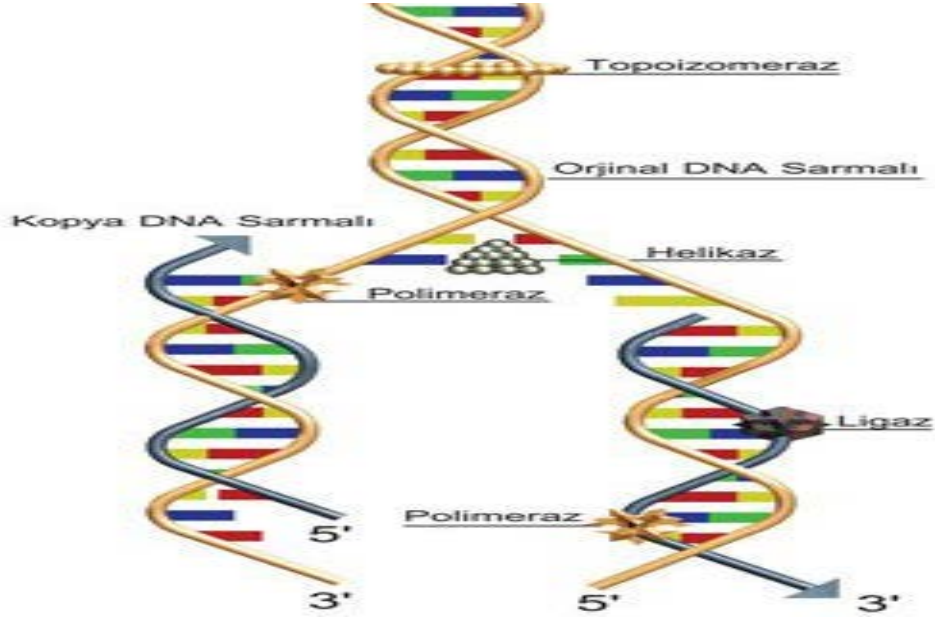
Bu birimlere, timin (T), adenin (A), sitozin (C) ve guanin (G) denir. Bunlar DNA molekülünün bir iplikçliğini oluşturur. İki iplikçik, yani merdivene benzer yapının iki kolu, karşılıklı gelen baz çiftleriyle birbirine bağlanır. Bu iki iplikçik birbirlerine ters yönde

giderler. Her baz çifti tek bir şekilde eşleşebilir: Her zaman T ile A ve G ile C birleşir. Sarmaşık dalına benzer her molekül, bir DNA "ipliği"dir. Bu iplikler birbirlerine kimyasal olarak bağlanmış nükleotidlerden oluşur. Nükleotidler ise bir şeker, bir fosfat ve bir de dört çeşit azotlu bazların birisinden oluşur. İşte bu nükleotidlerin DNA üzerinde sıralanışı, DNA dizilimini belirler (82).

DNA, ökaryotlarda doğrusal kromozomlar, prokaryotlarda ise dairesel kromozomlar içinde bulunur. Kromozomlarda bulunan genler DNA yapısındadır. Her canlı bireyin ve soyunun hayat planı hücre hafızasını meydana getirir. DNA molekülleri şifrelerle kodlanmıştır. DNA'nın yapısına giren bazların (A,T,G,C) her biri şifre sembolü olarak kullanılır. Hayatın dili bu dört harfli alfabeye DNA moleküllerinde yazılmaktadır. DNA'nın ipliklerinde ard arda gelen üç nükleotit bazı bir mana (şifre) ifade eder. Dört farklı nükleotitle arka arkaya 64 şifre kodlanabilir (AAA, AAS, AAG, AGS, vb.). Şifrelerin DNA'daki sıralanışlarının değişmesiyle binlerce mana ifade edilebilir. DNA'nın omurgası boyunca bu bazların oluşturduğu dizi, genetik bilgiyi kodlar. Protein sentezi sırasında bu bilgi, genetik kod aracılığıyla okununca proteinlerin amino asit dizisini belirler. Bu süreç sırasında DNA'daki bilgi, DNA'ya benzer yapıya sahip başka bir nükleik asit olan RNA'ya kopyalanır. Bu işleme transkripsiyon denir.

Protein ve diğer işlevsel RNA molekülleri kodlayan bilgi, gen adı verilen DNA parçalarının dizisinde yer alır. Genlerdeki genetik bilginin aktarılması baz eşleşmesi ile gerçekleşir. Örneğin, transkripsiyon sırasında bir DNA dizisinin ona komplementer bir RNA dizisi olarak kopyalanması, DNA ile doğru RNA nükleotitler arasındaki çekim ile mümkün olur. Protein çevrimi (translasyon) denen süreç sırasında bu RNA dizisine kaşılık gelen bir protein sentezlenirken, RNA nükleotitleri arasında gen ile baz eşleşmesi olur.

DNA hücre bölünmesinin hazırlıkları sırasında kendi kopyasını yapar. Kromozomların ikiye bölünmesi sırasında DNA molekülü kendisinin bir kopyasını yapar, buna replikasyon veya duplikasyon denir. Bu olay yavru kromozomda aynı kısımların bulunabilmesi için gereklidir. DNA'nın kendini eşlemesi esnasında, iki sarmal ipliği bir arada tutan hidrojen bağları adeta bir fermuar gibi açılır (Şekil 2).



Şekil 2. DNA’da replikasyon oluşumu

Açıkta kalan pürin ve pirimidin nükleotitlerin uçları, hücrede önceden sentezlenmiş nükleotitlerle tamamlanır. Böylece birbirinin aynı olan iki DNA meydana gelmiş olur. Hücre bölünmesinde her biri bir hücreye gider. Hücre mekanizması DNA ikili sarmalını birbirinden ayırıp her iki DNA ipliğini de yeni birer ipliği sentezlemek için şablon olarak kullanma yeteneğine sahiptir. Yeni üretilen iplikler öncekilerle hemen hemen tamamen aynıdır, ancak mutasyon adı verilen hatalar oluşabilir. Hücrenin bu özelliğini laboratuvar ortamında taklit eden işleme de polimeraz zincirleme tepkimesi (PCR) adı verilir.

İnsan somatik hücrelerinde tüm genom iki kopya olarak bulunmaktadır. Genomu oluşturan çift sarmal biçimindeki DNA, yaklaşık 3 milyar baz çifti içerir. İnsan genomu DNA’ sı 23 çift (46 tane) kromozoma bölünmüş şekilde bulunur. Bunlardan işlevsel proteinleri kodlayan gen sayısı yaklaşık 50000-100000’dir. Bu genler embriyogenez, büyüme - gelişme, üreme ve çeşitli metabolik işlevleri denetlerler (82, 83).

Genomdaki işlevsel gen sayısı, tüm genomun yaklaşık % 10’u kadardır. Diğerleri ise genomda çok sayıda benzer kopyalar (yineleyen diziler) şeklinde dağılmıştır. Bu diziler binlerce, bazen milyonlarca kopya oluşturabilir. Bunların işlevleri henüz tam olarak

anlaşılammıştır. Bazıları genlerin ekspresyonunda ve kromozomların yapılanması ve işlevlerinde rol oynayabilir.

İnsan hücrelerindeki DNA'nın hemen tümü çekirdekte, az bir kısmı ise mitokondride bulunur. Mitokondriler genelde enerji metabolizması ile ilgili proteinleri kodlayan genlere ek olarak tRNA genleri de içerir. Sperm zigota stoplazmasını vermediğinden mitokondriler ve bunlarla ilgili gen bozuklukları yalnız annelerden kalıtılır. Mitokondriyal genom 16 bin bp uzunluğunda sirküler bir çift sarmal şeklinde olup dizi analizi tamamlanmıştır (83).

DNA' daki homeostatik mekanizma ile bilgi korunmaktadır. Bu mekanizmalardan birisi düzenleme süreci adını alır. Bunda “*DNA polimeraz*” enzimine eşlik eden “*Nükleaz*” ile yeni zincirde oluşabilecek hatalar düzeltilir. Ayrıca DNA' daki bilginin doğruluğunu sağlamak için tamir sentezi mekanizmaları harekete geçirilir. Bu sentezde tek zincirli DNA parçaları çıkartılarak, yerine yeniden sentez edilmiş sağlam DNA zincirleri konulur. Zarar görmüş DNA zincirindeki kırığı farkedenden bir grup özgül enzim tanımlanmıştır. Tamir mekanizması replikasyonun arkasından da işleyebilir. Eğer tamir edilecek bölge her iki DNA zincirinde de yer alıyorsa bu durumda tamir yapılmayabilir. İnsan DNA'sının tamir kusurlarına; Kseroderma pigmentozum, Ataksi telenjipektazi, Bloom sendromu, Fankoni anemisi, Progerya gibi durumlar örnek olarak verilebilir (84).

DNA polimeraz tarafından DNA'nın kopya edilmesi bir dizi madde, ilaç ve antibiyotik tarafından etkilenebilir. Bunlar; aktinomisin-D, daunomisin, adriamisin, bleomisin, etidyum bromid, mitomisin, nitrojen mustard ve diğer alkilleyici ajanlar. Mitoz bölünme sırasında yeni sentezlenen DNA'nın ayrılması vinkristin, kolşisin gibi mitotik inhibitörlerin kontraktıl proteinleri etkilemesi sonucunda engellenir (84).

2.5.1. DNA Hasarı Oluşum Nedenleri

Genetik materyalin moleküler bütünlüğünde ekzojen veya endojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm değişiklikler “DNA hasarı” olarak adlandırılır. Genom, DNA hasarına neden olan sayısız farklı etkene maruz kalır. Ekzojen kaynaklar içerisinde, güneşten gelen ultraviyole radyasyon, radon bileşiklerinin radyoaktif bozunumundan kaynaklanan iyonize radyasyon, mantar kaynaklı aflatoksin, yanmış tütün ve birçok kemoterapötüğü sayabiliriz.

Endojen kaynaklara örnek olarak oksidatif metabolizma, DNA'nın spontan değişimleri, immünolojik çeşitliliği oluşturan V(D)J rekombinasyon mekanizmasını verebiliriz (antijen tanıma bölgelerini kodlayan ekson V, D ve J şeklinde üç segmentten oluşur ve bu segmentlerin birçoğu farklı kombinasyonlarla bir araya gelebilir).

DNA Hasarına Neden Olan Etkenler

1. Spontan veya kalıtsal oluşan gen mutasyonları

2. Çevresel faktörler

- Ultraviyole Işık
- İyonize radyasyon
- Elektromanyetik dalgalar
- Kimyasal ajanlar: Aflotoksin, benzopren, kemoterapi ilaçları, alkilleyici ajanlar, vinil klorid, v.b
- Sigara, alkol kullanımı
- Hava kirliliği
- Kötü beslenme alışkanlığı

3. Doğal hücrel metabolizmadan kaynaklanan faktörler

- Mitokondriden enerji üretim esnasında oluşan Serbest Radikaller
- Enflamasyon
- Detoksifikasyon işlemleri

Hücre tüm bu DNA hasarlarına farklı metabolik yollar ile cevap verir. Ağır DNA hasarları hücrenin apoptozis yolunu aktive ederek hücreyi ölüme götürür. Hücre, DNA hasarlarını "DNA tamir mekanizmaları" ile tamir edebilir. DNA hasarı tamir edilemezse mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa, malignansi ve yaşlanmaya neden olur. DNA tamir sisteminde 100'den fazla gen rol oynar ve bu genlerin kodladığı proteinler tamir mekanizmalarında görev alırlar. Her bir insan hücresinin DNA'sında günde yaklaşık olarak 500.000 adet kodlanmayan veya yanlış kodlamaya neden olabilen hasar meydana gelmektedir. DNA'nın onarım sürecinin tam olarak sağlanamaması, kanser oluşumunda çok önemli bir faktördür. Bilhassa somatik hücrelerdeki mutasyonların kanser oluşumuna zemin hazırlayıcı rollerinin bulunması, genotoksisitenin klinik önemini artırmaktadır (85, 86, 87).

