

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**İDİYOPATİK TROMBOSİTOPENİK PURPURA (ITP)'LI HASTALAR
DA SERUM IL-17 VE MONONÜKLEER DNA HASARININ
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
İSMAİL DUSAK

DANIŞMAN
Doç. Dr. Şahbettin SELEK
Prof. Dr. Nurten AKSOY

ŞANLIURFA

2014

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**İMMÜN TROMBOSİTOPENİK PURPURA (ITP)'Lİ HASTALAR DA
SERUM IL-17 VE MONONÜKLEER DNA HASARININ
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
İSMAİL DUSAK

DANIŞMAN

Doç. Dr. Şahbettin SELEK

Prof. Dr. Nurten AKSOY

Bu tez, Harran Üniversitesi Araştırma Fonu Saymanlığı Tarafından **12189** nolu proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA

2014

HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

İsmail DUSAK'ın hazırladığı "İdiyopatik Trombositopenik Purpura (İTP)' li hastalarda serum IL-17 ve mononükleer DNA hasarının araştırılması " konulu çalışma 21.08.2013 tarihinde jüri üyeleri tarafından değerlendirilerek Biyokimya Anabilim Dalında **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.


Doç. Dr. Şahbettin SELEK(Danışman)


Harran Üniversitesi

BAŞKAN


Yrd. Doç. Dr. Feridun AKKAFA

Harran Üniversitesi

ÜYE


Yrd. Doç. Dr. Hatice SEZEN

Harran Üniversitesi

ÜYE

ONAY

24/08/2013

Prof. Dr. Nurten AKSOY

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle katkıda bulunan değerli hocalarım Prof. Dr. Nurten AKSOY'a ve Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT'e teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve tezimi hazırlamama katkıda bulunan değerli danışman hocalarım Doç. Dr. Şahbettin SELEK'e ve Prof. Dr. Nurten AKSOY'a gönülden teşekkür ederim.

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Kliniğindeki eğitimim süresince her türlü konuda desteğini esirgemeyen ve tezimi hazırlamamda ciddi emek sarf eden Öğr. Gör. Abdullah TAŐKIN' a ve Mehmet DOĞAN' a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi hazırlamamda desteklerini esirgemeyen Opr. Dr. Kadir ÇEVİKER hocama, Uzm. Dr. Tekin BİLGİÇ'e, Mahmut KILIÇ'a ve Kahraman KOYUN'a teşekkür ederim.

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Kliniğindeki eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen asistanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Kliniğini personellerine ayrıca teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca her türlü destek ve katkıları esirgemeyen annem, babam ve kardeşlerime teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

İsmail DUSAK

2014

TABLolar LİSTESİ

SAYFA NO

Tablo-1: çalışma gruplarının karakteristik ve demografik özellikleri	37
Tablo-2: Hasta ve kontrol grubu DNA hasar düzeyi	37
Tablo-3: Hasta ve kontrol grubu IL-17 düzeyi	37
Tablo-4: hasta grubunda DNA hasarı, IL-17 ve hematolojik parametreleri arasındaki korelasyonu	39



ŞEKİLLER LİSTESİ

SAYFA NO

Şekil -1: ITP hasta örnekleri	5
Şekil-2: Mutasyonların yol açtığı zararlar	9
Şekil-3: Genotoksik maddelerin yol açtığı moleküler değişimler	11
Şekil-4: Bazı Önemli Genotoksik Kimyasal Karsinojenler	16
Şekil-5a: Comet yöntemi ile hasarlı, az hasarlı ve hasarsız hücre örnekleri	22
Şekil -5b: Comet yöntemi ile “hasarlı” hücre örneği	22
Şekil -6: Histidinsiz ortamda üreyebilen kolonilerin mutajenitelerinin belirlenmesi	27
Şekil 7a: Kardeş kromatid değişimleri	27
Şekil 7b: Kromatidler arasında oluşan değişimler	28
Şekil-7: Asentrik kromatid parçası içeren mikronükleuslu hücrenin oluşumu	28
Şekil -8: Tam bir kromozom içeren mikronükleuslu hücrenin oluşumu	29
Şekil -9: Sitokinezi bloke edilmiş bir mikronükleus	32
Şekil -10: Sitokinezi bloke edilmiş bir mikronükleus bulunan hücre	32
Şekil -11: Mitoz bölünmede nükleusların dışında kalan ve mikronükleus oluşturmaya aday iki kromozom görülen hücre	32
Şekil -12: DNA ‘nın hasar düzeyine göre sınıflandırılması	35

SİMGE VE KISALTMALAR

A	: Adenin
BER	: Baz Eksizyon Tamiri
BHT	: Bütillemiş hidoksitoluen
C	: Sitozin
Cl	: Klor
DADS	: Diallyl disülfür
DAS	: Diallyl sülfür
DATS	: Dialil trisülfür
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EBSS	: Earle's Balanced Salt Solution
EDTA	: Etilen daimin tetra asetik asit
EM	: Ekstraselüler matriks
ETZ	: Elektron transport zinciri
FCS	: Fetal Calf Serum
FD	: Folin Dennis
Fe	: Demir
G	: Guanin
GC	: Guanilat Siklaz
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
GST	: Glutation-S-Transferaz
İTP	: İdiyopatik Trombositopenik Purpura
IgA	: İmmünglobülin A
IgG	: İmmünglobülin G

KA	: Kromozomal Aberasyon
KDD	: Kardeş Kromatid Değişimi
kDa	: Kilo dalton
nm	: Nanometre
MDA	: Malondialdehit
MCP-1	: Monosit Kemotaktit Protein -1
mRNA	: Messenger (Mesajcı) RNA
NER	: Nucleotide Excision Repair (Nükleotid ıkarma Onarımı)
RNA	: Ribonükleik Asit
RNS	: Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
tRNA	: Transfer (taşıyıcı) RNA
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
T	: Timin
U	: Urasil
UV	: Ultraviyole
5-OH-Cyt	: 5-hidroksi sitozin
5-OH-Ura	: 5-hidroksi urasil
8-OH-dGua	: 8-hidroksi deoksiguanozin

Grafik 1: Hasta ve kontrol gruplarının DNA Hasarı düzeylerinin arasındaki fark ve dağılımları 38

Grafik 2: Hasta ve kontrol gruplarının DNA Hasarı düzeylerinin arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları 39



ÖZET

İDİYOPATİK TROMBOSİTOPENİK PURPURA (İTP)'Lİ HASTALARDA SERUM IL-17 VE MONONÜKLEER DNA HASARININ ARAŞTIRILMASI

İsmail DUSAK

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

İdiyopatik trombositopenik purpura (İTP, primer immün trombositopenik purpura) trombositlere karşı oluşmuş antikorlar aracılığı ile dolaşımdaki trombositlerin yıkımının artması ile karakterize otoimmün bir hastalıktır.

İTP etyolojisi tam olarak anlaşılmasına rağmen meydana gelişinde antitrombosit antikorların rolü bilinmektedir. Trombositlere karşı meydana gelen antikorlar onların yıkımına neden olmaktadır.

Yaptığımız bu çalışmada İTP'li hastalarda serum IL-17 düzeyini ve DNA hasarını araştırdık. Serum IL-17 düzeyleri ELİSA yöntemiyle belirlendi. Mononükleer lökosit DNA hasarı Singh ve ark. tarafından geliştirilen Alkali Tek Hücre Elektroforez (Comet Assay) yöntemi modifiye edilerek çalışıldı.

Çalışmamız ile ilgili kan nünuneleri, İTP tanısı konulmuş, yaş aralığı 18- 35 aralığında, sigara içmeyen ve başka bir hastalığı mevcut olmayan 30 kişiden (16 bayan ve 14 erkek hastadan) 3 ml kan alınarak yapıldı. Kontrol grubu olarak da yine yaş aralığı 18-35 aralığında hiç sigara içmemiş, herhangi bir sağlık sorunu bulunmayan 30 kişiden (12 bayan ve 18 erkek) 3 ml kan nünunesi alınarak yapıldı. İstatistiksel analizler SPSS 15.0 kullanılarak student's *t* testi ile yapıldı. Korelasyon analizleri için pearson korelasyon testi kullanıldı.

Gruplar arasında yapılan incelemede hasta ve kontrol grupları arasında DNA hasarı bakımından anlamlı sonuçlar elde edilmesine karşın ($p= 0,025$), serum IL-17 düzeylerinde anlamlı sonuç elde edilmemiştir ($p=0,387$).

Çalışmamızda serum IL-17 düzeylerinin, İTP'li hastalarda anlamlı farklılık göstermemesi, DNA hasarının ise anlamlı düzeyde artmış olması; IL-17 düzeyleri olmasa da oksidatif DNA hasarının bu hastalarımızın tanı ve takibinde fikir verebileceğini göstermektedir. Fakat sonuçlarımızın daha kapsamlı çalışmalarla teyit edilmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: İdiyopatik Trombositopenik Purpura (İTP), IL-17, DNA hasarı.



ABSTRACT

INVESTIGATION OF SERUM IL-17 AND MONONUCLEAR DNA DAMAGE IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC TROMBOCYTOPENIC PURPURA (ITP)

İsmail DUSAK

Master's Thesis of Medical Biochemistry

Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP, primer immun thrombocytopenic purpura) is a disease characterized by the increasing of destroyed thrombocytes in the circulation through antibodies formed against thrombocytes.

Although the ethology of ITP has not been exactly understood, the role of anti-thrombocyte antibodies in its occurrence is known. The antibodies occurred against thrombocytes cause their destruction.

In this study we investigated level of serum IL-17 and DNA damage in ITP patients. IL-17 levels were detected by ELISA. Mononuclear leucocyte DNA damage was studied by modifying Alkaline Single Cell Electropresis Method (Comet Assay) developed by Singh et al.

Blood samples regarding to our study have been conducted by taking 3 ml blood from each of 30 people (16 female and 14 male patient) who has no other diseases, do not smoke, are in the age range of 18- 35, diagnosed with ITP. As a control group 30 people (16 female and 14 male patient) who has no any diseases, do not smoke, are in the age range of 18- 35 has been taken. Statistical analyses were performed with student's *t* test using SPSS 15.0 for windows program. For correlation analyses pearson correlation test was used.

Although there obtained meaningful results in terms of DNA damage in examination carried out between patient and control groups ($p=0,025$), it has not been obtained in terms of serum IL-17 levels ($p=0,387$).

In our study, no significantly different results for the serum IL-17 levels, but significant results for the DNA damage in ITP patient have implicated that oxidative DNA damage, not IL-17 levels, may be used for the diagnosis and following and treatment in these patients. However, more comprehensive study requires to verify the results.

Keywords: Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP), IL-17, DNA damage.



1. GİRİŞ VE AMAÇ

İdiopatik trombositopenik purpura (İTP), dolaşımdaki trombositlerin yıkımının artması ile karakterize, benign seyirli, kendi kendini sınırlayan, çocukluk çağının en sık karşılaşılan edinsel trombositopeni nedenidir (1). Patogenez dikkate alındığında bu hastalığa immün trombositopenik purpura da denilmektedir. Gerçek görülme sıklığının bilinmemesine rağmen yılda 1/10 000 çocukta görüldüğü tahmin edilmektedir. Akut İTP ve kronik İTP olmak üzere klinik olarak iki ana formda görülür. İTP vakalarının %85-90'ı akut formda görülür. Vakaların %15-20'sinde trombositopeni 6 aydan uzun sürerek kronikleşir.