Sigara kullanımı ve neden olduğu hastalıklar arasındaki ilişkide oksidatif stres (OS) rol almaktadır ve lipidler, proteinler ve DNA sigara dumanında da bol miktarda bulunan reaktif oksijen türlerince (ROS) hasara uğratılmaktadır (88). Nitrikdioksit, peroksil radikalleri, hidroksil radikalleri (OH^-), süperoksit anyon (O_2^-), single oksijen, ferril veya perferril iyonları, hidrojen peroksit ve peroksinitrat (OONO^-) gibi reaktif oksijen türleri tarafından DNA'ya yapılan saldırı ve antioksidan mekanizmaların da devre dışı kalması ile sıklıkla oksidatif DNA hasarına neden olmaktadır (89). Bu nedendir ki sigara dumanı kalıcı mutasyonlara da neden olabilecek DNA hasarı riskini artırabilir (90).

2.5.2. DNA Hasarı Tipleri

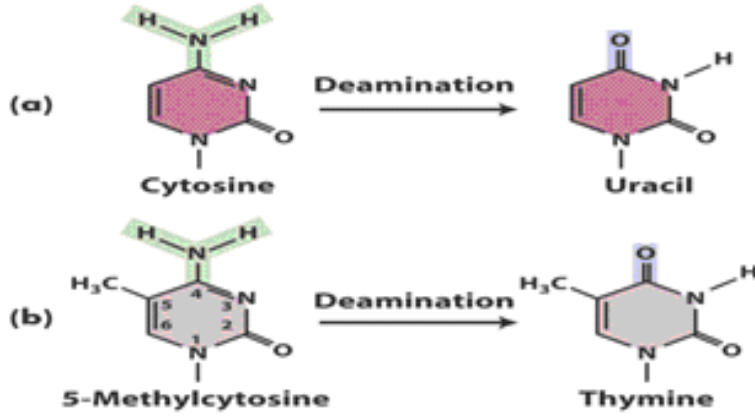
DNA çeşitli farklı mutagenler tarafından hasara uğrayabilir. Bunun sonucunda DNA dizisi değişebilir. Mutagenler arasında, yükseltgen (oksitleyici) etmenler, alkilleyici etmenler ve yüksek enerjili elektromanyetik ışınlar (morötesi ışık ve X ışınları gibi) sayılabilir. DNA'da meydana gelen hasarın tipi mutagenin tipine bağlıdır. Örneğin, mor ötesi ışık timin ikilileri (timin dimerleri) oluşturarak DNA'ya hasar verir (91). Buna karşın, serbest radikaller veya hidrojen peroksit gibi yükseltgen etmenler farklı türden hasar oluşturabilirler; baz değişimi (özellikle guanozin) ve iki iplikçikli kırılmalar gibi (92). Her bir insan hücresinde günde 500 baz yükseltgeyici zarar görür (93, 94). Bu yükseltgeyici hasarlardan en zararlısı çift zincirli kırılmalardır. Çünkü bunların onarımı zordur. Bunlar DNA dizilerinde noktasal mutasyonlara, insersiyonlara ve delesyonlara ayrıca kromozomal translokasyonlara yol açabilir (95).

Başlıca DNA hasar tipleri;

1. Deaminasyon
2. Depurinasyon
3. Alkilasyon
4. T-T and T-C dimerleri oluşumu
5. Replikasyon hataları
6. Çift iplik kırıkları (DSB)
7. Oksidatif hasardır.

2.5.2.1. Deaminasyon

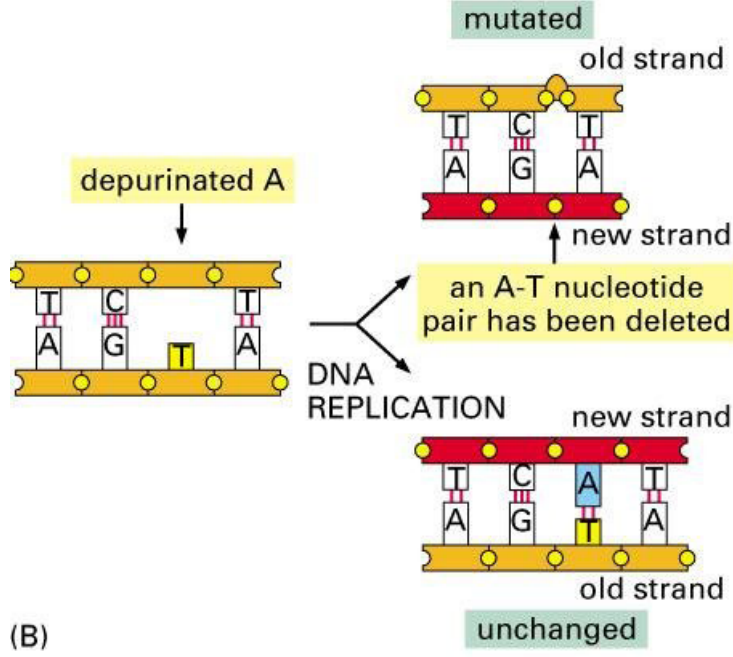
Deaminasyonda, Adenin (A) ve Sitozin (C)'deki bir amino grubu, keto grubuna dönüştürülmektedir. HNO₂ (nitroz asit) deaminasyon yoluyla Sitozin (C) => Urasil (U) ve Adenin (A) => hipoksantine dönüşmesine neden olur. Adenin deaminasyonu ile oluşan hipoksantin sitozinle yanlış eşleşir.



Şekil 3. Deaminasyon oluşumu

2.5.2.2. Depürinasyon

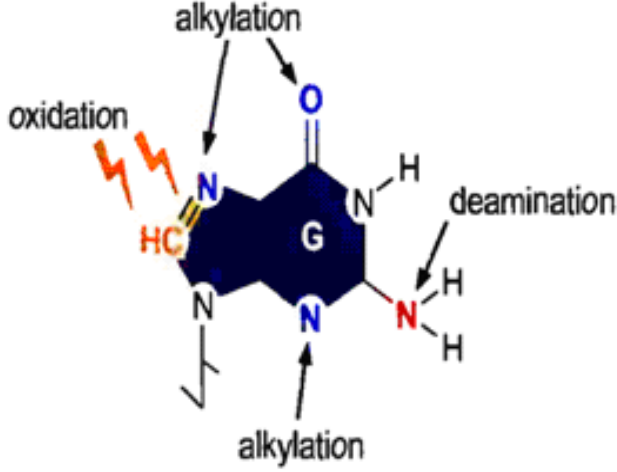
Memeli hücreleri spontan olarak 37 derecede 20 saatlik bir üreme periyodunda yaklaşık 10 000 purin'ini kaybeder. Aflatoksin depürinasyonu indükler (purin bazı kaybı) ancak depürinasyon spontan da olabilir. Depurine dizideki tamir eksikliği delesyonlara neden olabilir. Eğer bu mutasyonlar varsa replikasyon sırasında önemli DNA kayıplarına neden olur. Baz olmayan yerin karşısına baz eklenemez veya buraya bir baz eklenir fakat bu baz, mutant bir baz olur.



Şekil 4. Depürinasyon oluşumu

2.5.2.3. Alkilasyon

Alkilasyon, nükleotidlerdeki amino ve keto gruplarına metil (CH₃ -) ya da etil (CH₃ - CH₂) gibi bir alkil grubu eklenmesi işlemidir. Nitrozaminler, etilmetilsülfonat ve Nmetil-N1 -nitrosoguanidin en önemli alkilleyici ajanlardır. En önemli alkilasyon bölgesi, guaninin 6. karbon atomundaki oksijendir (96). Alkilasyon sonucunda oluşan O6 -etilguanin (ya da O6-metilguanin), adeninin baz analogu gibi davranarak timinle eşleşir. Bunun sonucunda hasarlı DNA replike olduğunda G:C baz çifti yerine A:T baz çifti geçer. Birçok kimyasal mutajen bazlarda modifikasyonlara neden olur. Bu ajanlar genellikle küçük alkilerdir (örneğin metil grupları). Aynı zamanda birçok mutajen polisiklik bileşenlerden oluşur.



Şekil 5. Guanindeki kimyasal hasar bölgeleri (alkilasyon, oksidasyon, radyasyon)

2.5.2.4. T-T ve T-C dimerleri oluşumu

Nükleik asit bazlarının UV ışığı absorblaması sonucu sıklıkla yakın pirimidin bazlarının birer zincirleri arasındaki bağ oluşumu sonucu dimerler oluşur (siklobütan pirimidin dimerleri). DNA hasarı güneş yanığına ve melanin üretiminin artmasına neden olur ve tüm melanomaların %8 inden de sorumludur.

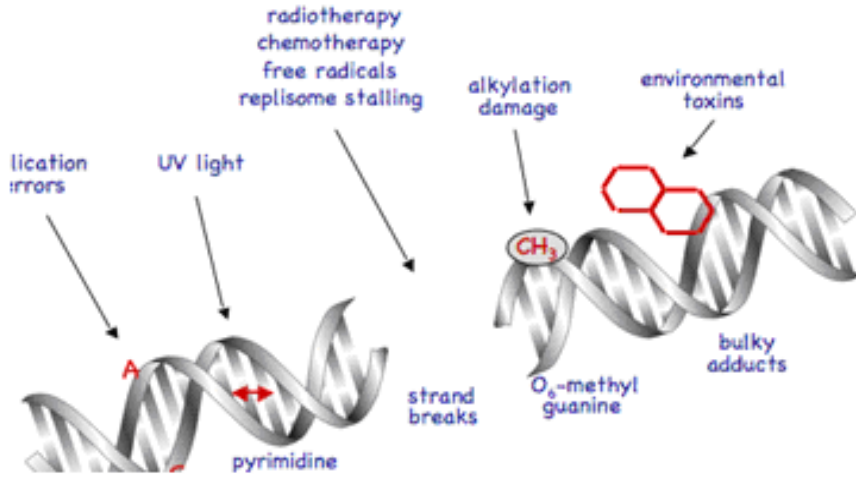
2.5.2.5. Replikasyon Hataları

DNA replikasyonu esnasında yanlış nükleotlerin eklenmesiyle oluşan hatalardır. DNA polimerazın hata yapma (yanlış bazı ekleme) sıklığı spontan mutasyon oluşumunu etkiler. Polimerazın doğruluk oranını etkileyen en önemli faktör, hata okuma (proofreading) 3'-5' ekzonükleaz aktivitesidir. Bu aktivite, polimeraz tarafından yanlış eklenen bazların çıkarılmasına, böylece replikasyon esnasında mutasyon oluşumunu engellemeye yarar.

2.5.2.6. Çift İplik Kırıkları Oluşumu

İyonize radyasyon, transposonlar, topoisomerazlar, endonükleazlar, kromozomlar üzerindeki mekanik stres, tek iplikli bölgede tek iplik kesimi ile (örneğin replikasyon ve transkripsiyon sırasında) oluşurlar. DSB'ler bir hücrenin yaşamı boyunca sürekli olarak

ortaya çıkan en tehlikeli DNA lezyonu türleridir. DSB'ler hem endojen hem de ekzojen unsurlardan kaynaklanabilir ve mutasyon oluşumuna, onkogenik dönüşüme ya da hücre ölümüne yol açabilecekleri için, genom için önemli bir tehlikedirler.