Amatus Lusitanus, ateşi olmayan kanamalı bir çocukta pire ısırığına benzer, koyu renkli lekeleri "Morbus pulicaris absque febre" olarak adlandırarak trombositopenik purpuranın kanıt olmadan ilk klinik tanımını yapmıştır.

İTP etyolojisi tam olarak anlaşılmasına rağmen meydana gelişinde antitrombosit antikörlerin rolü bilinmektedir. Trombositlere karşı meydana gelen antikörler onların yıkımına neden olmaktadır (2).

Bir organizmanın genetik işaretlerinde, kalıtsal (herediter) bir farklılaşma oluşturan maddelere genel olarak genetik zehirler denir. Genetik zehir, gonadların gamet hücrelerini etkileyerek ya gametlerin sayıca azalmasına neden olur veya gametlerdeki genetik bilgiyi (informasyonu) değiştirir. Böylece iki aynı cinsiyete ait gametlerin birleşmesiyle oluşan zigot (dölllenmiş yumurta) ölmezse anne ve babadan farklı döller oluşur.

Kimyasal ajanların ya da radyasyonun gamet veya somatik hücrelerdeki DNA üzerinde oluşturduğu kalıcı değişimlere genel olarak mutasyon adı verilir. Mutasyona neden olan etkenlere ise mutajen denir. Kromozomal aberasyona neden olan ajanlara klastojen, anöploidiye neden olanlara ise anojen denir.

Mutasyonlar somatik doku hücrelerinde de olabilir, bu takdirde diğer (gelecek) nesillere geçmez. Bu değişme daha çok karsinogenezise zemin olması açısından önem taşır. Mutasyon her zaman zararlı olmaz. Çünkü genelde mutasyon devamlı değişen çevreye uyum sağlayan bir

gelişmedir. Mutasyonların zararlı etkileri ise üreme bozuklukları, embriyojenik ve perinatal ölüm, malformasyonlar, genelde hastalıklar ve kanser şeklinde görülür.

Son yıllarda kanser ve tedavisi üzerine yapılan yoğun çalışmalar, kansere neden olan durumlar ve risk gruplarını belirleme konusunda teşvik edici çalışmalar incelendiğinde, çok geniş bir yelpazede araştırma gereksinimine ihtiyaç duyulduğu anlaşılmaktadır.

Biz yaptığımız bu çalışma ile İdiyopatik Trombositopenik Purpura (İTP)'li hastaların serum IL-17 düzeylerine ve mononükleer DNA hasarı düzeylerini araştırıp anlamlı sonuçlar yönünden değerlendirmeyi amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. İdiyopatik trombositopenik purpura (İTP)

İdiyopatik trombositopenik purpura (İTP, primer immun trombositopenik purpura) trombositlere karşı oluşmuş antikorlar aracılığı ile dolaşımdaki trombositlerin yıkımının artması ile karakterize otoimmün bir hastalıktır (3).

İTP'nin görülme sıklığı yılda 5,5/100 000'dir. Kadın-erkek oranı 1,7/1 olup, görülme sıklığı yaş ile orantılı olarak artmaktadır. 60 yaş üstünde 2 kat daha sık görülmektedir (4). İTP akut ve kronik olmak üzere iki klinik formda görülür. Kronik İTP 6 aydan uzun sürer, tedavi gerektirir ve erişkinlerde daha sık görülür (4). Kronik İTP hastalarında trombositopeniye; otoimmün yıkım, komplemana bağımlı trombolizis ve trombosit yapımında bozulma gibi mekanizmalar neden olur. Trombosit üzerine yapışmış antikorlar trombositlerin mononükleer fagositer sistem tarafından dalakta temizlenmesine açmaktadırlar (5).

Trombositler, kemik iliğinin polipoid hücreleri olan megakaryositlerin parçalanması sonucu ortaya çıkan 1-4 µm çapında, disk şeklinde sitoplazma parçaları olup pıhtılaşmada önemli rol oynarlar. Ortalama trombosit volümü (MPV) $8,9 \pm 1,5$ fl değerindedir. Çevresel kanda bulunan trombosit sayısı 150000-450000 /µl arasında değişmektedir. Trombositlerin ömrü 7-10 gündür. Kemik iliğinden çevresel kana çıkan trombositlerin 1/3 kadarı dalakta sekestre olduktan sonra geri kalan 2/3'ü 7-10 gün sonra sıklıkla dalak ve karaciğer olmak üzere retiküloendotelyal sistem makrofajları tarafından ortadan kaldırılırlar. Normalde hemostaz işleminde trombosit kitlesinin küçük bir kısmı harcanır, bu yüzden trombositler yaşlanıp fagositik hücreler tarafından yıkılana kadar dolaşımda kalırlar (6). Hipokrat zamanından beri deride çok sayıda olan kanamalar purpura olarak adlandırılmıştır (6). 1557'de Amatus Lusitanus, ateşi olmayan kanamalı bir çocukta pire ısırtığına benzer, koyu renkli lekeleri 'Morbus pulicaris absque febre' olarak adlandırarak trombositopenik purpuranın kanıt olmadan ilk klinik tanımını yapmıştır (7).

İTP etyolojisi tam olarak anlaşılmasına rağmen meydana gelişinde antitrombosit antikorların rolü bilinmektedir. Trombositlere karşı meydana gelen antikorlar onların yıkımına neden olmaktadır.

1951 yılında Harrington İTP hasta serumunu sağlıklı kişilere transfüze ederek onlarda trombositopeni geliştiğini görmüş ve trombositopeniye neden olan antirombosit faktörü tanımlamıştır. Yapılan çalışmalar İTP hastalarında hücrel ve humoral immüitenin trombositopeniye sebep olduğunu göstermiştir (8).

İTP hastalarında trombositlerin yüzeyinde bulunan membran glikoproteinlerine karşı oluşan otoantikolar %75 oranında Gp IIb-IIIa ve Gp Ib-IX kompleksine karşı oluşur. Ayrıca Gp Ia-IIa, IV ve V kompleksine karşı oluşan antikolar da tanımlanmıştır (8-9). Trombositlere karşı oluşan otoantikoların çoğunluğu IgG olup, IgA ve IgM antikoları da bulunmuştur (9). Antikolarla kaplı trombositler retiküloendotelial sistemde, özellikle dalakta bulunan doku makrofajları tarafından sunulan Fcγ reseptörlerine bağlanarak dolaşımdan uzaklaştırılırlar (10).

2.1.1. Yaş ve Cinsiyet

Çocuklardaki İTP genellikle akut formudur. Kızlar ve erkekler benzer sıklıkta etkilenir. Kronik İTP ise erişkinlerde daha sık olmakla birlikte çocuklarda da görülebilir.

2.1.2. Belirti ve Bulgular

Ciltte morluklar, peteşiler (ciltte ya da ağız içi gibi diğer vücut yüzeylerinde oluşan toplu iğne büyüklüğünde, basmakla solmayan kanamalar), durdurulamayan kanamalar, burun kanaması, diş eti kanamaları, yoğun adet kanamaları, idrarda kan, dışkıda kan yakınmaları ile hasta başvurur.

2.1.3. Tanı

Hastalıkla ilgili öykü, fizik muayene bulguları, kan sayımı ve periferik yaymanın incelenmesi ile İTP ön tanısı konulabilir. Tanı için diğer trombositopeni yapan hastalıkların (kemik iliğini tutan kanserler, dalağı büyüten hastalıklar, hepatit ve benzeri) olmadığını gösterilmesi gerekir. Başka bir hastalık bulunamayan bir kişide kanda trombositler düşük iken, kemik iliğinde anormal hücreler görülmemesi ve megakaryositlerin bulunması ile İTP tanısı konur.



Şekil -1: ITP hasta örnekleri (5).

2.1.4. Tedavi

İTP'li hastaların çoğunda trombosit değeri normalin altında olmakla beraber, tedavi vermeyi gerektirmez. Dikkatli bir izlem ile takip edilir. Olguların %80'ni kendiliğinden 4-8 hafta içinde düzelmektedir. Tedavi ciddi kanama bulguları olan hastalarda gereklidir. Bu hastalıkta tedavi için trombosit sayısından çok klinik bulgular (sık, yaygın ve ciddi kanamanın olması) kriter olarak alınır. Tedavinin hedefi, bağışıklık sisteminin baskılanarak trombositlere karşı antikor gelişiminin engellenmesi ve dalakta trombositlerin parçalanmasının durdurulmasıdır. Bu amaçla kortikosteroid ilaçlar (kortizon), intravenöz immünglobulin, Anti-D kullanılır. Sadece hayatı tehdit eden kanama durumunda trombosit süspansiyonları kullanılır. Ancak hiçbir tedavinin %100 garantisi yoktur. Eğer bu ilaçlarla kalıcı bir etki elde edilemezse ve uzun süreli, sık, ciddi kanaması olan olgularda bazı özel şartlar altında, trombositlerin başlıca parçalandığı yer olan dalağın çıkartılması gerekebilir (splenektomi). Genellikle (%50-80) bu ameliyattan sonra trombosit değerleri güvenli bir düzeye yükselir. Nadiren splenektomiye rağmen kanamaya yol açacak kadar düşük trombosit değerleri devam edebilir. Bu durumda bağışıklık sistemini baskılayacak daha güçlü ilaçların kullanılması söz konusu olabilir.

2.2. Sitokinler ve IL-17

Sitokin, hayvan ve bitki hücrelerince üretilen, hücrelerin birbirleriyle iletişimini sağlayan protein ve peptidlerin bir grubudur. Hücre yüzeyi sitokin reseptörleri aracılığıyla görevlerini yaparlar. Yangı (enflamasyon) ve bağışıklık reaksiyonlarında, aktif lenfositler, makrofajlar, endotel, epitel ve konnektif dokular tarafından oluşturulurlar. Salınımları geçicidir. Sitokinler, hücrelerdeki reseptörlere bağlanarak hücre çoğalmasını uyarırlar (11). Sitokin ailesi başlıca suda çözünebilir küçük proteinlerin ve glikoproteinlerin (şeker zinciri eklenmiş proteinler) 8 ila 30 kDa'lık birimlerini içerirler (12). Hormonlar ve nörotransmitterler gibi işlev görürler, fakat hormonlar özgül organlardan kana salınır ve nörotransmitterler nöronlarca üretilirken, sitokinler bazı hücre tiplerince salınırlar. Bağışıklık sistemindeki temel rolleriyle sitokinler, çeşitli immünolojik, enfeksiyonöz ve enflamasyon hastalıklarında salınırlar (13,15). Bununla beraber, tüm fonksiyonları bağışıklık sistemiyle sınırlı değildir, embriyogenezde bazı gelişimsel süreçlerin bazı basamaklarında da görülürler. Bağışıklık sistemi bir patojene savaşırken, sitokinler, T hücresi ve makrofajlar gibi bağışıklık sistemi hücrelerini sinyal verir ve enfeksiyon bölgesine gitmelerini sağlarlar (14). Uygulamada, sitokinler daha fazla sitokin üretmeleri için onları uyararak bu hücreleri etkinleştirirler. Her sitokin özgül bir hücre yüzeyi reseptörüne bağlanır. Sonra hücre içi sinyallemenin kaskadları hücre fonksiyonlarını değiştirir (14). Bu, diğer moleküller için reseptör yüzeylerinin sayısının artması ya da dönüt uyarılmasıyla kendi etkilerinin baskılanmasını, diğer sitokinlerin üretilmesiyle sonuçlanan bazı genlerin üst ve/veya alt düzenlemesini ve onların transkripsiyon faktörlerini içerebilir. Sitokinler, lemfokinler, interlökinler ve kemokinler gibi fonksiyonlarına, salgılamadaki hücrelere veya işlev hedeflerindeki farklılıklara göre isimlendirilmişlerdir (9). *İnterleukin* terimi, araştırmacılar tarafından önceleri genellikle beyaz kan hücrelerine hedeflenen bu sitokinler için kullanılmıştır. Artık geniş anlamda günden güne keşfedilen daha yeni sitokin moleküllerinin tanımı ve bunların tahmin edilen işlevlerindeki küçük ilişkileri anlatmak için kullanılmaktadır. Bunların çok büyük derecesi T hücrelerince üretilmektedir (15).

İnterlökin 17 (IL-17); Pro-inflamatuar bir sitokin olup, inflamasyonla ilgili bir çok mediatörün ekspresyonunu indükler (16-17). IL-17 'nin immün sistemin düzenlenmesindeki önemine dair artan delillerin yanı sıra, inflamatuvar hastalıklar, otoimmün hastalıklar ve kanserde aktif rol oynayabileceği de bildirilmiştir (18). Migrasyon inhibitör faktör (MİF) tanımlanan ilk sitokin olup, lenfositler tarafından salgılanır ve makrofajların random migrasyonunu inhibe eder (19). Monosit kemotaktik protein -1 (MCP-1) kemokin ya da

kemoatraktan sitokin grubundan olup, bu grup sitokinler küçük protein yapısındadır ve inflamatuvar reaksiyon ve immünite ile ilişkili lökosit aktivasyonu ve migrasyonunu kontrol eden intraselüler haberci olarak görev yapar. IL-17' nin fibroblastlar, endotel hücreleri ve epitelyum hücrelerinde IL-6, IL-8 ve PGE2 üretimini arttırdığı da kaydedilmektedir.



3. GENOTOKSİSİTE VE DNA HASARI

Çevremizde insan sağlığı bakımından tehlike oluşturan kimyasal maddelerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Çeşitli farmasötik ürünler, gıdalarda ve temizlik malzemelerinde bulunan kimyasal maddeler, pestisitler, petrol ürünleri, hava kirliliği ve sigara bunlardan bazılarıdır. Genelde oral, cilt yada solunum yoluyla maruz kalınan bu tür toksik maddelerin yol açtığı genetik bozukluklar ve hastalıklar, ilgili toksik etkene maruziyetin artışına paralel olarak artmaktadır (20). Mutajen maddelerin bu tür sorunların oluşumuna katkısı ve aralarındaki ilişki günümüzde daha iyi bilinmektedir. Gündelik hayatta sürekli karşı karşıya geldiğimiz böylesi etkiye sahip maddelerin insanlarda oluşturabilecekleri genotoksik etkinin kontrolü büyük önem taşımaktadır (20).

3.1. Genotoksisite Tanımı

Genetik materyalin yapı ve özellikleri: Gen, canlıların tüm özelliklerinin kuşaktan kuşağa geçişini sağlayan maddeler bütünüdür. Fonksiyonel olarak tanımlamak gerekirse gen, özgül bir polipeptit zincirinin aminoasit sırasını belirleyen nükleotidler dizisidir (21).

Temelde canlılar prokaryot ve ökaryot olmak üzere ikiye ayrılırlar. Ökaryotları, bakteri gibi tek hücreden oluşan prokaryotik canlılardan ayıran en önemli özellik, genetik materyallerini oluşturan kromozomların bir çekirdek zarı ile çevrili olmasıdır. Ökaryotik hücreler her kromozomun iki kopyasını taşıdıkları için diploid, tek kromozom kopyası taşıyan prokaryotik hücreler ise haploid olarak adlandırılırlar. Bir insan genomu 22 çift otozomal ve bir çift (XX ya da XY) cinsiyet kromozomundan oluşur (21,23).

Ökaryotik hücrelerin genetik materyali, hücre döngüsünün mitoz evresinde ışık mikroskobu altında incelenebilir. Mitotik bölünmenin amacı sitogenez ile iki yavru hücre meydana gelirken, yeni hücrelere eşit ve ana hücre ile aynı miktar genetik materyal aktarmaktır. Bir hücre döngüsü G1 (gap 1), S (sentez), G2 (gap 2) ve M (mitoz) evrelerinden oluşur. Mitoz dışındaki evrelerin tümü interfaz olarak adlandırılır ve hücre döngüsünün yaklaşık %90'ını oluşturur. Genomun kendini eşlediği (replikasyon) evre S evresidir. S evresinde genetik materyal iki katına çıkar ve mitoz bölünme sonucu yavru hücrelere aktarılır. Mitoz evresi, kendi içinde profaz, metafaz, anafaz ve telofaz olmak üzere dört evreye ayrılır. Kromozomların en iyi gözlemlenebildiği an, hücrede ekvatoryal plağa yerleştikleri metafaz evresidir (22).

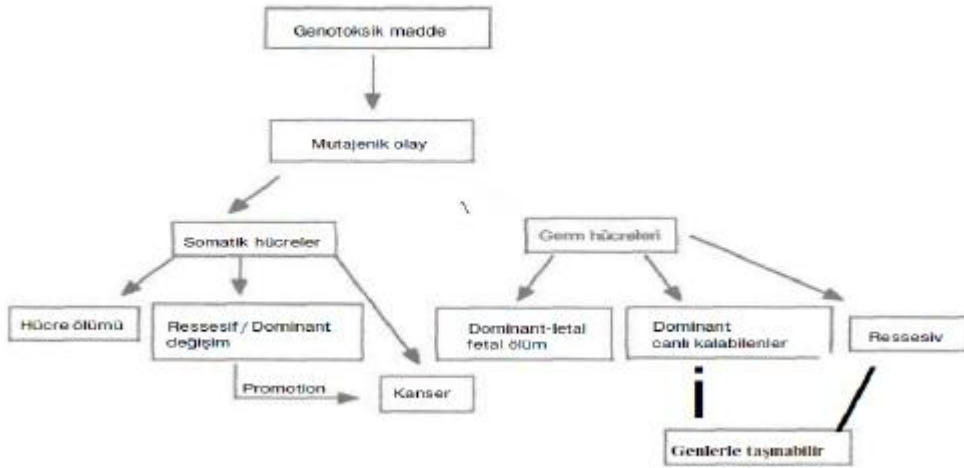
Nükleik asitler, kalıtsal bilgi taşıma yeteneğine sahiptir. Proteinler gibi polimerik yapıya sahip moleküllerdir. Proteinlerin yapı taşı aminoasitlerdir. Nükleik asitler ise nükleotid adı verilen yapı taşlarından oluşur. Nükleotid, bir fosfat grubu, riboz (RNA) veya deoksiriboz (DNA) diye adlandırılan beş karbonlu şeker ve şekerlerin birinci karbonuna glikozidik bağla tutunmuş bazlardan oluşur. Karbon ve azot atomu taşıyan halkasal bazlar pürin ve pirimidin yapısındadır. Nükleik asitler, polimerik yapılarını şekerler arası (üçüncü ve beşinci karbon arasında) fosfodiester bağları ile kazanırlar (24) .

3.2. Genetik Toksikoloji (Kimyasal Mutajenezis)

Bir organizmanın genetik işaretlerinde, kalıtsal (herediter) bir farklılaşma oluşturan maddelere genel olarak genetik zehirler denir. Genetik zehir, gonadların gamet hücrelerini etkileyerek ya gametlerin sayıca azalmasına neden olur veya gametlerdeki genetik bilgiyi (informasyonu) değiştirir. Böylece iki aynı cinsiyete ait gametlerin birleşmesiyle oluşan zigot (döllenen yumurta) ölmezse anne ve babadan farklı döller oluşur.

Kimyasal ajanların ya da radyasyonun gamet veya somatik hücrelerdeki DNA üzerinde oluşturduğu kalıcı değişimlere genel olarak mutasyon adı verilir. Mutasyona neden olan etkenlere ise mutajen denir. Kromozomal aberasyona neden olan ajanlara klastojen, anöploidiye neden olanlara ise anojen denir.

Mutasyonlar somatik doku hücrelerinde de olabilir, bu takdirde diğer (gelecek) nesillere geçmez. Bu değişim daha çok karsinogenezise zemin olması açısından önem taşır. Mutasyon her zaman zararlı olmaz. Çünkü genelde mutasyon devamlı değişen çevreye uyum sağlayan bir gelişmedir. Mutasyonların zararlı etkileri ise üreme bozuklukları, embriyojenik ve perinatal ölüm, malformasyonlar, genelde hastalıklar ve kanser şeklinde görülür.



Şekil-2 : Mutasyonların yol açtığı zararlar (23).

3.3. Genotoksisite, Genotoksik Etkiler ve Değerlendirme Yöntemleri

Çevremizdeki çeşitli kimyasal maddeler, çeşitli canlılardaki hücre DNA'sının yapısını bozarak genotoksisiteye bağlı karsinojen etkilere neden olmaktadır. Genotoksik etki, etkilenen hücre tipine göre değerlendirilir. Gamet hücrelerinde oluşan genotoksik etki kalıtsal özelliktedir ve sonraki nesillere aktarılabilir. Somatik hücrelerdeki genotoksik etki ise etkilenen birey ile sınırlı kalır ve kalıtsal özellik göstermez.

Genotoksisite mekanizmasının aydınlatılması ve genotoksisite saptanması için çeşitli test sistemlerinin geliştirilmesi ve genotoksisitenin insanlar için oluşturduğu kalıtsal hastalık ve kanser riskinin azaltılması için yapılan çalışmalar toksikoloji'nin en önemli çalışma alanlarından birini oluşturmaktadır. 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. (25-36)

Genotoksisite, gen hücreleri üzerindeki etkilerine göre sitotoksik, sitostatik ve mutajenik etkenler olmak üzere sınıflandırılabilir. Sitotoksik maddeler, hücreleri anoksi, protein koagülasyonu veya membran permeabilitesinin artmasına neden olarak öldürürler. Sitostatik etki ise, daha çok kromozom yapısı ve sayısındaki değişimleri gösterir. Genlerdeki DNA üzerindeki değişimler ise "nokta mutasyonu" veya "gen lokus mutasyonu" olarak isimlendirilir. Genlerdeki nokta mutasyonuna neden olan "mutajenik etkenler" virüsler, fiziksel etkenler ve kimyasal maddeler olabilir.