Şekil 6. Çift İplik Kırıkları

2.5.2.7. Oksidatif Stresin Neden Olduğu DNA Hasarı

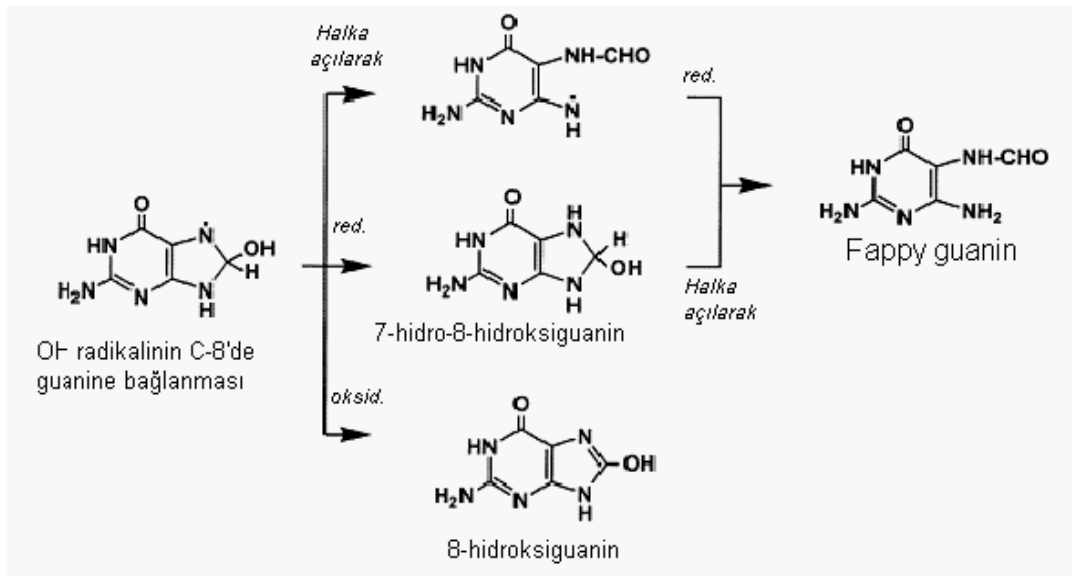
Endojen serbest radikallerin her bir hücrede, günde 200.000 kadar bazı hasara uğrattığı tahmin edilmektedir. Serbest radikaller, DNA atakları, mutasyonlara ve hücre ölümüne yol açmaktadır. Hidroksil radikali bazlarla ve deoksiribozlarla kolayca reaksiyona girer. Hidrojen peroksit ise membranlardan kolayca geçebileceğinden hücre çekirdeğindeki DNA'ya ulaşır ve hücre disfonksiyonuna hatta ölümüne yol açar. Bu nedenle DNA kolay zarar görebilen bir moleküldür (97, 98).

ROS (Reaktif Oksijen Türleri) ve RNS (Reaktif Nitrojen Türleri) ile DNA hasarlarının çok az bir kısmı doğal olarak meydana gelmektedir (99). DNA hasarlarının oluşumunda yer alan endojen reaksiyonlar; Oksidasyon, metilasyon, depürinasyon ve deaminasyon reaksiyonlarıdır. Nitrik oksid veya nitrojen dioksit (NO₂), peroksinitrit (ONOO⁻), dinitrojen trioksit (N₂O₃) ve nitrikasid (HNO₃) gibi reaktif ürünleri, nitrozasyon ve deaminasyon

reaksiyonları ile mutajenik aktivite gösterirler. Farklı ROS türleri farklı yollardan DNA hasarlarına neden olurlar. Örneğin O₂ ve H₂O₂ hiçbir zaman bazlarla reaksiyona girmezken OH radikali DNA'daki dört bazdan herhangi birine bağlanarak farklı reaktif ürünlerin oluşmasına yol açmaktadır. Singlet oksijen ise guanine spesifik bağlanarak hasar oluşturur (97, 98).

Hidroksil radikali pürin bazları ile C4, C5 ve C8 pozisyonlarından reaksiyona girerek sırasıyla C4-OH-, C5-OH-, ve C8-OH- pürin radikallerini oluşturmaktadır (64). C4-OH- ve C5-OH-pürin radikalleri dehidrasyona uğrayarak okside pürin radikallerini oluştururlar. C8-OH-pürin radikallerinin bir elektronlarının oksidasyonu ve bir elektronlarının redüksiyonu ile sırasıyla 8-hidroksipürinler (7,8-dihidroksi-8-oxopürinler) ve formamidopirimidinler oluşur(64). Şekil 7'de 8-hidroksiguanin (7,8 - dihidroksi - 8 - oxoguanin: 8 - OH - Gua) ve 2,6 - diamino - 4 - hidroksi -5 -formamidopirimidin (FapyGua) oluşum mekanizmaları görülmektedir. Her ikisi de hem oksijenli hem de oksijensiz ortamlarda meydana gelebilmektedir.

İndirgeyici ajanlar formamidopirimidinlerin oluşumunu artırırken 8-OH-pirimidinlerin oluşması için oksijenli ortam uygun görülmektedir. 8-OH-guanin çok yaygın olarak meydana gelen bir baz hasar ürünü olduğundan oksidatif DNA hasarlarının ölçülmesinde hasar indeksi olarak kullanılmaktadır. Çoğu zaman 8 hidroksideoksiguanozin (8-OH-dGua) nükleoziti şeklinde ölçülmektedir.



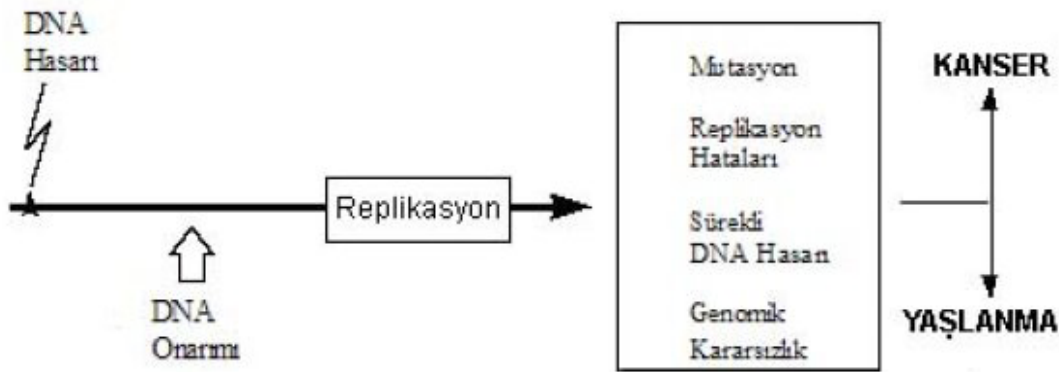
Şekil 7. 8-hidroksiguanin ve FapyGuo'nun oluşum mekanizmaları

2.5.3. DNA Tamir Mekanizmaları

Prokaryotik ve ökaryotik organizmalar DNA'larını korumak için çeşitli DNA tamir mekanizmalarına sahiptir. Memeli hücrelerinde farklı DNA hasarları farklı DNA tamir yolları ile tamir edilmektedir (100).

Canlı organizmalar, genetik materyalin bütünlüğünü korumak için “Nükleotid eksizyon tamiri” (nucleotid excision repair = NER) ve “Baz eksizyon tamiri” (base excision repair = BER) gibi çeşitli DNA tamir mekanizmalarına sahiptirler. Ultraviyole ışığının etkisi ile ortaya çıkan siklobütan pirimidin dimerleri gibi çeşitli DNA hasarları NER mekanizması, oksidatif hasarlar ise BER mekanizması ile tamir edilmektedir. Transkripsiyonel olarak aktif genlerin tamirinden sorumlu transkripsiyona kenetlenmiş tamir mekanizması, NER mekanizmasının bir alt yoludur (100,101).

NER mekanizması en az 20 proteinin görev aldığı bir kesme ve yapıştırma mekanizmasıdır. NER'in ilk basamağı, hasarın tanınması ve hasarlı zincirin 24-32 bazlık kısmının oligonükleotid olarak çıkartılmasıdır. Bu basamağı, DNA zincirinin DNA polimeraz - I ile uzatılarak boşluğun doldurulması ve ligasyon basamağı izler. DNA'da oluşan küçük hasarlar çoğu zaman DNA onarım sistemleri tarafından onarılır. Bu cevaplardan herhangi birinin işlev görmemesi, hücre düzeyinde genomik kararsızlıkla, organizma düzeyinde ise genetik hastalıklar, kanser veya yaşlanma ile sonuçlanır.



Şekil 8. DNA Hasarı sonucu oluşan süreç

DNA tamir sisteminde 100'den fazla gen rol oynar ve bu genlerin kodladığı proteinler tamir mekanizmalarında görev alırlar.

DNA Tamir Mekanizmaları;

1. Direkt Tamir ya da Hasarın Geri Döndürülmesi (Reversal of Damage)

A- Fotoreaktivasyon

B- O6-metilguanin tamiri

C- Basit tek zincir kırıklarının ligasyonu

2. Eksizyon (kesip-çıkarma) Tamiri

A-Baz eksizyon tamiri (BER) (base excision repair)

B- Nükleotid eksizyon tamiri (NER) (nucleotide excision repair)

C- Mismatch (yanlış eşleşme) eksizyon tamiri (MER)

3. Replikasyon sonrası (post-replikasyon) tamiri

4. SOS Tamiri

5. Çift Zincir Kırıklarının Tamiri

A- Serbest Uçların Non-homolog Bağlanması (NHEJ)

B- Homolog Rekombinasyon (HR)

2.5.4. DNA Hasarının Tespiti

Mutajenlerin ve karsinojenlerin saptanmasında geliştirilen hızlı yöntemler arasında Sister Chromatid Exchange (SCE-Kardeş Kromozom Değişimi), Kromozom aberasyonu, Comet Assay, Mikronukleus testi, UMU test, SOS test, Ames testi gibi testler yer almaktadır. İnsan kromozomlarını daha yakından tanıyabilme ve bir birinden kolayca ayırabilme çabaları sürdürülürken araştırmacılar tarafından Comet analiziyle, DNA hasarının bir göstergesi sayılan kuyruktaki DNA yüzdesi ölçümü tekniği, risk artışı ve hasar konusunda doğru tarama olanağına kavuşmuştur (102, 103).

Genotoksisiteye bağlı maruziyetin veya hastalıkların değerlendirilmesinde uygun biyogösterge kullanımı, sonuçların doğru yorumlanması bakımından hayati önemdedir. Biyogöstergeler deneysel ve epidemiyolojik araştırmalar ile saptanabilen biyomoleküler değişiklikler arasında bağ kurmada yardımcı olan biyolojik sistemde oluşan değişikliklerdir. Biyogöstergeler; maruziyet, duyarlılık ve etki biyogöstergeleri olmak üzere 3 farklı kategoriye ayrılır. Karşılaşılan sonuca yol açtığı düşünölen (neden - sonuç ilişkisi) maruziyet etkenlerinin rolünü değerlendiren, maruziyet biyogöstergesidir. Genetik yatkınlık veya diğer etkenlere bağlı maruziyetin doğrudan muhatabı riskli bireyler ile toplumun diğer kesimleri arasındaki farkı ve riskli grubun teşhisini kolaylaştırıcı olan biyogösterge, duyarlılık biyogöstergeleri olarak tanımlanabilir. Etkinin doğrudan sonuçlarını yansıtanlar ise etki biyogöstergeleridir.

Klasik epidemiyolojik metodlar kullanılarak yapılan çalışmalar genellikle etkene maruziyetin uzun dönemli sonuçlarını tespit etmek ya da değerlendirmek konusunda yardımcı olurken, moleküler epidemiyolojik teknikler ise, patoloji oluşmadan çok önce risk değerlendirmesinde yardımcı bilgiler sunar. Bu temel farklılık, moleküler epidemiyolojik incelemelerin koruyucu sağlığa sunduğu hizmet bakımından üstün yanını oluşturur. Dolayısıyla moleküler epidemiyoloji günümüzde malignansi oluşum ve tespit sürecini incelemede yaygın olarak yararlanılan bir uğraş alanıdır (102- 105).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Temmuz - Eylül 2010 tarihleri arasında Harran Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi genel çocuk polikliniğine başvuran kronik hastalığı olmayan, pasif olarak sigaraya maruz kalan 27 çocuk ve sigaraya maruz kalmayan 27 çocuk çalışmaya alındı. Kendisi içmediği halde çevresel sigara dumanına maruz kalanlar (günde en az 1 adet sigara dumanına maruz kalan veya en az 2 saat süreyle çevresel sigara dumanına maruziyet) pasif içici, ailesinde hiç sigara içilmeyen ve çevresel sigara dumanına maruz kalmayanlar ise kontrol grubu olarak kabul edildi.

Çalışma kontrollü, kesitsel olarak planlandı ve Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun onayı alındıktan sonra yapıldı. Çalışmaya alınan çocukların velilerinden bilgilendirilmiş onam alındı. Veriler araştırmacının kendisi tarafından, yüz yüze görüşme tekniği kullanılarak toplandı. Bu yaşlarda çocukları olan ailelere çalışma anlatılmış, kendilerine anketle bazı sorular sorulup, çocuklarından kan ve idrar örneği alınacağı bildirilmiştir. Hazırlanan anket formunda; görüşme yapılan kişinin çocuğa yakınlık derecesi, akraba evliliği olup olmadığı, çocuğun kardeş sayısı, anne ve babanın işi, anne ve babanın eğitim durumu, ailenin ortalama aylık geliri, annenin gebelikte sigara içip içmediği, babanın sigara içip içmediği, içiyorsa miktarı ve türü, evde anne ve babadan başka sigara içen olup olmadığı, içiliyorsa miktarı ve türü, evde günde içilen toplam sigara miktarı, evin durumu ve ısıtma sistemi hakkında bilgiler, çocuğun ve ailenin diğer bireylerinin sürekli kontrol gerektiren veya sürekli ilaç kullanımı gerektiren bir hastalığı var olup olmadığı soruldu. Uygulanan anket formu Ek 1'de sunulmuştur. Tüm çocukların vücut ağırlığı ve boyları standart yöntemler yardımıyla ölçüldü.

Tüm çocuklardan idrar kotinin düzeyleri ölçümü için idrar örnekleri steril ve kapaklı idrar kaplarına alınmıştır. İdrar kotinin düzeylerinin tayini, İmmulite marka ticari kit (İmmulite 2500 Nicotine Metabolite Assay; Diagnostic Products Corp., Los Angeles CA) kullanılarak kemilüminesan yöntemiyle İmmulite 2500 marka ve model kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kotinin düzeyleri ng/ml cinsinden hesaplanmıştır.

Aynı sırada heparin ile yıkanmış tüplere alınan 5 cc'lik kan örnekleri mononükleer lökosit DNA hasarı çalışılmak üzere işleme kondu.

3.1. Mononükleer Lökositlerin Seperasyonu

Bir ml histopaque –1077 üzerine bir ml taze heparinize kan yavaşça konup 2100 rpm ve 25°C’de 30 dakika santrifüj edildi. Orta tabakada biriken mononükleer lökositler pipet yardımıyla alınıp bir ml tuzlu fosfat tamponu (pH=7.4) ile karıştırıldıktan sonra 1600 rpm ve 25°C’de 10 dakika santrifüj edilerek iki kez yıkandı. Üstteki süpernatant atılıp pellet tuzlu fosfat tamponu (pH=7,4) ile 10^6 mononükleer lökosit / μ l olacak şekilde dilüe edildi.

3.2. Comet Assay (alkali mononükleer hücre elektroforezi) yöntemi ile DNA Hasar Tayini (mDNA hasarı)

Comet assay; hızlı, basit ve hücresel düzeyde uygulanması kolay, genotoksisite ve olası endojen DNA hasarını iyi tanımlayan bir tekniktir (106 - 110).

Yöntemin Prensipleri: Comet assay yöntemi alkali pH’da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Tek hücreler veya çekirdekçikler agaroz üzerine yerleştirilir ve lizisten sonra zarar görmemiş DNA’lar taşıma sırasında Comet (kuyruk) oluşturmazlar. Oysa DNA fragmente olmuşsa fragmentler (nükleik asitler) farklı moleküler ağırlıklara ve farklı elektrik yüklerine sahip olacaklarından elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek kuyruk şeklinde bir görüntü oluştururlar.

Yönteminin Uygulanışı:

Slaytların Hazırlanması: NMP (Normol melting paint) agaroz jel %1,0’lik olarak hazırlandıktan sonra 100 μ l jel kenarları buzlanmış lam üzerine damlatıldı ve üzeri lamel ile kapatılarak buzdolabında (2-4°C) 5 dakika bekletildikten sonra lamelleri kaldırıldı. Hazırlanan lameller nemli kutularda bekletildi. PBS (Fosfat buffered saline) ile mm^3 ’te 10^4 hücre olacak şekilde dilüe edilmiş mononükleer hücrelerden 10 μ l alınarak 80 μ l % 0,7’lik low melting point (LMP) agaroz jel (37 °C) ile karıştırılarak birinci tabaka üzerine ince film şeklinde yayıldı ve tekrar lamel ile kapatılarak buzdolabında donması için 5 dakika bekletildi.

Lizis aşaması: Agaroz jel kurduktan sonra slaytlar yaklaşık bir saat süre ile yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren soğuk lizis solüsyonunda bekletilerek hücre ve çekirdek zarı lizise uğratıldı. Lizis solüsyonunun içeriği 100 mM EDTA, 2,5 M Sodyum klorid, 10 mM trizma base'dan oluşmaktadır. Çalışmadan hemen önce % 1 oranında triton X-100 ve % 10 oranında DMSO karıştırılıp soğutulduktan sonra kullanıldı.

Elektroforez Tamponu: Elektroforezde yürütmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar alkali elektroforez tamponunda (1mM EDTA, 300 mM sodyum hidroksit ve pH=13) 30 dakika inkübasyona bırakıldı.

Elektroforezde Yürütme: Alkali elektroforez tamponunda inkübasyon tamamlandıktan sonra DNA'lar bu tampon çözeltisi içerisinde 300 mA, 17 volt'luk elektriksel alanda ve 5 – 25 °C'de 30 dakika yürütüldü.

Nötralizasyon: Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra alkali tampon çözeltisini ortamdaki uzaklaştırmak için slaytlar 3 dakika süre ile 3 kez nötralizasyon tamponu ile (0.4 M Tris - HCL, pH 7.5) yıkandı.

Boyama: Nötralizasyon işlemi tamamlandıktan sonra boyama işlemine geçildi. Boyama işlemi için floresan boya olan etidyum bromit boyası (5 µg/ml) kullanıldı. Her bir slayt için 80 µL boya slayt üzerine damlatıldıktan sonra lamel ile üzeri kapatılarak 20 büyütme floresan mikroskop'ta (Nikon, Japonya, Eksitasyon DB: 546 nm, Emisyon DB: 580 nm) 50 adet DNA görüntüsü değerlendirildi.

Analiz: Bu yöntemde DNA migrasyonu vizüel olarak değerlendirildi. Oluşan hasarın derecesine göre DNA'lar beş kategoriye ayrıldı. Hiç hasar bulunmayan DNA'lar Class 0, maksimum hasar olan DNA'lar ise Class 4 olarak değerlendirildi.

Değerlendirilen 50 hücreye ait DNA'lardaki hasar dereceleri tespit edilip çıkan sonuç 2 ile çarpıldı ve değerlendirme 100 üzerinden yapılmış oldu. Dolayısıyla bu değerlendirmede en yüksek değer 400 olabilecektir.

Migrasyonun uzunluğu fragmentlerin miktarına, DNA zincir kırılmalarına ve alkali-labil bölgelerin seviyelerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir.

3.3. Yapılan İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS 11,5 programı kullanılarak yapıldı. Grupların karşılaştırılmasında Student t-test, Cinsiyetler Ki-kare testi ile karşılaştırıldı, ilişki analizinde ise Pearson's korelasyon testleri kullanıldı. $p < 0,05$ olması anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya toplam 54 çocuk alındı. Çocuklar, sigara maruziyetine göre iki gruba ayrıldı. Sigara dumanı maruziyeti olmayan grupta 10'u kız (% 37) ve 17'si erkek (% 63) toplam 27 çocuk, pasif sigara dumanı maruziyeti olan grupta 10'u kız (% 37) ve 17'si erkek (% 63) toplam 27 çocuk çalışmaya alındı. Gruplar arasındaki çocukların cinsiyet oranları açısından fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=1.00$).

Gruplar arasındaki yaş, ağırlık, boy, BMI oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Her iki gruba ait antropometrik veriler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Çalışmadaki çocukların ortalama yaş, ağırlık, boy ve BMI değerlerinin karşılaştırılması

	Sigaraya Maruz Kalan n:27	Sigaraya Maruz Kalmayan n:27	<i>P</i>
	X ± SD	X ± SD	
Yaş (yıl)	7,6±3,52 ^a	7,5±3,36 ^a	0,944
Ağırlık (kg)	24,1±10,99 ^a	25,8±19,62 ^a	0,692
Boy (cm)	120,07±20,02 ^a	117,8 ±17,17 ^a	0,666
BMI (kg/m ²)	15,9±3,18 ^a	18,4±15,45 ^a	0,411

^a Ortalama ± standart sapma (SS) olarak verilmiştir.

Ortalama idrar kotinin düzeyi yönünden sigara dumanına maruz kalan grubun değerleri sigara dumanına maruz kalmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,001$). Ortalama DNA hasarı düzeyi sigara dumanına maruz kalan grupta sigara dumanına maruz kalmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptandı ($p<0,001$).

Sigara dumanı maruziyetine göre çocukların ortalama idrar kotinin düzeyi ile DNA hasarı değerleri karşılaştırmalı olarak Tablo 2'de verilmiştir.

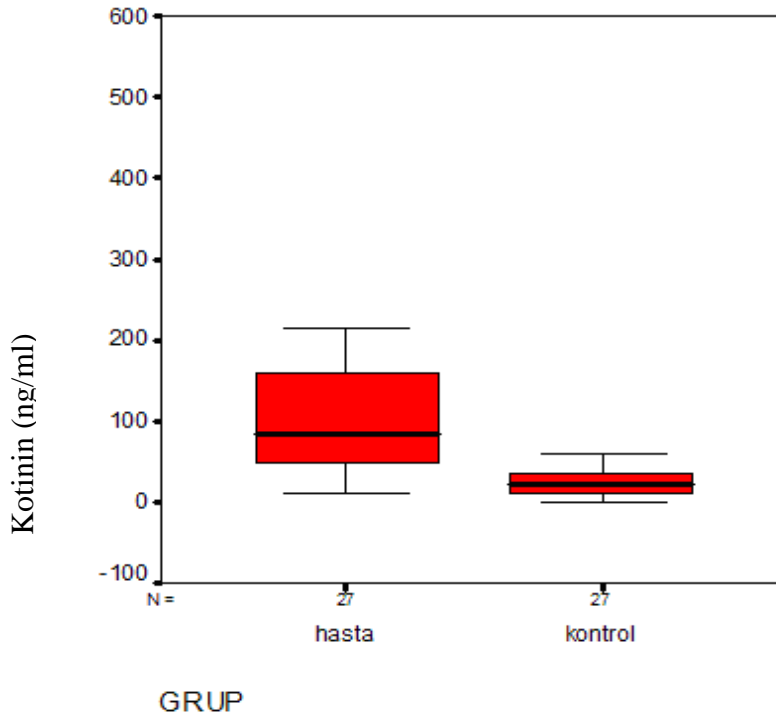
Sigara dumanına maruz kalan grubun ortalama kotinin düzeyi ile DNA hasarı düzeyleri arasında anlamlı derecede korelasyon mevcuttu, korelasyon değerleri $r=0,466$ ($p=0,014$) olarak bulundu.