Genotoksisite, DNA'da yapısal değişiklikler oluşturarak, ya da DNA sarmalında kırılmalara yol açarak meydana getirilen mutasyonlardır. Genel anlamıyla genotoksisite hücre DNA'sında hasara yol açabilen her türlü ajan için kullanılabilen bir terimdir. Esasen DNA yapısında değişiklikler oluşturabilen ya da kırıklara neden olabilen çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanların bu yolla oluşturdukları hücrel disfonksiyonları kapsar. Bu mutasyonlar sıklıkla kanser gibi çeşitli bozukluk ve hastalıklara eşlik eder. Mutasyonun bir toksisite türü olarak algılanması kimyasallara veya radyasyona normalden daha fazla dozda ve çeşitlilikte yoğun bir şekilde maruz kalınması ve DNA ile etkileşme sonucu gerçekleşir. Bu yönüyle mutasyon, genotoksik etki olarak da adlandırılabilir (38,139). Genotoksik etki iki kategoride sınıflandırılabilir(38,40)

1. Mikrolezyonlar

- Baz çifti değişimi
- Çerçeve kayması

2. Makrolezyonlar

- Sayısal makrolezyonlar
- Yapısal makrolezyonlar

Mutajenlerin ve karsinojenlerin oluşturduğu DNA hasarının saptanmasında geliştirilen kısa süreli yöntemler arasında Sister Cromatid Exchange (SCE- Kardeş Kromozom Değişimi), Kromozom aberasyonu, Comet Assay, Mikronükleus testi, UMU test, SOS test, Ames testi gibi testler yer almaktadır. İnsan kromozomlarını daha yakından tanıyabilme ve birbirinden 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 (35,36,41).

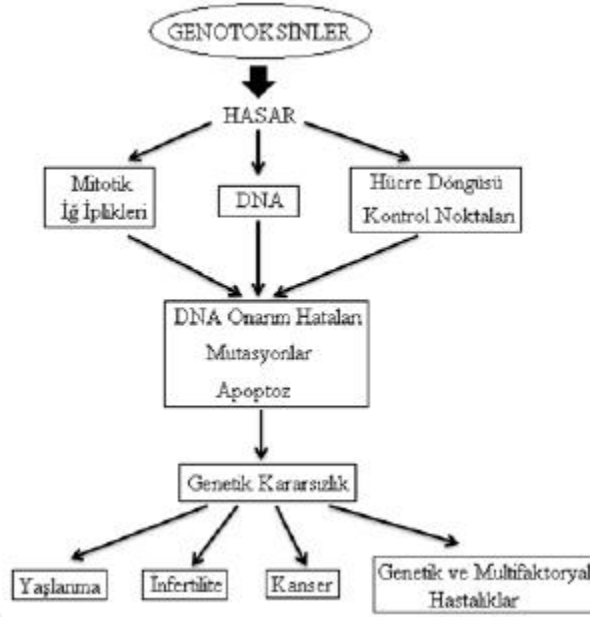
Genotoksisiteye bağlı hastalıkların veya maruziyetin değerlendirilmesinde uygun biyogösterge kullanımı, sonuçların doğru yorumlanması bakımından hayati önem arz eder. Biyogöstergeler deneysel ve epidemiyolojik araştırmalar ile saptanabilen biyomoleküler değişiklikler arasında bağ kurmada yardımcı olan 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 metotlar kullanılarak yapılan çalışmalar genellikle etkene maruziyetin uzun dönemli sonuçlarını tespit etmek ya da değerlendirmek konusunda yardımcı olurken, moleküler epidemiyolojik teknikler ise, hastalık 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 kanser oluşum ve tespit sürecini incelemede yaygın olarak yararlanılan bir uğraş alanıdır (30,35,41-43).

Genotoksisite kimyasal fiziksel veya biyolojik ajanın genetik materyalde hasar oluşturabilme özelliği olarak tanımlanabilir. Bir ajanın genotoksisitesi birçok değişik hastalıkla sonuçlanabilir, ancak kanser en sık rastlanılanıdır. Birçok insan karsinogeninin genotoksik olduğu, sağlam verilere dayanmaktadır. Bundan dolayı kimyasal genotoksisite ve karsinogenesis arasındaki ilişki iyi bağdaştırılmıştır ve genotoksisitenin, kanser oluşumunu başlatan en önemli mekanizma olduğuna inanılmaktadır.

Genotoksisite ve karsinogenisite arasında çok yakın bir ilişkinin ve genotoksik testlerin karsinogenleri tespit etmede etkinliğinin olması, genotoksisite araştırmalarının gerekliliğini ortaya koymaktadır (44).

DNA molekülündeki kalıtsal değişme, gen mutasyonuna neden olmaktadır. Bireyin yapı, fonksiyon ve gelişmesi ile ilgili tüm genetik şifre DNA molekülü üzerinde işaretlenmiştir. Genetik kodda herhangi bir nedenle olan değişme, DNA replikasyonu sırasında diğer moleküllere de geçecektir (44).



Şekil-3: Genotoksik maddelerin yol açtığı moleküler değişimler (44).

DNA mutasyonlarına neden olan kimyasal maddeler dört ana grup oluştururlar:

1. Baz analogları; standart bazlara (adenin, timin, guanin, sitozin) benzerler fakat baz eşleşmesini tam yapamazlar (5-bromo urasil).

2. Alkilleyici ajanlar; bazı alkil gruplarını ekler ve böylece baz eşleşmesinin doğru olarak yapılmasına engel olurlar (nitrojen mustard, etil metan sülfat).

3. İnterkalasyon ajanlar; DNA molekülüne eklemeler yaparak yapısını bozarlar (akrolin boyaları, proflavin, akridin, etidyum bromid).

4. Diğer ajanlar; DNA molekülüne doğrudan etkiyen ajanlardır (hidroksilamin). X ışınları nadiren nokta mutasyonuna yol açarken sıklıkla kromozom kırıklarına da neden olurlar. Hasarlanmış DNA molekülünde onarım yapan deaminasyon, depürinasyon gibi bir mekanizma olmasa DNA molekülü çok kısa zamanda işlevsiz hale gelir.

3.4. Kanser Gelişiminde Rol Oynayan Risk Faktörleri

Birçok bireysel ve çevresel faktör kanser gelişim riskini artırır. Ancak karsinojenlere maruz kalan veya diğer risk faktörlerini taşıyan her insanda kanser gelişmez (44-49).

3.4.1. Genetik Faktörler

Genetik faktörlere bağılı olarak bazı ailelerde kanser gelişme riski daha yüksektir. Bu risk bazı durumlarda tek bir gendeki değişime bağılı iken, bazı durumlarda ise birkaç genin etkileşimine bağılı olarak ortaya çıkar.

Kromozom aberasyonları da kanser gelişim riskini artırır. Örneğın 21. kromozomdaki aberasyona bağılı olarak gelişen Down sendromlu kişilerde akut lösemi gelişim riski 12-20 kat daha fazladır (44-49).

3.4.2. Yaş

Retinoblastoma ve nöroblastoma gibi bazı tümörler çocuklarda görülür. Ancak kanserlerin büyük bir kısmı ileri yaşlarda ortaya çıkar (44-49).

3.4.3. Çevresel Faktörler

Sigara dumanı, hava kirliliğı, çalışma ortamında maruz kalınan kimyasal maddeler radyasyon gibi birçok çevresel faktör gelişim riskini artırır (44-49).

3.4.4. Coğrafi Faktörler

Coğrafi faktörlerin kanser riskini neden artırdığı çok anlaşılamamış olmakla birlikte, insanın yaşadığı coğrafya kanser riskini arttıran bir faktördür. Örneğın Japonya'da yaşayan Japonlarda kolon ve göğüs kanseri gelişme riski düşük iken Amerika'ya göç etmiş Japonlarda risk diğer Amerikalılar düzeyindedir (44-49).

3.4.5. Beslenme

Besinlerle alınan maddeler kanser riskini arttırabilir. Örneğın fazla yağlı beslenme kolon, göğüs ve muhtemelen prostat kanseri gelişim riskini arttırır. Aşırı alkol tüketenlerde özefageal kanser gelişme riski yüksektir. Mangalda pişirilmiş etler veya dumana maruz kalmış yiyecekler mide kanseri gelişim riskini arttırmaktadır (44-49).

3.4.6. İlaçlar ve Medikal Tedaviler

Bazı ilaçlar ve medikal tedavi yöntemleri kanser gelişim riskini arttırabilir. Örneğin oral kontraseptifler göğüs kanseri gelişimini arttırır, ancak bu risk zamanla azalır. Menapoz döneminde verilen östrojen ve progestin hormonları da göğüs kanseri riskini arttırır. Antikanser ilaçlarla ve radyasyonla kanser tedavisi yapılan insanlarda yıllar sonra bu tedavilere bağlı ikinci bir kanser gelişme riski vardır (44-49).

3.4.7. İnfeksiyonlar

Birçok virüsün insanlarda kanser gelişimine neden olduğu bilinmektedir ve daha birçok virüsünde kansere neden olabileceği düşünülmektedir. İnsan papilloma virüsü (HPV) kadınlarda rahim ağzı kanserine neden olur. Hepatit B ve C virüsleri karaciğer kanserine yol açar. Mide ülserine yol açan Helicobacter pylori mide kanseri ve lenfoma gelişim riskini arttır. Scbistosoma baematobium paraziti idrar kesesi kanserine rol açabilir. Opisorcbis sinensis paraziti ise pankreas ve safra yolu kanserine neden olabilmektedir (44-49).

3.4.8. İnflamatuvar Hastalıklar

İnflamatuvar bozukluklar genetik değişikliklere neden olabilen önemli faktörlerdendir. Örneğin ülseratif kolit kolon kanseri gelişimine neden olabilir. Özellikle bitki üretiminde kullanılır. Hayvanlarda ise letal mutasyona yol açar (44-49).

3.5. Genotoksisitenin Karsinojenezisle İlişkisi

Bir maddenin genotoksik potansiyeli mutajenik kapasitesi ile yakından ilgilidir. Karsinojenezis başlangıcında DNA en son hedef olarak kabul edilmektedir.

Son yıllarda, karsinojenik olan birçok maddelerin genotoksik; benzeri şekilde genotoksik olan birçok maddelerin de karsinojenik olduğu gösterilmiştir. Kimyasal maddelerin genotoksik etkileri ile karsinojenik potansiyelleri arasındaki bu kuvvetli ilişkinin olması, genotoksisite testlerinin, kimyasal maddelerin karsinojenik risklerinin araştırılmasında, tarama testleri olarak kullanılması, sonucu doğurmuştur. Kimyasal maddelerin kanser oluşturmasında;

- Mutasyon ve DNA onarımı yanı sıra, ikinci bir etkenin hücresel çoğalmayı uyarması,

- T lenfositlerinin baskılanması sonucunda bu T lenfositlerinin vücutta doğal olarak gelişen kanser hücrelerini yok etme fonksiyonlarının bozulması,
- Normal hücre çoğalmasına katkıda bulunan büyüme faktörlerinin ve mitozda rol oynayan diğer etkenlerin sentezini kontrol eden genlerin aktive edilmesi gibi mekanizmalar rol oynar.

3.6. Genotoksik Kimyasal Maddelerin Taranması ve İnsan Sağlığı Açısından Değerlendirilmeleri

Kimyasal maddelerin insanda neden olabileceği genotoksisitesi, kantitatif olarak değerlendirmek çok güçtür. Gerçekte herhangi bir kimyasal maddenin insanda genetik defekt oluşturabileceği henüz gösterilememiştir. Radyasyonun (kuvvetli fiziksel mutajen) bile ancak hayvanlarda genotoksik olduğu gözlenmiştir. Diğer taraftan kimyasal bir maddenin veya radyasyonun genotoksik etkisi varsa bile maruz kalan kişide değil, hatta yavrusunda da görülmeyebilir. Ancak ressesif (çekinik) bir alelin, nesiller sonra ortaya çıkma olasılığı vardır.

Bugün çevremizdeki çok çeşitli kimyasal maddelerin küçük miktarları genotoksik veya karsinojen olabilir. Ayrıca endüstride çalışanlar birçok organik kimyasal maddelere maruz kalmaktadır. Bugün bu maddelerin genetik açıdan zararlarını değerlendirmek henüz mümkün değildir. İnsanlar arasında, genetik defektlerin de gün geçtikçe artması tıpta gittikçe önem kazanmaktadır. 2000'den fazla genetik hastalık bilinmektedir. Oldukça yüksek insidanslı bu genetik defekt veya hastalıklar daha çok spontan (kendiliğinden oluşan) mutasyonlara bağlanmaktadır. Ancak çevremizde devamlı maruz kalınan ve aşağı sınıf hayvanlarda mutajen olan bir dış kaynaklı kimyasal maddelerin de etkisi olabileceği çok muhtemeldir. Bu konudaki çalışmaların ilerlemesi ile insanlara yorumlanabilmesi yapılacaktır.

Somatik hücrelerde mutasyon oluşması kanser olayı ile sonuçlanır. Döllenme hücrelerindeki genotoksik değişimler ise insan neslini, ilgilendirdiği için daha ciddi sonuçlar doğurur. Döllenme hücrelerindeki letal ve dominant bir mutasyon düşüklere neden olurken, letal olmayan bir mutasyon ise daha sonraki nesillere geçerek bireylerde istenmeyen fenotipler şeklinde ortaya çıkmasına neden olabilir. İnsanların mutajenlere maruz kalması ile etkileri arasında uzun bir süre vardır. genotoksisite sonucu oluşabilen karsinogenezis için latent bir dönem vardır. Genotoksisite sonucu oluşacak diğer etkilerin ise daha sonraki nesillerde görülmesi ise daha uzun süreyi gerektirir.

Kimyasal maddelerin insan üzerindeki etkilerini değerlendirmede, çevrede doğal olarak oluşan fiziksel ve kimyasal genotoksik maddeleride tanımak gerekir. Radyasyon günlük yaşantıda karşılaştığımız önemli bir fiziksel genotoksiktir, güneş ışığı başlıca kaynaktır. Kimyasal maddelerin tam yanmaması ile oluşan benzo (a) piren gibi genotoksikler, besinlerin islenmesi veya pişirilmesi sırasında, suların klorlanması sonucu birçok kimyasal genotoksisitelerin oluştuğu gösterilmiştir. Bugün endüstride üretilen kimyasal maddelerin sayısı 60 000 'ı geçmiştir. Her yıl da 1000-2000 tanesi bu sayıya eklenmektedir. Böylece gerek günlük kullanımdaki bu kimyasal maddeler ve gerekse çevrede oluşan diğer maddelerin toksikolojik etkilerini bilmek gerekir. Bu nedenle de toksikolojik profil analizlerini yaparak, potent advers etkileri olanların üzerinde daha çok durulmalıdır. Özellikle kimyasal genotoksiklerin tanınmasında çabuk, pahalı olmayan tarama testlerine gereksinim vardır.

Organik Yapılı Maddeler		İnorganik Maddeler
PAHlar	Nitrozaminler	Arsenik
Benzantrazen türevleri	N-nitrozonomikotin	Krom
Medikolantrren	Alkil nitrozaminler	Kadmiyum
Benzo(a)piren	Nitrozopiperidin	Nikel
Krizen	Dimetilnitrozamin	Berilyum
Perilen	Azo boyaları	Kobalt
Poliklorlu bifeniller (PCB)	Dimetilaminoazobenzen	Demir
Aromatik Aminler	o-Aminozotoluen	Kurşun
Anilin	Alkilleiyici Ajanlar	Titanyum
Benzidin	Antikanser ilaçlar	inko
2-Naftilamin	Mustard gazı	
Toluen-2,4-diamin	Doğal Bileşikler	
o-Toluidin	Pirolizidin alkaloidleri	
2-Antramin	Aflatoksinler	
Sakarin	Serbest Radikaller	

şekil-4: Bazı nemli Genotoksik Kimyasal Karsinojenler (47).

4.GENOTOKSİK ETKİNİN BELİRLENMESİNDE BİYOGÖSTERGELER

Biyogösterge, ksantobiyotiklerin hücresel ya da biyokimyasal oluşumların yapılarında ya da fonksiyonlarında oluşturduğu ve biyolojik sistemde ya da örnekte ölçülebilen değişikliklerdir. Biyogöstergeler biyokimyasal ve moleküler değişimleri yansıttıklarından deneysel ve epidemiyolojik çalışmalar arasındaki boşluğu dolduran bir köprü görevi görürler. Genotoksik kimyasal maddeler ile teması olan kişilerde genotoksik riskin belirlenmesinde biyogöstergeler oldukça yararlıdır (50).

İnsan verileri kullanıldığında karsinojenite için güçlü kanıtlar sağlayan epidemiyolojik çalışmalar, bazen incelenen ajan ile etki arasındaki veri eksikliklerinden kaynaklanan “yanlış negatif sonuçlar” verebilirler. Bu durumun nedenleri olarak etkinin belirlenmesinde karşılaşılan güçlükler, maruz ve kontrol grubunun uygun seçilmemesi ve etkinin ortaya çıkabilmesi için uzun süreye gereksinim olması sayılabilir. Halbuki moleküler yöntemler sayesinde hastalık ortaya çıkmadan risk değerlendirilmesinin yapılabilmesi olasıdır.

Biyo göstergeler; maruz kalmanın biyo göstergeleri, duyarlılığın biyo göstergeleri ve etkinin biyo göstergeleri olarak sınıflandırılabilir. Maruz kalmanın biyo göstergeleri bir ksantobiyotik ya da metabolitin ya da ksantobiyotik ile hedef molekül/hücre arasındaki etkileşim sonucunda oluşan ürünlerin bir organizmada ölçülmesini içerir. Genel olarak maruziyetin göstergeleri bir birey tarafından alınan dozun belirlenmesini ve bu dozun herhangi bir hastalığın oluşmasına neden olan değişikliklerle ilişkisini kavramak için kullanılır.

Duyarlılığın biyo göstergeleri, genetik özelliklerden ya da diğer yatkınlıklardan kaynaklanan ve genel popülasyona göre daha büyük risk altında olmasına neden olan bireylerin belirlenmesinde kullanılır. Bu biyo göstergeler, kimyasal maddelerin aktivasyonunda ya da detoksifikasyonunda yer alan enzimlerin aktivitelerini ya da bazı DNA hasarları için onarım kapasitesini içerebilir. Etkinin biyogöstergeleri ise bir organizmada meydana gelen ve şiddetine bağlı olarak potansiyel bir hastalığın habercisi kabul edilen ölçülebilir biyokimyasal, fizyolojik ve diğer değişikliklerdir. Etkinin biyo göstergeleri toksisitenin, karsinogenezisin ya da hastalığın oluşundaki erken etkileri belirleyebilmemizi sağlar (51).

Kanser oluşumunda genotoksik hasarın en önemli faktör olduğu bilindiğinden risk grubundaki farklı DNA hasarları kontrol grubu ile karşılaştırılır. Bu amaçla uygulanabilen pek

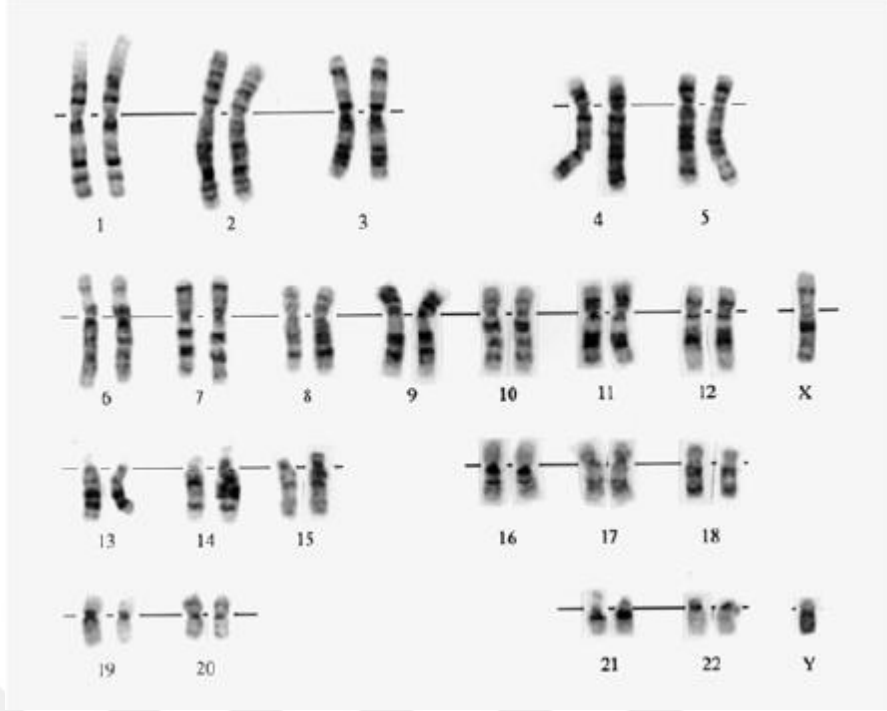
çok genotoksisite testi bilinmektedir. Bu testler, genotoksik ajanlara maruz kalmayla oluşan riskin belirlenmesinde kullanılan sitogenetik biyogöstergelerdir.

Genetik sistemler ile genotoksisite testi edilmek istenen maddelerin karsinojenik ve genotoksik potansiyelleri arasında ilişki kurulmasını sağlayan ve en yaygın olarak kullanılan standart in vitro ve in vivo genotoksisite testleri; Kromozom aberasyonları testi, Comet Assay testi, Ames testi, Kardeş Kromatit değişimi testi ve Mikronükleus testidir.

4.1. Kromozomal Aberasyon

Kromozomal aberasyonlar, genotoksisite çalışmalarının validasyonu için geliştirilmiş yöntemlerden birisidir. Bu yöntemin sonuçlarının dikkate alınması kanser riskinin erken tanısına yardımcı olabilir. Teknik tüm genomdaki hasarın izlenmesine imkan tanınması ve maruziyetin değerlendirilmesinde büyük ölçüde uluslararası geçerli standartlara erişmiş olması bakımından önemlidir. Karl Sax tarafından 1930 yılında somatik hücrelerdeki mutasyonun kansere neden olabileceği belirtilmiştir. Bu tespitin ardından mutojenezin yol açtığı sorunlar ayrıntılı olarak araştırılmaya çalışılmıştır. Etkene maruziyetin kromozomal anomaliye yol açma riskinin saptanmasında, kimyasalların klastojenik aktivitesinin değerlendirilmesinde ve biyo gösterge çalışmalarında kromozomlarda görülen değişiklikler oldukça önemlidir (29,52,53,54). Nitekim Hagmar L. ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarda yüksek sıklıkta kromozomal aberasyonlu kişilerde kanser gelişme riskinin daha fazla olması arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (55).