Tablo 2. Grupların idrar kotinin, DNA hasarı düzeyleri

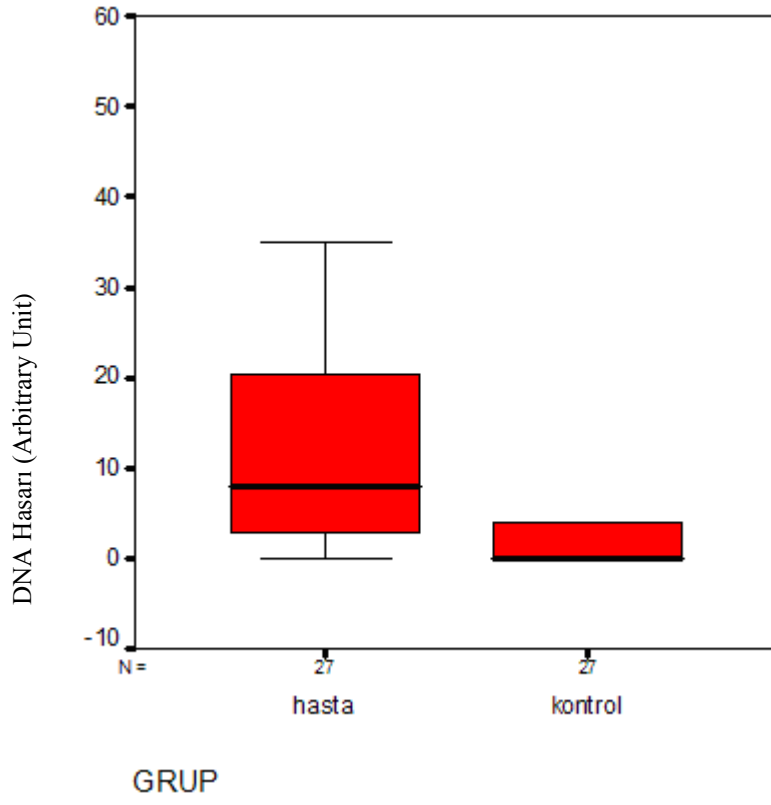
	Sigaraya Maruz Kalan n:27	Sigaraya Maruz Kalmayan n:27	<i>P</i>
	$X \pm SD$	$X \pm SD$	
DNA Hasarı (Arbitrary Unit)	$24,96 \pm 25,59^a$	$4,59 \pm 8,03^a$	<0,001
Kotinin (ng/ml)	$119,79 \pm 115,31^a$	$27,59 \pm 24,43^a$	<0,001

^a Ortalama \pm SS olarak verilmiştir.

Grupların sigara dumanı maruziyetine göre idrar kotinin düzey grafiği Şekil 9'da gösterilmiştir. Gruplardaki sigara dumanı maruziyetine göre DNA hasarı düzey grafiği Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 9. Sigara dumanına maruz kalmaya göre çocukların idrar kotinin seviyeleri



Şekil 10. Sigara dumanına maruz kalmaya göre çocukların DNA hasarı seviyeleri

5. TARTIŞMA

Pasif sigara içiciliği, tıbbi sonuçlarından, sosyolojik ve hukuki boyutlarına kadar çok değişik yönleriyle günümüzde oldukça fazla tartışılan konulardan birisidir. Bu konu, çocukların maruziyeti bakımından ele alındığında genellikle sigara kullanan aile ve aileye yakın bireyler yüzünden çocukların pasif içici konumuna düştükleri gözlenmektedir. Pasif içiciliğin derecesi ölçüsünde çocuklarda çok çeşitli sağlık sorunları ortaya çıkabilmektedir. Bu sorunların başında bebeklerde İUGG ve çocuklarda gelişimsel problemler, perinatal ve neonatal ölüm, düşük doğum ağırlığı, otitis media, bronşit, pnömoni, astım, akciğer fonksiyonlarında azalma, nörogelişimsel gecikmeler, davranış problemleri, okul başarısında azalma ve ani bebek ölümleri riski gibi sorunlar gelmektedir (42, 44, 45, 46, 48). .

Öte yandan genel popülasyonda pasif içiciliğin insan kromozomları üzerine olan olumsuz etkisi tıp dünyasında geniş yankı uyandırmaktadır. Sigara içen ve pasif içici erişkin bireylerde yapılmış çok sayıda araştırma, bu kontaminant maddenin hücre DNA'sının yapısını bozarak yol açtığı genotoksik etkileri tartışmaktadır (11, 85, 87, 89, 102, 111 - 121). Bu genotoksik etkinin ileride karsinojen etkilere neden olma riskini artırması, bu konunun klinik önemini daha da artırmaktadır. Benzer risklerin çocuklarda da bulunduğu değinen araştırmaların olduğu da dikkate alındığında, çocuklarda pasif içiciliği; yol açtığı diğer sağlık sorunlarının yanı sıra, genotoksositeye bağlı potansiyel kanserojen etki bakımından da hayati önemdedir (10, 34, 122). Her ne kadar çocuklarda pasif içiciliği azaltmak için ciddi tedbirler alınmaya çalışılsa da yakın bir gelecekte bu maruziyeti ortadan kaldırma imkanı pek gözükmemektedir. Dolayısıyla bu sorunun daha uzun yıllar devam edeceği düşünülüyor. Bu durumda çocukların pasif içicilikten ne oranda etkilendiklerinin tespiti önemlidir. Gün geçtikçe bu genotoksik etkilerin daha hassas bir şekilde tespit edilmesi ve endişe duyulan kanserojen etkinin rutinde tespitine yönelik kullanılabilecek bir markerı olup olmayacağı tartışılmaktadır (11, 13, 104, 123, 124).

Son yıllarda geliştirilen ve DNA'daki çok küçük harabiyetlerin bile hassas biyogöstergesi olduğu kabul edilen bu kısa sürede yanıt alınan inceleme teknikleri diğer mutajenite testleri ile birlikte kullanılmaya başlanmıştır.

Sitogenetik bir yöntem olan kardeş kromatid değişimi (SCE) ve kromozomal aberasyon yöntemlerine kıyasla, DNA - comet tekniğinin sigaraya maruziyetin oluşturabileceği hasarın daha hassas biyogöstergesi olabileceği, çeşitli araştırmacılar tarafından da iddia edilmektedir. Örneğin Betti ve arkadaşları (125), 200 sağlıklı yetişkin bireyleri, sigara içme özelliklerine göre SCE ve DNA - comet yöntemini kullanarak değerlendirdiklerinde; sigara içen bireylerde DNA hasarını, SCE ile tespit edememelerine rağmen, DNA - comet yöntemiyle tespit edildiğini bildirmişler. Benzeri bir diğer çalışmada, sağlıklı ve sigara içen kişilerden alınan 100 örnek kıyaslandığında DNA hasarının DNA - comet tekniği ile araştırıldığında daha anlamlı ve erkeklerde kadınlara kıyasla daha da anlamlı derecede “fark edilebilir” olduğunu rapor etmiştir (126). Betti ve arkadaşlarının bu çalışmasının ilgi çeken bir diğer bulgusu da genç ve erişkin kişilere ait örnekleri arasında DNA - comet yönteminin SCE’ye benzer genotoksisite tespitine imkan sunduğunu beyan etmeleridir. Zira DNA hasarının biyogöstergesini etkilediği tartışılan çok sayıda metoda ait fiziksel faktör ve kişiye ait biyolojik faktör, DNA - comet tekniğinde karıştırıcı birer faktör olmaktan çıkmakta ve “*ihmal edilebilir*” düzeyde etkisinin olabileceği kabul edilmektedir. Dolayısıyla, DNA - comet yöntemi, sigara vb. çevresel kontaminantların DNA’da yol açabileceği hasarın tespitinde hassas bir yöntem olduğu yönünde ciddi kanıtlar olarak değerlendirilebilir.

Literatürde sitogenetik yöntemlerle de sigaraya bağlı DNA hasarını gösteren çalışmalara rastlanmaktadır. Bu çalışmalarda DNA hasarı, fazla sigara içen bireylerde ancak tespit edilebilirken, DNA – comet’te ise, düşük derecedeki tütün maruziyetinin yol açmış olabileceği DNA hasarını bile tespit edilebilmektedir. Bu kadar hassas tespit yapabilmenin nedeni, sigara dumanı gibi serbest radikallerin lökositlerin DNA’larının sarmalında yarattığı inflamasyon derecesi ile ilişkilidir ve DNA - comet tekniği de, bu amaca yönelik olarak sarmaldaki hasarı göstermesi bakımından önemlidir (127).

DNA hasarı, ileride kötü çevre faktörlerinin etkisine maruz kalan kişilerde malignansi geliştirme olasılığının daha yüksek olması bakımından klinik önemi göz ardı edilmemelidir (11). Nitekim bu konuda 22000 kişide yapılmış Avrupa müşterek “kanser risk biyogöstergeleri“ başlıklı projede sigara ve diğer kontaminant faktörlere bağlı DNA hasarının saptandığı biyogöstergelerle yüksek seviyede risk tespit edilen gruplarda uzun süreli topluluk çalışmalarının gözlem sonuçları, kanser gelişme riskinin paralel derecede yüksek olduğu ile gösterilmiştir (11, 128).

Çocuklarda pasif sigara içiminin 1-8 yaş arası 64 çocukta DNA hasarına etkisini araştıran Zalata ve arkadaşlarının çalışmasında (10); 20 sigaradan fazlasına maruz kalan çocuklar ve 20 sigaradan azına maruz kalanlar şeklinde ve sigaraya maruz kalmayanlar şeklinde 3 grupta incelenmiştir. Sigara dumanına maruz kalanlarda yapılan uzun süreli prospektif incelemede gelişme geriliği, solunum ve gastrointestinal hastalıklarının görülme sıklığının kontrole göre daha yüksek olduğunu tespit etmişler. Bu çocuklarda Comet – assay tekniğiyle DNA hasarının miktarı kontrol grubuna göre son derece fazla oranda anlamlı olduğunu, buna karşın sigaraya az oranda maruz kalanlarda ve kontrol grubunda (sırasıyla DNA hasarı: 11.81 ve 7.46) daha az düzeyde bulunmuş olması, araştırmamızın tutarlılığı açısından oldukça önemlidir.

Çalışmamızda sigara dumanına maruz kalan grubun Comet – assay tekniğiyle tespit edilen DNA hasarı şiddeti, sigara dumanına maruz kalmayan gruba göre anlamlı olarak yüksekti.

Etkene maruziyetin derecesi, genotoksisitenin klinik sonuçlarında ve bu sonuçların tespitinde önem taşımaktadır. Pasif içicilik gibi durumlarda sigara dumanına maruziyetin derecesini çok çeşitli faktörler etkileyebilir.