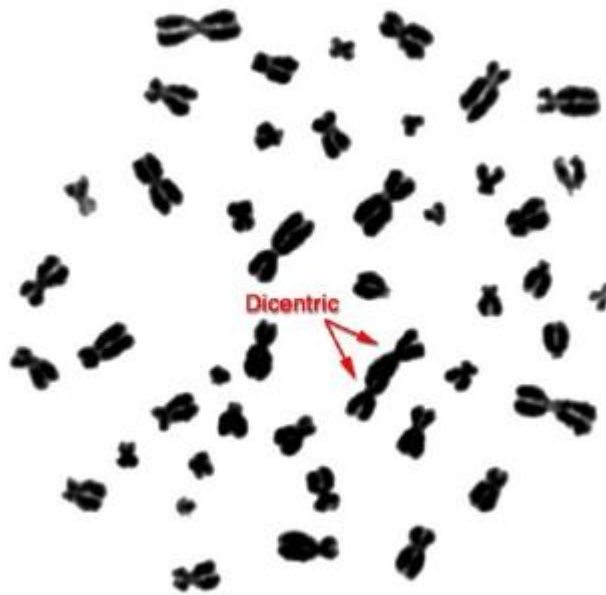
Kültüre alınmış periferik kan lenfositlerindeki kromozomal aberasyon sıklığının incelenmesi ve genotoksik hasarın boyutunun tespiti, kromozomların en rahat gözlenebildiği metafaz evresinde yapılır. Bu aşamada hücrelerin tutulabilmesi için hücre kültürüne kolsemid eklenir ve kromozomlardaki makrolezyonlar ve yapısal kromozomal değişiklikler değerlendirilebilir.



Şekil: Normal İnsan kromozomu (55).

En sık rastlanan kromozomal aberasyonların; kromatid açıklığı (gap) kromatid kırığı (break), asentrik ve disentrik fragment, ring kromozom, kromatid değişimi, inversiyonlar ve translokasyon şeklinde olduğu söylenebilir DNA sarmal kırılmaları veya baz değişiklikleri onarım kusurlarına bağlı olarak kromozomlarda görülen primer hasarlardır. DNA kırılmaları tek sarmalı veya birbirini tamamlayan çift sarmalı aynı anda etkileyebilir (54,56).

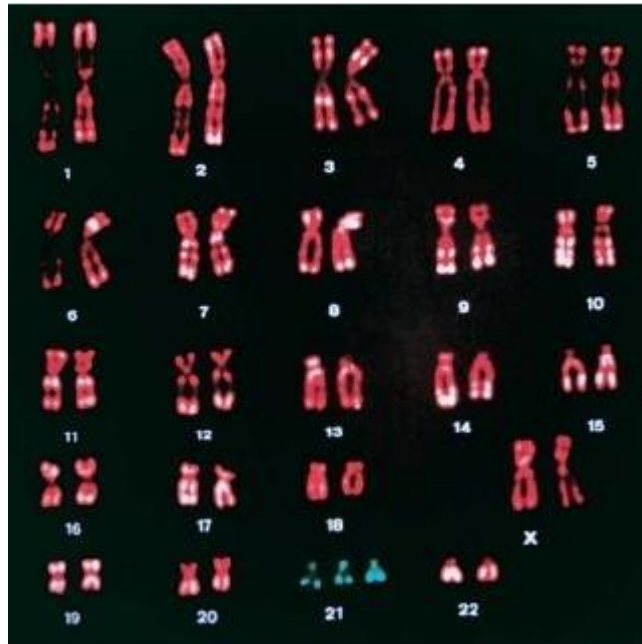
Kromozomlara katılma, eksilme veya farklı sıralama sonucu oluşan ve ışık mikroskopu ile görülen lezyonlara "klastojenezis" denir.



Şekil: Didentrik Kromozom (55).

Kromozomda DNA kaybı sonucu olduğu düşünölen boşlukların (akromatid lezyonlar) boyutu değışebilir. Kromatid uçlarının kırılması ile oluşan kırılmalar yer değıştirir ve halen metafaz dönemini kapsar. Bloom sendromu ve Fanconi anemisi gibi genetik hastalıklar kromozom kırılmaları ile ilgilidir. Ancak bu kırılmaların mı hastalığa neden olduğu, yoksa hastalığın semptomu olarak mı ortaya çıkan mekanizmalar olduğu belli değildir.

İyonizasyon radyasyonu, alkilendirici etkenler gibi birçok kimyasal maddelerin kromozom kırılmalarına neden olduğu gösterilmiştir. Kromozom kırılmalarının düzensiz ve yanlış kaynaması (birleşmesi.) sonucu olan değışmelere "kromozomal mutasyonlar" denir. Bu değışmeler, başlıca çıkartma, yer değıştirme, ikiye katlatma veya ters dönme şeklinde olabilir. Kromozomların eşitsiz bölünmeleri ve sonuçta hücredeki kromozom sayısının normale göre artması veya eksilmesi ile birçok anomaliler görülür. Birçok genetik hastalıklar kromozomların düzensiz bölünmeleri sonucudur. Örneğin Down sendromu (mongolizm) kromozom 21'in trisomisi ile ilgili; yani kromozom 21'in 2 yerine 3 tane olması), Klinefelter sendromu (XXY cinsiyet kromozomu konsitütasyonu; 47 kromozom) ve Turner sendromu (XO cinsiyet kromozomu konsitütasyonu; 45 kromozom) gibi genetik hastalıklar anormal çocukların doğumuna neden olur.



Şekil: Down sendromu (54).

Bazı kimyasal maddelerin poliploid'i (temel haploid sayılarının katlan) indükledikleri gösterilmiştir. Örneğin kolisin spesifik bir "spindle" zehirdir. Spindle protein tubiline bağlanarak polimerizasyonu inhibe eder. Böylece kolisin mitozis olayını metafaz safhasında durdurur, kromozom materyali ağırlıkça ikiye katlanır ve sonuçta "poliploid" hücre oluşur. Vinca alkaloidleri (vincristine ve vinblastin) de kolşisin gibi poliploidi indükler.

4.2. Comet Assay Tekniği (Single Cell Gel Electrophoresis Technique) ve Kullanım Alanları

İnsan popülasyonlarının genetik bütünlüğü, kimyasal ve fiziksel genotoksinlere maruz kalmayla sonuçlanan endüstriyel etkinliklerden dolayı giderek artan bir tehdit altındadır. Genetik hasarı etkileyen diğer faktörler ise yaşam biçimi, çeşitli ilaçlarla uygulanan tedaviler ve iklim değişiklikleridir. Genlere hasar veren ajanların etkilerini ortaya koymak için kolay test yöntemleri aranmıştır. Sitogenetik yöntemler mutajenik ve karsinojenik bileşiklere maruz kalan toplulukların biyolojik izlenmesinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Metabolizma ürünleri mutajen ve karsinojen olabileceğinden ayrıca çeşitli örneklerde biyotransformasyonları farklı olduğundan inhalasyon ajanları veya diğer potansiyel mutajenik ajanlar için kullanılacak testler insan hücrelerinin analizi şeklinde olmalıdır (57).

Biyoizleme çalışmalarında giderek artan şekilde sitolojik yöntemler kullanılmaktadır. İnsan çalışmalarında sitogenetik olarak gelinen son aşamalardan biri de insan lenfositlerinin incelenmesidir (59,60).

DNA hasarını araştırmada insan hücrelerinin kullanıldığı testlerden en sık başvuru olan Sister Chromatid Exchange (SCE) ve Microgel Electrophoresis (MGE) olarak da adlandırılan Comet Assay yöntemidir. Bu yöntemlerle DNA sarmal kırıklarının saptanması hassas, hızlı ve güvenilir bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir (60,63). Genotoksik taramalarda comet yöntemi giderek daha fazla kabul görmektedir. Comet yönteminin, yaşlanmadan, genetik toksikoloji ve moleküler epidemiyolojiye kadar pek çok toksikoloji alanında uygulamaları vardır (60).

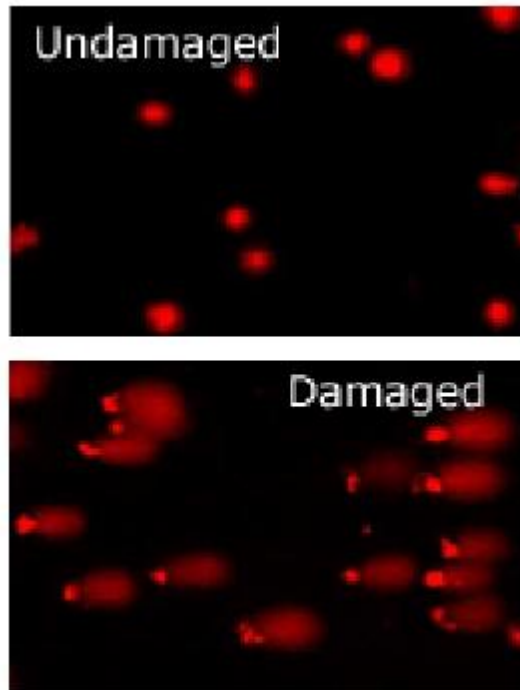
DNA kırıklarının tayini prensibine dayanan bu yöntem, pek çok fiziksel ve kimyasal mutajenin özellikle insanlarda yol açtığı DNA hasarının tayininde, kanser hastalarında DNA hasarının derecesini ve tamirini tespit etmede, bazı kalıtsal hastalıkların prenatal tanısında, bazı hastalıklarda artmış DNA hasarını belirlemede kullanılan bir biyoizlem testidir (61,62,79).

Comet yöntemi aşağıda belirtilen avantajlara sahiptir (63,64,65);

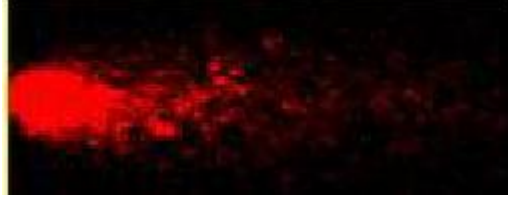
- Değişik hücre ve doku gruplarına uygulanabilir.
- Hızlı bir yöntemdir, çabuk sonuç alınır.
- Hassas ve güvenilir bir yöntemdir.
- Hücrelerdeki DNA kırıklarını görsel olarak ortaya koyar.
- Maliyeti düşüktür.
- Araç-gereç gereksinimi azdır.

Comet yöntemi, alkali pH'da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde göre, hücreler veya çekirdekçikler öncelikle agarozta yerleştirilmekte, daha sonra lizis ve alkali elektroforez tamponunda yürütme ve nötralizasyon işlemlerinden geçirilerek floresan boya ile boyanmaktadır.

Floresan mikroskop ile incelenen preparatlarda zarar görmemiş DNA'lar comet (kuyruk) oluşturmazken, hasar görmüş DNA moleküllerindeki fragmentler farklı moleküler ağırlıklarına ve farklı elektrik yüklerine sahip olacaklarından elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek çekirdekten dışarı doğru göç etmekte ve kuyruklu yıldız görünümü oluşturmaktadırlar (Şekil 5a ve Şekil 5b).



Şekil-5a: Comet yöntemi ile hasarlı, az hasarlı ve hasarsız hücre örnekleri (63).



Şekil -5b: Comet yöntemi ile “hasarlı” hücre örneği (63).

Bu görünüm nedeniyle bu tekniğe "Comet" adı verilmiştir. Comet testi ile DNA hasarının kantitatif olarak saptanmasında; kuyruk momenti, kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu gibi parametreler kullanılmaktadır.

İlk defa 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından DNA sarmal kırıklarının ölçülmesi amacıyla kurulan, daha sonra 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından geliştirilen teknik nötral pH'daki lysing şartlarında uygulanarak DNA çift sarmal kırıklarını tayin etmede kullanılmıştır. 1988 yılında Singh ve arkadaşları tarafından protokolda birtakım değişiklikler yapılarak yöntem alkali lysing koşullarında uygulanmıştır. Singh ve arkadaşlarının *comet* yöntemi protokolü bugün küçük değişikliklerle dünya genelinde en yaygın kullanılan protokoldür. Yöntemin en önemli avantajlarından bir tanesi de çok çeşitli hücre tiplerinde çalışma olanağı sağlamasıdır (30,31,66).

Comet yönteminde hücreler izole edildikten sonra agar içine gömülerek mikroskopik lamlara yayılırlar. Lysing aşamasından sonra elektroforeze bırakılıp floresan boya ile boyanmak suretiyle değerlendirilirler. Comet tekniği ile DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde gözle değerlendirmenin yanı sıra kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesi en yaygın kullanılan parametrelerdir. Kuyruktaki DNA yüzdesinin belirlenmesi ve sonuçların gözle değerlendirilmesi diğer parametrelere göre doz cevap ilişkisini daha iyi yansıtması sebebiyle tercih edilmektedir (30,41,66).

4.2.1. Comet Yönteminde DNA Hasarının Değerlendirilmesi

Comet yönteminde hasarsız hücrelerin (lenfosit) incelemesinde yuvarlak, kenarları daha az yoğun olmak üzere ortası parlak bir ışık görünümü (çekirdek) vardır. Bu hücrelerin görünümü nonmigration (NM) olarak değerlendirilir. Eğer DNA hasarı oluşmaya başlamışsa, normalde düzgün kenarlı olan görüntü DNA kırıklarının çekirdek dışına göçünün de başlaması nedeni ile düzensiz kenarlı bir görünüm alır (strech ya da yeni adı ile low migration). Hasar arttıkça lenfositler kuyruklu yıldız (comethigh migration) şeklini alırlar. Son aşama ise

apoptozistir. Hasarın şiddetine göre merkezden kenara doğru uzama olur. Bu comet (kuyruk) uzunluğu hasar ile doğrudan ilişkilidir. Ayrıca kuyruktaki floresan yoğunluğu da hasarın derecesi ile paralellik gösterir (64).

Comet yönteminde lamların değerlendirilmesi comet görüntü analiz sistemi (comet software) ile yapılabileceği gibi gözle değerlendirme gibi farklı yöntemlerden de yararlanılabilmektedir.

Gözle değerlendirmede hücreler hasarlı ve hasarsız olarak ayrılırlar. Hasarlı hücreler ise hasar seviyelerine göre farklı kategorilere ayrılabilir. Bazı çalışmalarda hücreler; hasarsız, az hasarlı ve çok hasarlı olarak üç sınıfa ayrılabilirdiği gibi, Kobayashi ve arkadaşları hücreleri daha detaylı bir şekilde değerlendirerek 5 kategoriye ayırmışlardır. Ayrıca mikroskobun okülerine yerleştirilen mikron seviyesinde ölçüm yapabilen bir cetvelden de yararlanılabilir (44). Gözle değerlendirme; 5 dakikada 1 000 hücre sayılabilecek kadar hızlı olduğundan ve bilgisayar programı gerektirmediğinden ucuz ve kolay bir yöntemdir. Bu konuda yapılan değerlendirmeler, gözle değerlendirmenin software kullanımı kadar etkili ve kullanılabilir olduğunu göstermektedir (67).

Hasarın değerlendirilmesinde “Tail Moment” denilen bir başka ölçüm yönteminden de yararlanılmaktadır. “Tail Moment” kuyruk uzunluğu ve kuyruk içindeki toplam DNA oranı olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemde “Tail Moment” kuyruktaki DNA yoğunluğunu göstermektedir (64).

Comet yöntemi pek çok tipte memeli hücrelerinde çeşitli ajanların indüklediği DNA hasarı ve onarım bozukluğunun saptanmasını amaçlayan in vivo ve in vitro çalışmalarda kullanılmaktadır.

DNA kırıklarının saptanması ilkesine dayanan bu yöntem, pek çok DNA hasarının ve onarımının saptanmasında biyoizlem çalışmalarında ve genetik toksikolojide yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA hasarının indüklediği çalışmalar, comet yöntemi ile çeşitli hücre tiplerinde ve hedef organlardan alınan hücrelerde yapılabilmektedir. Comet yöntemi, duyarlılığı ve DNA hasarını tek hücre seviyesinde ölçmeye olanak sağlaması nedeniyle genotoksik etkisi merak edilen bileşiklerin toksisitelerini hızlı olarak önceden belirlemede kullanılan bir yöntem olmuştur. Bu yöntem aynı zamanda DNA onarımının belirlenmesini amaçlayan çalışmalarda da

uygulanmaktadır. Bu amaçla Gedik ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, hücreler önce DNA hasarı oluşturan kimyasal maddeye maruz bırakılmış daha sonra da onarım basamağı inhibe edilerek, onarımı gerçekleşemeyen bölgelerde oluşan kırıklar aracılığı ile hücresel onarım kapasitesi hakkında bilgi edinilmiştir (65).

Comet yöntemi, bazı patolojik koşulların ya da kimyasal maddelere terapötik olarak maruz kalmanın ardından oluşan sonuçların araştırılması amacıyla pek çok klinik çalışmaya uygulanmıştır. Bu çalışmaların sonucunda; kötü beslenme, parazitik enfeksiyonlar, diyabet, mesane kanseri, düşük yapma gibi etkenlerin DNA hasarını anlamlı olarak artırdığı bulunmuştur (69,70,71). Ayrıca radyoterapi ya/ya da kemoterapi alan hastalarda, anestezi ilaçlarına maruz kalanlarda, siklofosfamid ve sisplatin alan meme kanseri hastalarında bu yöntem ile anlamlı olarak artmış DNA hasarı saptanmıştır. Comet yöntemi ile yapılan çalışmalar sadece somatik hücrelerle sınırlı kalmamış, infertil olan ve olmayan erkeklerin spermelerinde DNA hasarı araştırıldığında anlamlı bir artış bulunmamıştır (69).

Comet yönteminin düşük hasar seviyelerinde de duyarlı olduğu gösterildikten sonra, mesleki, yaşamsal ve çevresel maruziyetlerin biyoizlenmesinde kullanılmaya başlanmıştır. Pestisitlere, benzene, anestezi gazlarına, radyasyona ve sitirene maruz kalan bireylerde DNA hasarının arttığı gösterilmiştir. Ek olarak sigara içenlerde ve çocuklarda da DNA hasarını belirlemeye yönelik araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Hava kirliliğinin DNA hasarı yapıp yapmadığının araştırıldığı bir çalışmada ise lenfositlerin dışında, bukkal ve nazal epitelyum hücreleri çalışılmıştır (72).

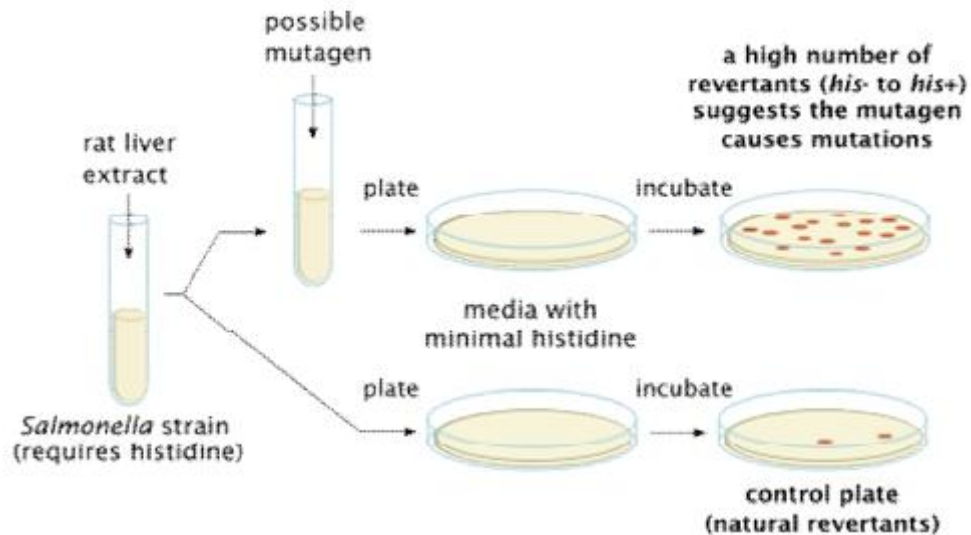
Comet yöntemi ile DNA çapraz bağları da belirlenebilmektedir. Bu amaçla uygulanan yöntemin temel prensibi, DNA çapraz bağ sayısının artması sonucunda, DNA migrasyonunun engellenmesidir. Collins ve arkadaşlarının geliştirdiği bir diğer yöntem ise oksidatif DNA hasarının spesifik enzimler kullanılarak belirlenmesi olmuştur (70). Comet yöntemi; düşük hasar düzeylerini bile saptayabilen duyarlı bir yöntem olması, az miktarda hücre örneği gerektirmesi, her tür ökaryotik hücreye uygulanabilmesi, hızlı, basit ve ucuz olması, kolay uygulanabilir olduğu için geniş popülasyonlara uygulanabilmesi gibi nedenlerle yaygın olarak kullanımı giderek artmaktadır.

4.3. Salmonella/Mikrozom Mutajenite (Ames) Testi

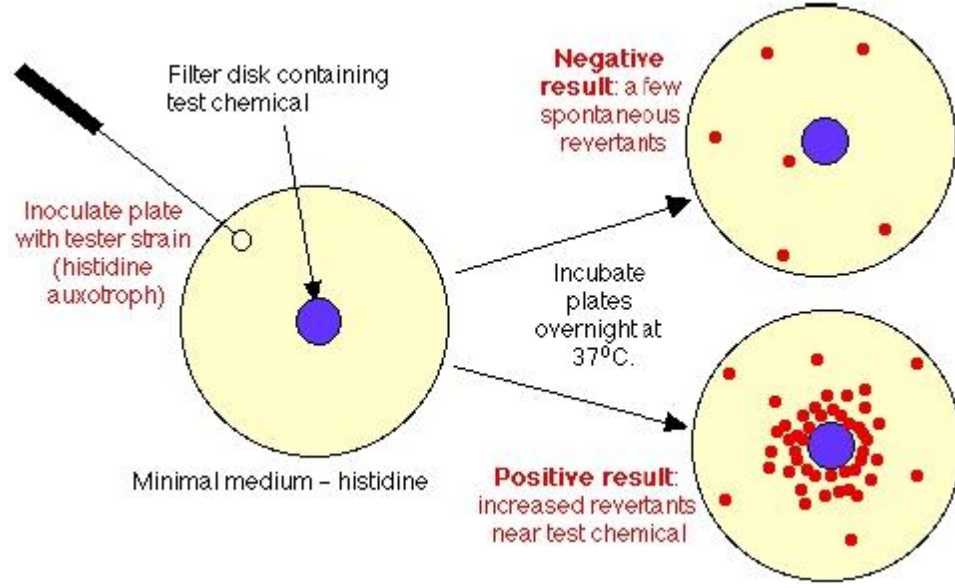
Ames testi olarak da adlandırılan Salmonella/mikrozom mutajenite testi, kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılmasında kullanılan, test parametreleri açısından en iyi standardize edilmiş ve mutajen/karsinojen etkisi en iyi bilinen kimyasallarla geçerliliği en fazla kabul edilmiş bakteriyel test sistemlerinden biridir.