Çalışmamızda sigara maruziyetini değerlendirmek amacı ile anket ve idrar kotinin seviyelerinin tespiti yapılmıştır. Yapılan çeşitli araştırmalarda ebeveynlerin çocukların sigara dumanı maruziyeti konusunda verdikleri bilgilerin, çocukların idrarında ölçülen kotinin düzeyi ile korele olmadığı, bu nedenle bu bilgilerin tek başına yeterli olamayacağı bildirilmiştir (129, 130). Karadağ ve ark. astım atağı ile başvuran çocukların anne babalarına uyguladıkları ankete verilen cevaplarla, çocukların idrarında ölçülen kotinin düzeyinin uyumlu olmadığını, dolayısıyla çocukların sigara maruziyeti konusunda ebeveynlerden alınan bilgilerin fazla güvenilir olmadığını vurgulamışlardır (57). Bizim çalışmamızda da yanında sigara içilmediği bildirilen çocuklardan alınan idrar örneğinde kotinin düzeyinin yüksek bulunması oldukça düşündürücüdür. Bu sonuçlar çocuklarda pasif içicilik oranları belirlenirken ailelerin verdiği bilgilerle birlikte objektif bir kriter olan kotinin seviyesinin çalışılması gerekliliğinin ortaya koymaktadır.

Çobanoğlu ve ark.'nın 9-12 yaş grubunda yapmış oldukları bir çalışmada babaları sigara içen öğrencilerin idrar kotinin düzeyleri babaları sigara içmeyen çocuklarda saptanmış kotinin düzeyine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksektir (131). Irvine ve

ark. çocuklarda evde içilen sigara sayısı ve evde sigara içen kişi sayısı ile kotinin düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptamıştır (132).

Çalışmamızda sigara dumanına maruz kalan grubun idrar kotinin düzeyleri, sigara dumanına maruz kalmayan gruba göre anlamlı olarak yüksekti.

Zalata ve arkadaşlarının çalışmasında DNA - comet analizi, serum MDA konsantrasyonları, α -tokoferol düzeyi ve kotinin oranı arasındaki anlamlı korelasyon, DNA hasarının OS ilişkili olduğunu akla getirmektedir. Yapılan farklı çalışmalarda da, çevresel sigara dumanına maruz kalan çocuklarda serum MDA konsantrasyonlarındaki artış ve eritrosit GSH-Px aktivitelerindeki ve tokoferol fraksiyonlarındaki (α, γ, δ) düşüşün, duman stresiyle uyumlu olarak artmış oksidatif olaya hücrelerin verdiği indirekt bir cevabı olabileceği tahmininde bulunmaktadır.

Bu bulgular, sigara içiciliğinin OS'yi arttırdığı ve ETS maruziyetini takiben gelişen antioksidan sistemin özel bir metabolik savunma mekanizması olabileceği görüşünü desteklemektedir. Bu bulgu, sigara içenlerde ve pasif içicilerde sigara içmeyip maruz kalmayanlarla kıyaslandığında anlamlı derecede daha düşük plazma antioksidan durumun tespit edildiği önceki bir çalışmayla da tutarlıdır (133). Sigara içicilerdeki düşük α -tokoferol mekanizması, olası oksidasyon yolları boyunca işlemektedir ve bu da düşük plazma askorbik asit düzeylerinin eşlik ettiği α -tokoferollerin antioksidan fonksiyonları ile uyumludur(134). Ebeveynlerin tütün kullanımı tüm aile bireyleri için çok ciddi bir sağlık sorunudur özellikle de çocuklarda ETS'nin artmış hastalık riski ve morbidite gibi uzun dönemli sonuçlar doğurması nedeniyle daha önemlidir (135). Çocukluk süresince polisiklik aromatik karbonlara (PAHs) maruz kalınması, yetişkin dönemde kanser gelişimi ile ilişkili olabilir (136).

Çalışmamızda idrar kotinin düzeyleri ile DNA hasarı düzeyi arasında pozitif korelasyon mevcuttu.

Bu çalışma, açıklayıcı olmaktan çok gözlemseldir; bu yüzden de çeşitli bakış açılarına açıktır. Sonuçlar, çalışma populasyonu arasındaki gerçek farklılıklardan ötürü farklı olabilir. Aile durumu ya da ebeveynlerin davranışına gelince bunlar çocuklarda farklılık gösterebilir. Mesela, maruz çocuklar muhtemelen daha alt sosyal sınıftandırlar. Belirli klinik özellik gösteren çocukları çalışmaya almaya yatkınlık olmuş olabilir. Bu yüzden yanlış farklılıklar tespit edilmiş olabilir. Üstün körü maruziyet değerlendirilmesi verilmesi, karşılaştırılabilir çalışmaların olmayışı ve maruz kalmayan çocuklara karşı çevresel sigara dumanına maruz

kalanların sağlık durumlarında geniş farklılıklar olması gibi sonuçlar, oldukça dikkatli bir şekilde yorumlanmalıdır. Çocuklarda kotinin düzeyleri ve kapalı alanda maruz kalınan nikotin düzeyleri arasındaki pozitif korelasyon, çevresel sigara dumanı maruziyeti tayininde bunun iyi bir biyomarker olabildiğini ortaya koymaktadır. Bununla beraber kotinin düzeylerinin aynı sayıda sigara içenlerde bile geniş bir farklılık vardır. Sigara içmeyenlerin idrarında düşük kotinin düzeyinin tespit edilmesi, çevresel sigara dumanını tam önlemenin hemen hemen imkansız olması kadar şaşırtıcı değildi. Bu bulgu, önceki çalışmalarla uyumluydu (137).

Bununla beraber bu sonuçlar, çocukların sağlık durumunu kötüleştiren eşzamanlı diğer hasar vericilerden de etkilenebilir. Bu yüzden ÇSD maruziyetiyle DNA hasarı arasında ilişki olduğunu gösteren bulgu, dikkatle yorumlanmalıdır, özellikle de artmış DNA hasarının tek başına ÇSD maruziyetine delil olarak alınmamalıdır. OS nedeniyle ÇSD maruz çocuklar yüksek DNA hasarı riskine sahiptir, tüm çocuklar için dumansız bir ev oluşturmak için çaba sarf etmeye devam etmek hala gereklidir. Dahası çocukların ÇSD maruziyetini azaltmak için daha uygulamaya yönelik, legal ve idari önlemler alınmalıdır.

6. SONUÇ

Bu araştırmadaki Comet – assay analizinin sonuçları, pasif içici konumundaki çocukların bu riske maruz kalmayanlara göre genotoksisite bakımından daha fazla risk altında olduklarını kuvvetle düşündürmektedir. Elde edilen veriler ışığında ileride bu konuda Comet - assay yöntemiyle kapsamlı çalışmaların yapılması, daha somut yorumlara olanak sunabilecektir.

Çalışmamızda sigara dumanına maruz kalan pasif içici durumundaki çocuklarda etkilenme derecesinin objektif bir kriteri olan idrar kotinin düzeyi ile DNA hasarı arasında pozitif korelasyonun bulunması kotininin pasif içici çocuklarda DNA hasarı açısından ilişkili olabileceğini göstermektedir.

Son olarak, sigaranın çocuklarda pasif içiciliğe bağlı DNA hasarına yol açması bu çalışmada tespit edilmiştir. Dolayısıyla sigara dumanından arındırılmış yaşam alanlarının çocuklar için sağlanmasının şart olmasını bir defa daha göstermiştir. Çocukların bu hasarlayıcı ajana maruz kalmalarının önlenmesi; bu konuda daha uygulanabilir yasal ve idari önlemlerin alınmasına, sorunların tespitine yardımcı ileri laboratuvar tekniklerinin geliştirilmesine /kullanılmasına ve çocukların sağlığı ile uğraşanların bu konuda kamuoyunu yeterince bilgilendirmesine bağlıdır.

7. EKLER

7.1. Anket Formu

Görüşme Yapılanın Araştırmaya Katılacak Çocuğa Yakınlık Derecesi:

Anne Baba Diğer Ebeveyn (ise açıkça belirtiniz:)

Adı ve Soyadı:

Çocuğun Adı ve Soyadı:

Görüşme Tarihi:

Telefon:

Boy:

Kilo:

Akraba evliliği: 1. derece 2. derece 3. derece Yok

1- Çocuğun yaşı:

2- Çocuğun cinsiyeti:

3- Kardeş sayısı:

4- Annenin öğrenim durumu: 1. Okur-yazar değil

4. Ortaokul mezunu

2. Okur-yazar

5. Lise mezunu

3. İlkokul mezunu

6. Üniversite-yüksekokul mezunu

5- Babanın öğrenim durumu: 1. Okur-yazar değil

4. Ortaokul mezunu

2. Okur-yazar

5. Lise mezunu

3. İlkokul mezunu

6. Üniversite-yüksekokul mezunu

6- Annenin işi: 1. Ev hanımı 2. Gelir getiren bir işte çalışıyor

7- Babanın işi:

8- Ailenin aylık ortalama geliri kaç TL?

1- 500 veya altında

2- 501-1000 TL

3- 1001-1500 TL

4- 1501-2000 TL

5- 2000 üstü

9- Çocuğa hamile iken sigara içme durumu:

1. Hiç içmemiş

2. Düzenli kullanmış

3. Yanında sürekli sigara içilmiş 4. Ara sıra içmiş

10- Yaşanılan evin tipi: 1. Apartman dairesi

2. Gecekondu

11- Evde yaşayan kişi sayısı:

12- Çocuğun bulunduğu ortamda sigara içme durumu:

1. Kesinlikle içilmez

2. Ara sıra içilir

3. Balkonda ya da evin diğer bölümlerinde sigara açılıyor

- Sadece anne:tane/gün

- Sadece baba:tane/gün

- Her ikisinde:tane/gün

- Diğer:tane/gün

14- Evinizin ısıtma sistemi nedir?

1- Kömür sobası

2- Odun sobası

3- Doğal Gaz

4-Elektrikli ısıtıcı

5- Merkezi Kalorifer

6- Kat Kaloriferi

7-Diğer (belirtiniz.....)

15- Sizce çocuğunuz herhangi bir şekilde sigara dumanına maruz kalıyor mu?

1- Evet

2- Kesinlikle hayır

3- Bilmiyorum/ herhalde oluyordur

16- Çocuğunuzun sürekli kontrol gerektiren veya sürekli ilaç kullanımı gerektiren bir hastalığı var mı? 1- Yok 2- Var

17- Çocuğun anne, baba ve kardeşlerinde sürekli kontrol gerektiren veya sürekli ilaç kullanımı gerektiren bir hastalığı var mı? 1- Yok 2- Var

7. KAYNAKLAR

1. J. Dejmek, I. Solansk'y, K. Podrazilov'a, R.J. Sr'am, The exposure of nonsmoking and smoking mothers to environmental tobacco smoke during different gestational phases and fetal growth, *Environ. Health Perspect.* 110 (2002) 601–606.
2. M. De Sario, F. Forastiere, G. Viegi, M. Simoni, E. Chellini, P. Piccioni, L. Indinnimeo, L. Brunetti, Parental smoking and respiratory disorders in childhood, *Epidemiol. Prevent.* 29 (2005) 52–56.
3. H.R. Anderson, D.G. Cook, Passive smoking and sudden infant death syndrome: review of the epidemiological evidence, *Thorax* 52 (1997) 1003–1009.
4. A.G. Mainous, W.J. Hueston, Passive smoke and lowbirth weight: evidence for a threshold effect, *Arch. Fam. Med.* 3 (1994) 875–878.
5. W.B. Moskowitz, P.F. Schwartz, R.M. Schieken, Childhood passive smoking, race, and coronary artery disease risk, *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 153 (1999) 446–453.
6. M.M. Youssef, A. Saad, Effects of environmental tobacco smoke on blood lead level and anthropometric status of Egyptian preschool children, *Central Eur. J. Occup. Environ. Med.* 11 (2005) 197–206.
7. C.J. Smith, T.H. Fischer, Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction, *Atherosclerosis* 158 (2001) 257–267.
8. Yoshie Y, Ohshima H. Synergistic induction of DNA strand breakage by cigarette tar and nitric oxide. *Carcinogenesis.* 1997; 18(7): 1359-1363.
9. Benowitz NL. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev.* 1996; 18: 188–204.
10. Zalata A, Yahia S, El-Bakary A, Elsheikha HM. Increased DNA damage in children caused by passive smoking as assessed by comet assay and oxidative stress. *Mutat Res.* 2007; 629(2): 140 - 147.
11. Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, Hagmar L, Strömberg U, Rössner P, Boffetta P, Lindholm C, Gundy S, Lazutka J, Cebulska-Wasilewska A, Fabiánová E, Srám RJ, Knudsen LE, Barale R, Fucic A. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res.* 2006; 600(1 - 2): 37 - 45

12. Vineis P, Hoek G, Krzyzanowski M, et al. Lung cancers attributable to environmental tobacco smoke and air pollution in non-smokers in different European countries: a prospective study. *Environ Health*. 2007; 6: 1 - 7.
13. Neri M, Ugolini D, Bonassi S, Fucic A, Holland N, Knudsen LE, Sram RJ, Ceppi M, Bocchini V, Merlo DF. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. II. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutat Res*. 2006; 612(1): 14-39.
14. WHO, World Health Report. 1999; Genova. www.who.int/whr/1999/en/whr99_en.
15. Özyardımcı N. Sigara ve Sağlık, Uludağ Üniversitesi (Tıp Fakültesi) Basımevi, Bursa, 2002.
16. Karlıkaya C, Öztuna F, Solak ZA, Özkan M, Örsel O. Tütün Kontrolü. *Toraks Dergisi*. 2006; 7(1): 51-64.
17. Edwards R. The problem of tobacco smoking. *BMJ*. 2004; 328(7433): 217–219.
18. 2008 Küresel Yetişkin Tütün Araştırması, www.tapdk.gov.tr
19. www.cdc.gov/tobacco/global/GYTS/factsheets/2003/pdf/TurkeyFactsheet2003.
20. www.euro.who.int/pubrequest. The European Tobacco Control Report 2007.
21. T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Sağlık İşleri Dairesi Başkanlığı Genelge. 4207 sayılı Kanunun Uygulanması 1996/76.
22. T.C. Resmi Gazete- Kanun. Tütün mamullerinin zararlarının önlenmesine dair kanunda değişiklik yapılması kanunu. Sayı: 26761. 19 Ocak 2008.
23. Costa DL. Air Pollution. Kendall RJ, Anderson TA, Baker RJ, et al. *Ecotoxicology*. Chapter: 28 and 29. Casarett and Doull's *Toxicology The Basic Science of Poisons*. Sixth ed. Klaassen CD. Ed. McGraw-Hill NY; p:977-1046. 2001.
24. Kocyigit A, Selek S, Celik H, Dikilitas M. 2011. Mononuclear Leukocyte DNA Damage and Oxidative Stress: The Association with Smoking of Hand-rolled and Filter-Cigarettes *Mut Res*. 721 : 136–141
25. Giovino GA. The tobacco epidemic in the United States. *Am J Prev Med*. 2007; 33(6 Suppl): S318-326.
26. Kayaalp SO, Guven H. Nikotin ve diğer ganglion stimule ediciler, sigara ve sağlık, ganglion bloke edici ilaçlar: Kayaalp Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 2.Cilt s:106-1016. Onbirinci baskı; Kayaalp SO. ed, Hacettepe-Taş, Ankara. 2005.

27. National Cancer Institute (1999). Smoking and Tobacco Control Monograph 10 :Health Effects of Exposure to Environmental Tobacco Smoke. Bethesda, MD: NCI.Retrieved August 30, 2004, Erişim adresi: <http://cancercontrol.cancer.gov/tcrb/monographs/10>
28. Benowitz NL. Biomarkers of environmental tobacco smoke. *Environ Health Perspect.* 1999 May;107 Suppl 2: 349-355.
29. Brunnemann KD, Yu L, Hoffmann D. Assessment of carcinogenic volatile Nnitrosamines in tobacco and in mainstream and sidestream smoke from cigarettes. *Cancer research*, 1977; 37: 3218–3222.
30. Environmental Tobacco Smoke Air Quality Guidelines -Second Edition WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, 2000 Erişim adresi: www.euro.who.int
31. Karlıkaya C. Sigara ve meslek. *Solunum* 2004; 6(6): 262-275.
32. Smith CJ, Perfetti TA, Garg R and Hansch C. IARC Carcinogens reported in cigarette mainstream smoke and the calculated log p values. *Food Chem Toxicol.* 2003; 41(6): 807-817.
33. Barcala FJG, Takkouche B, Valdes L, Temes E, Leis R, Cabanas R, Suarez JRR, Tojo R. Parenteral smoking and lung function in healthy children and adolescents. *Arch. Bronconeumol.* 2007; 43(2): 81-85.
34. Hawamdeh A, Kasasbeh FA, Ahmad MA. Effects of passive smoking on children's health: a review. *East Mediterr Health J.* 2003; (3): 441-447.
35. Fracasso ME, Doria D, Franceschetti P, Perbellini L, Romeo L. DNA damage and repair capacity by comet assay in lymphocytes of white-collar active smokers and passive smokers (non- and ex-smokers) at workplace. *Toxicol Lett.* 2006;167(2): 131-141.
36. International Consultation on Environmental Tobacco Smoke (ETS) and Child Health. Geneva, World Health Organization, Division of Noncommunicable Disease, Tobacco Free Initiative, 1999.Erişim adresi:http://www.who.int/tobacco/research/en/ets_report.
37. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine*, 2006, 3(11): 2011-2029
38. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Smoking-attributable mortality, years of potential life lost, and productivity losses – United States, 2000–2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2008, 57: 1226–1228.
39. Lifting the smokescreen: 10 reasons for a smoke free Europe. Brussels, The Smoke Free Partnership, 2006

40. National Toxicology Program. 10th Report on Carcinogens. Washington DC: USA Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program, 2002.
41. Walsh RA. Effects of maternal smoking on adverse pregnancy outcomes: examination of the criteria of causation. *Hum Biol.* 1994; 66: 1059–1092.
42. Ana Florescu, Roberta Ferrence, Tom Einarson, Peter Selby and Gideon Koren. Methods for Quantification of Exposure to Cigarette Smoking and Environmental Tobacco Smoke: Focus on Developmental Toxicology. *Ther Drug Monit* 2009; 31: 14–30
43. DHHS US. Women and smoking: a report of the surgeon general. *Mayo Clin Womens Healthsource.* 2001; 5: 3.
44. Jinot J, Bayard S. Respiratory health effects of exposure to environmental tobacco smoke. *Rev Environ Health.* 1996; 11: 89–100.
45. Weitzman M, Byrd RS, Aligne CA, et al. The effects of tobacco exposure on children's behavioral and cognitive functioning: implications for clinical and Public health policy and future research. *Neurotoxicol Teratol.* 2002; 24: 397–406.
46. Murphy TD. Passive Smoking and Lung Disease. 2009 Erişim adresi: www.emedicine.com/ped/GeneralMedicine/Pulmonology
47. Murin S, Bilello KS, Matthay R. Other smoking-affected pulmonary diseases. *Clin Chest Med* 2000; 21: 121-137.
48. Mackay J, Eriksen M. Tobacco Atlas. <http://www.who.int/tobacco/en/atlas10>.
49. Hammaren-Malmi S, Tarkkanen J, Mattila PS. Analysis of risk factors for childhood persistent middle ear effusion. *Acta Otolaryngol* 2005; 125(10): 1051-1054
50. Cook DG, Strachan DP, Carey IM. Health effects of passive smoking. 9. Parental smoking and spirometric indices in children. *Thorax.* 1998; 53: 884–893.
51. www.epa.gov/smokefree/pubs/etsfs.
52. Fagerstrom K. The epidemiology of smoking: health consequences and benefits of cessation. *Drugs* 2002; 62 Suppl 2: 1-9.
53. Gray RF, Indurkha A, McCormick MC. Prevalence, stability, and predictors of clinically significant behavior problems in low birth weight children at 3, 5, and 8 years of age. *Pediatrics.* 2004; 114: 736-743.
54. Fergusson DM, Horwood LJ, Lynskey MT. Maternal smoking before and after pregnancy: effects on behavioral outcomes in middle childhood. *Pediatrics.* 1993; 92: 815–822.

55. Fergusson DM, Woodward LJ, Horwood LJ. Maternal smoking during pregnancy and psychiatric adjustment in late adolescence. *Arch Gen Psychiatry*. 1998; 55: 721–727.
56. Patrick DL, Cheadle A, Thompson DC, et al. The validity of self reported smoking: a review and meta-analysis. *Am J Public Health*. 1994; 84: 1086–1093.
57. Cornelius MD, Goldschmidt L, Dempsey DA. Environmental tobacco smoke exposure in low-income 6-year-olds: parent report and urine cotinine measures. *Nicotine Tob Res*. 2003; 5(3): 333-339.
58. Chen R, Tavendale R, Tunstall-Pedoe H. Measurement of passive smoking in adults: self-reported questionnaire or serum cotinine? *J Cancer Epidemiol Prev*. 2002; 7: 85–95.
59. Karadag B, Karakoc F, Ceran O, Ersu R, Inan S, Dagli E. Does passive smoke exposure trigger acute asthma attack in children? *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2003; 31(6): 318-323.
60. Jaakkola MS, Jaakkola JJ. Assessment of exposure to environmental tobacco smoke. *Eur Respir J*. 1997; 10: 2384–2397.
61. Woodward A, al-Delaimy W. Measures of exposure to environmental tobacco smoke. Validity, precision, and relevance. *Ann N Y Acad Sci*. 1999; 895: 156–172.
62. McBride CM, Curry SJ, Lando HA, et al. Prevention of relapse in women who quit smoking during pregnancy. *Am J Public Health*. 1999; 89: 706–711.
63. Britton GR, Brinthaup J, Stehle JM, et al. Comparison of self-reported smoking and urinary cotinine levels in a rural pregnant population. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 2004; 33: 306–311.
64. Webb DA, Boyd NR, Messina D, et al. The discrepancy between self reported smoking status and urine cotinine levels among women enrolled in prenatal care at four publicly funded clinical sites. *J Public Health Manag Pract*. 2003; 9: 322–325.
65. Callais F, Momas I, Roche D, et al. Questionnaire or objective assessment for studying exposure to tobacco smoke among asthmatic and healthy children: The French VESTA Study. *Prev Med*. 2003; 36: 108–113.
66. Shields PG. Tobacco smoking, harm reduction, and biomarkers. *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94: 1435–1444.
67. Hatsukami DK, Hecht SS, Hennrikus DJ, et al. Biomarkers of tobacco exposure or harm: application to clinical and epidemiological studies. 25–26 October 2001, Minneapolis, Minnesota. *Nicotine Tob Res*. 2003; 5: 387–396.

68. Leaderer BP, Liroy PJ, Spengler JD. Assessing exposures to inhaled complex mixtures. *Environ Health Perspect.* 1993; 101(Suppl 4): 167–177.
69. Jarvis MJ, Tunstall-Pedoe H, Feyerabend C, et al. Comparison of tests used to distinguish smokers from non smokers. *Am J Public Health.* 1987; 77: 1435–1438.
70. Stevens KR, Munoz LR. Cigarette smoking: evidence to guide measurement. *Res Nurs Health.* 2004; 27: 281–292.
71. Benowitz NL. Nicotine addiction. *Prim Care.* 1999; 26: 611–631.
72. Wong G.C., Berman B.A., Hoang T., Bernaards C., et al.: Children's exposure to environmental tobacco smoke in the home: Comparison of urine cotinine and parental reports. *Archives of Environmental Health.*, 2002; 57(6): 584-590.
73. US Environmental Protection Agency. Respiratory health effects of passive smoking: lung cancer and other disorders. Washington, DC: EPA, 1992. (Publication EPA/600/6-90/006F.) Erişim adresi: <http://www.epa.gov/smokefree/publications>.
74. Benowitz NL. Drug therapy. Pharmacologic aspects of cigarette smoking and nicotine addiction. *N Engl J Med.* 1988; 319: 1318–1330.
75. OEHHA. Health effects of exposure to environmental tobacco smoke. California Environmental Protection Agency. *Tob Control.* 1997; 6: 346–353.
76. Kuo H.-W., Yang J.-S., Chiu –C.: Determination of urinary and salivary cotinine using gas and liquid chromatography and enzyme-linked immunoabsorbent assay. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.* 2002; 768(2): 297-303.
77. EPA California. Proposed Identification of Environmental Tobacco Smoke as a Toxic Air Contaminant. 2005 Erişim adresi: <http://ash.org/CAEPAProposal>.
78. Bramer SL, Kallungal BA. Clinical considerations in study designs that use cotinine as a biomarker. *Biomarkers.* 2003; 8: 187–203.
79. Matt G.E., Wahlgren D.R., Hovell M.F., et al.: Measuring environmental tobacco smoke exposure in infants and young children through urine cotinine and memory-based parental reports: Empirical findings and discussion. *Tob. Contol.* 1999;8: 282-289.
80. Florescu A, Ferrence R, Einarson TR, et al. Reference values for hair cotinine as a biomarker of active and passive smoking in women of reproductive age, pregnant women, children, and neonates: systematic review and meta-analysis. *Ther Drug Monit.* 2007; 29: 437–446.

81. Dhar P. Measuring tobacco smoke exposure: quantifying nicotine/cotinine concentration in biological samples by colorimetry, chromatography and immunoassay methods. *J Pharm Biomed Anal.* 2004; 35: 155–168.
82. Berg J., Tymoczko J. and Stryer L. (2002) *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company ISBN 0-7167-4955-4956.
83. Champe PC, Harvey RA. *Biochemistry Lippincott's Illustrated Reviews*, in J.B. Lippincott Company. 1998: philadelphie.
84. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, et al. *Harper's Biochemistry*, 25 th ed. Appleton & Lange, 2000.
85. Aktips S. DNA: The replicative process and repair. *Textbook of Biochemistry*. 3rd ed. T.M. Devlin. 1992, New York. 607-680.
86. Akbaş E, Çelik A, Derici E, Söylemez F. Sigara kullanımının lenfosit yaşam süresi ve genotoksik etkilerinin incelenmesi. *Geriatry* 2001; 4(1): 15-18.
87. Michalska J, Motykiewicz G, Pendzich J, Kalinowska E, Midro A, Chorazy M. Measurement of cytogenetic endpoints in women environmentally exposed to airpollution. *Mutat Res.* 1999; 445(2): 139-45.
88. Vineis P, Husgafvel-Pursiainen K. Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis.* 2005; 26(11): 1846-55.
89. W.A. Pryor, K. Stone, Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyhydrate, and peroxyhydrate, *Ann. NY Acad. Sci.* 686 (1993) 12–27.
90. D.H. Phillips, Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues, *Carcinogenesis* 25 (2002) 1979–2004.
91. R.S. Barua, J.A. Ambrose, S. Srivastava, M.C. DeVoe, L.J. Eales-Reynolds, Reactive oxygen species are involved in smoking-induced dysfunction of nitric oxide biosynthesis and upregulation of endothelial nitric oxide synthase: an in vitro demonstration in human coronary artery endothelial cells, *Circulation* 107 (2003) 2342–2347.
92. Douki T, Reynaud-Angelin A, Cadet J, Sage E (2003). "Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation". *Biochemistry* 42 (30): 9221–6.
93. Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget J, Ravanat J, Sauvaigo S (1999). "Hydroxyl radicals and DNA base damage". *Mutat Res* 424 (1–2): 9–21.
94. Shigenaga M, Gimeno C, Ames B (1989). "Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage". *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (24): 9697–701.

95. Cathcart R, Schwiers E, Saul R, Ames B (1984). "Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine: a possible assay for oxidative DNA damage". *Proc Natl Acad Sci USA* 81 (18): 5633–7.
96. Valerie K, Povirk L (2003). "Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair". *Oncogene* 22 (37): 5792–812.
97. Onat T (1996) Protein enerji malnutrisyonu. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Eksen Yayınları*. 115-7
98. Van den Akker E, Lutgerink JT, Laqueur MVM, Joenje H. Retel J. *Mutat. Res.* 1994; 309: 45–52.
99. Steenken S. Purine bases, nucleosides, and nucleotides: aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e- and OH adducts. *J. Chem. Rev.* 1989; 89(24):503–520.
100. Halliwell B, Dizdaroglu M. Free radicals and the oxidant/antioxidant balance *J. Free Radical Res.* 1992; 16: 75–87.
101. De Boer J, Hoeijmakers J. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis*, 2000. 21: 453-460.
102. Balajee AS, Bohr VA. Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair. *Gene*, 2000. 250: 15-30.
103. Debeleş-Bütüner B, Kantarcı G. Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi. *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 2006; 35(2): 149-170.
104. Preston RJ, Hoffman GR. Genetic toxicology. Chapter:3/9. Casarett and Doull's *Toxicology The Basic Science of Poisons*. Sixth ed. Klaassen CD. Ed. McGraw-Hill NY; p: 321-350. 2001.
105. Aitio A. Biomarkers and Their Use in Occupational Medicine, Human Monitoring After Environmental and Occupational Exposure to Chemical and Physical Agents. D. Anderson et al. Ios Pres, 12-21.2000.
106. Dizdaroglu M, Karakaya AE: *Advances in DNA Damage and Repair*, Plenum Pub. 181-191, 1997.
107. Singh NP, Danner DB, Tice RR, et.al. DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *J. Mutat Res.* 1990; 237: 123-30.
108. Östling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984; 123: 291-8.

109. Kocyigit A, Keleş H, Selek S, et al. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *J. Mutation Res.* 2005; 124: 47-59.
110. Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, et.al. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res.* 1997; 375: 183–193.
111. Faust F, Kassie F, Knasmuller S, et.al. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res.* 2004; 566: 209–229.
112. Sardas S, Karahalil B, Akyol D, Kukner S, Karakaya AE.: The effect of smoking on sister chromatid exchange rate of newborn infants born to smoking mothers. *Mutat Res.* 1995; 341(4): 249-253.
113. Palma S, Cornetta T, Padua L, Cozzi R, Appolloni M, Ievoli E, Testa A. Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on genotoxic effects induced by tobacco smoke. *Mutat Res.* 2007; 633(1): 1-12.
114. Obe G, Vogt HJ, Madle S, Fahning A, Heller WD. Double-blind study on the effect of cigarette smoking on the chromosomes of human peripheral blood lymphocytes in vivo. *Mutat Res.* 1982; 92(1-2): 309-19.
115. Rowland RE, Harding KM. Increased sister chromatid exchange in the peripheral blood lymphocytes of young women who smoke cigarettes. *Hereditas.* 1999; 131(2): 143-6.
116. Boyacı H, Büyükgöze B, Başyigit İ, Yıldız F, Ilgazlı A, Duman C. Fetustaki sigara dumanı maruziyetinin kord kanı kotinin düzeyi ile değerlendirilmesi. *Toraks Dergisi* 2006; 7(2): 115-119.
117. Salonen K, Lahdetie J. No effect of maternal smoking in early pregnancy observed on chromosome aberrations in chorionic villus samples. *Mutat Res.* 1993; 298(4): 285-9.
118. de la Chica RA, Ribas I, Giraldo J, Egozcue J, Fuster C. Chromosomal instability in amniocytes from fetuses of mothers who smoke. *JAMA.* 2005; 293(10): 1212-22.
119. Sasikala K, Rosalin FR, Jude ALC, Kumar RA, Sudha S, Devi MV, Balachandar N, Beegam KAS, Meenakshi NM, Begum A. Active and passive smokers – a haematobiochemical and cytogenetic study. *Int J Hum Genet.* 2003; 3(1): 29-32.
120. Pluth JM, Ramsey MJ, Tucker JD. Role of maternal exposures and newborn genotypes on newborn chromosome aberration frequencies. *Mutat Res.* 2000; 465(1-2): 101-11.
121. Sardas S., Gok S., Karakaya A.E.: Increased frequency of sister chromatid exchanges in the peripheral lymphocytes of cigarette smokers. *Toxicol. In Vitro*, 1991; 5: 263-265.

122. Sardas S, Walker D, Akyol D, Karakaya AE.: Assessment of smoking-induced DNA damage in lymphocytes of smoking mothers of newborn infants using the alkaline single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat Res.* 1995; 335(3): 213-217.
123. Dabson R. Passive smoking increases children's risk of nasal cancer. *BMJ* 2005; 331: 534-535.
124. Neri M, Bonassi S, Knudsen LE, Sram RJ, Holland N, Ugolini D, Merlo DF. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. I. Overview and critical issues. *Mutat Res.* 2006; 612(1): 1-13.
125. Hagmar L, Brogger A, Hansteen IL, Heim S, Hogstedt B, Knudsen L, Lambert B, Linnainmaa K, Mitelman F, Nordenson I. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic Study Group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res.* 1994; 54(11): 2919-22.
126. Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R. Comparative studies by comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects. *Mutat Res.* 1995; 343(4): 201-7.
127. Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res.* 1994; 307: 323-333.
128. Schwartz J, Weiss ST. Host and environmental factors influencing the peripheral blood leukocyte count. *Am. J. Epidemiol.* 1991; 134: 1402-1409.
129. Rossner P, Boffetta P, Ceppi M, Bonassi S, Smerhovsky Z, Landa K, Juzova D, Srám RJ. Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer. *Environ Health Perspect.* 2005; 113(5): 517-20.
130. Derauf C, Katz AR, Easa D. Agreement between maternal self-reported ethanol intake and tobacco use during pregnancy and meconium assays for fatty acid ethyl esters and cotinine *Am J Epidemiol.* 2003; 158(7): 705-709.
131. Cobanoglu N, Kiper N, Dilber E, et al. Environmental tobacco smoke exposure and respiratory morbidity in children. *Inhal Toxicol.* 2007; 19: 779-785.
132. Irvine L, Crombie IK, Clark RA, Slane PW, Goodman KE, Feyerabend C, Cater JI. What determines levels of passive smoking in children with asthma? *Thorax* 1997; 52: 766-769.
133. Z.G. Xi, F.H. Chao, D.F. Yang, H.S. Zhang, W. Zhang, 8-Hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage induced by environmental tobacco side-stream smoke and its mechanism, *Biomed. Environ. Sci.* 18 (2005): 43–47.

134. R.S. Bruno, R. Ramakrishnan, T.J. Montine, T.M. Bray, M.G. Traber, α -Tocopherol disappearance is faster in cigarette smokers and is inversely related to their ascorbic acid status, *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (2005) 95–103.
135. J.R. Di Franza, R.A. Lew, Morbidity and mortality in children are associated with the use of tobacco products by other people, *Pediatrics* 97 (1996) 560–568.
136. American Academy of Pediatrics Committee on Environmental Health, Environmental tobacco smoke: a hazard to children, *Pediatrics* 99 (1997) 639–642.
137. S. Willers, R. Attewell, I. Bensryd, A. Schütz, G. Skarping, M. Vahter, Exposure to environmental tobacco smoke in the household and urinary cotinine excretion, heavy metals retention, and lung function, *Arch. Environ. Health* 47 (1992) 357–363.