Ayrıca hızlı, ucuz ve uygulanabilirliğinin kolay olması nedeniyle çok yaygın bir kullanım alanına sahiptir. Bu test, insanlarda ve deney hayvanlarında tümör oluşumunda somatik hücrelerin tümör baskılayıcı genlerinde meydana gelen nokta mutasyonların saptanmasında ve kimyasalların DNA ile etkileşimlerini önleyerek mutajenik ve karsinojenik etkilerini ortadan kaldıran antimutajenik ve antikarsinojenik maddelerin tayininde de sıklıkla kullanılmaktadır (73-75).

Ames testinde, histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içeren *Salmonella typhimurium*'un mutant suşları kullanılmaktadır. Bu testin temeli, *S. typhimurium*'un yapay mutasyonla oluşturulmuş olan histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş suşlarının, sitokrom P-450 enzimlerini içeren memeli karaciğer post mitokondriyal süpernatant (S9) varlığında veya yokluğunda, test bileşeni ile muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyon geçirip histidini sentezleyebilen ve histidinden bağımsız ortamda çoğalması esasına dayanır.



Şekil 6: Histidinsiz ortamda üreyebilmelerine yol açan kendiliğinden geri mutasyona uğrayan koloniler sayılarak mutajenite belirlenmektedir (74).



Ortamda pozitif mutajen bir kimyasal madde varsa, geri mutasyonla çoğalan bakteri koloni sayısı istatistiksel olarak anlamlı artmaktadır (73,75-78).

4.4. Kardeş Kromatit Değişimi (KKD) Testi

KKD, kardeş kromatitlerin homolog lokusları arasında DNA replikasyon ürünlerinin simetrik değişimidir ve DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon yoluyla onarılmasını göstermektedir. Ayrıca KKD'ler nokta mutasyonların indüksiyonu, gen amplifikasyonu ve sitotoksosite ile yakından ilişkilidir (79,84). Bu test, çeşitli ajanların mutajenik ve karsinojenik etkilerinin, özellikle kromozomlarda oluşan yapısal değişimlerin araştırılmasında önemli bir yere sahiptir.

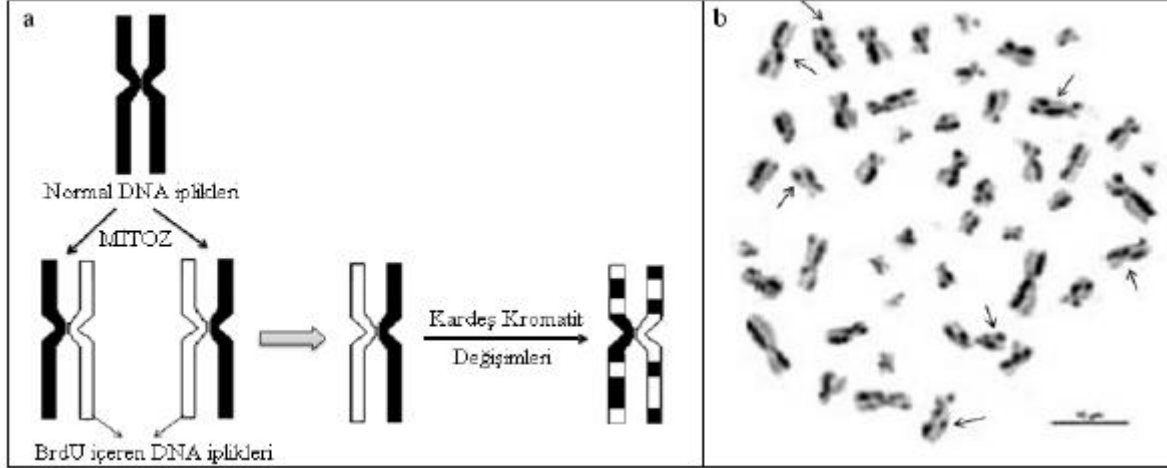
Mutajen ve karsinojen olduğu bilinen maddelere maruz kalan hücrelerde ve kromozom kırılabilirliği ve yatkınlığı ile karakterize edilen çeşitli kalıtsal hastalıklarda KKD frekansının arttığı ve artmış KKD frekansı ile tümör oluşumu arasında lineer bir ilişkinin olduğu saptanmıştır (82,84,85,88,89). KKD testi ile özellikle DNA eklentileri oluşturan veya DNA replikasyonu ile etkileşime giren mutajen bileşikler saptanmaktadır.

KKD testinde, DNA kırıklarını görünür hale getirmek için hücre kültürlerine DNA'da timin analogu gibi davranan Bromodeoksiüridin (BrdU) maddesinin eklenmektedir ve bu maddenin hücre döngüsü sırasında kardeş kromatitlerin arasına girmesi sağlanarak homolog kromozomlardaki DNA parçalarının karşılıklı değişimi gösterilmektedir.

Kültürlerdeki hücreler çoğalırken DNA'ların replikasyonu sırasında yeni sentezlenen polinükleotid ipliğine ortamda bulunan BrdU içeren bromurasil nükleotidleri geçmektedir.

Ultraviyole lambası ile ışınlanmaya maruz bırakıldığında DNA içine yerleşmiş olan BrdU daha açık renkte boyanmış bölgeler olarak görülmektedir (Şekil 7a).

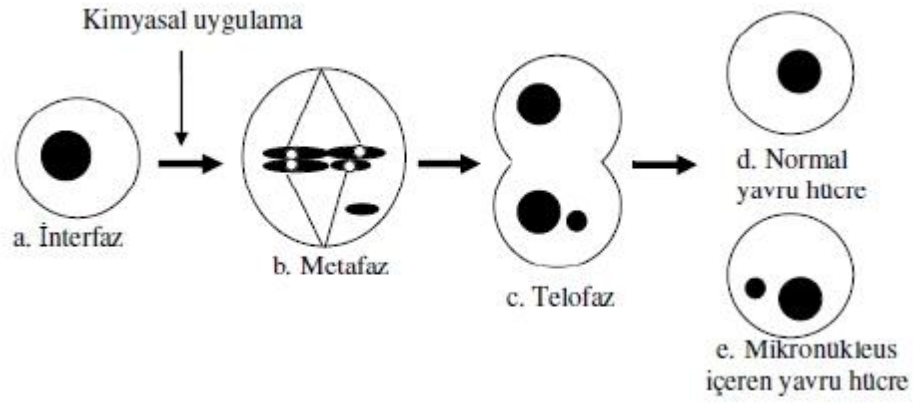
Kromatidlerin farklı boyanmasına neden olan bu boyanma farkı ile DNA'da kardeş kromatidler arasında oluşan değişimler gözlenebilmektedir (Şekil 7b) (81,84,89-91).



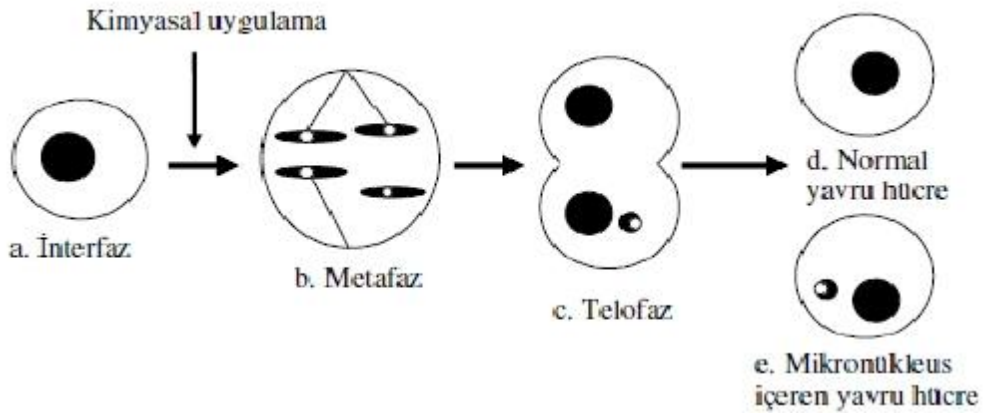
Şekil 7a: Kardeş kromatid değişimleri (81.84) . Şekil 7b: Kromatidler arasında oluşan değişimler (81.84).

4.5. Mikronükleus (MN) Testi

Mikronükleus, asentrik kromozom parçalarının oluşmasına neden olan yapısal kromozom hasarlarından (Şekil 7) veya tam bir kromozom kaybına neden olan mitotik hedeflerdeki hasardan oluşan (Şekil 8), hücrenin ana çekirdeğinden ayrı, büyüklüğü ana çekirdeğin 1/3-1/16'sı arasında değişebilen oluşumlardır. Mikronükleusları oluşturan kromozom parçaları, DNA'da doğrudan çift zincir kırılmaları, tek zincirdeki kırıkların hücre replikasyonundan sonra çift zincir kırıklarına dönüşmesi veya DNA sentezinin inhibisyonu sonucu ortaya çıkabilir. Kromozomdaki kırıkların yanlış tamir edilmesi, bir disentrik kromozom ve bir asentrik kromozom parçasının oluştuğu asimetrik kromozom düzenlenmelerine neden olabilir. Genel olarak bir hücre içinde bir MN oluşmasına karşın, genotoksinin etkisine bağlı olarak bazen bu sayı iki ya da daha fazla olabilir (92-94).



Şekil-7: Asentrik kromatid parçası içeren mikronükleuslu hücrenin oluşumu. Asentrik kromatid parçasının oluşumu ile sonuçlanan interfaz evresindeki (a) yapısal kromozom hasarının uyarılması, kromozomlar mitozun metafaz evresinde (b) yoğunlaştığı zaman gözlenebilir. Kromatid parçasının etrafında çekirdek zarının yeniden oluşması ile hücrenin bölünmesinden (e) sonra ortaya çıkan yavru hücrelerde bir mikronükleus (c) gözlenir (74).



Şekil -8: Tam bir kromozom içeren mikronükleuslu hücrenin oluşumu. Mitotik aygıtı hasarlı bir hücre, mikrotübüllere bağlanamamış tam bir kromozom içerebilir (b). Hücre bölündüğü zaman, bu kromozom anafaz sırasında geri kalacaktır ve yavru hücre çekirdeğine düzgün bir şekilde ayrılmayacaktır. Bu geri kalan kromozomun etrafında çekirdek zarının da oluşması ile yavru hücrelerden birinde ortaya çıkacak olan (e) mikronükleus meydana gelir (c). Sentromerler için özel boyama teknikleri, bu mikronükleustaki sentromerin varlığını tanımlamada kullanılabilir. Bu durum, asentrik bir kromatin parçasından oluşan mikronükleus (Şekil 6) ile tam bir kromozomdan (sentrik parça) oluşan mikronükleus arasındaki farkı ifade eder (74).

Mikronükleus, hücre döngüsü boyunca meydana gelen hasar nerede olursa olsun (DNA hasarı veya mitotik hedeflerdeki hasar), hücre bölünmesi süresince oluşur. Aksine, kromozomal aberasyonlar, hücre döngüsü aşamalarının herhangi birinde meydana gelebilir ve metafazda gözlenen kromozom aberasyonlarının özel tipleri, DNA hasarının G₀/G₁ (kromozom tipi

aberasyonlar) veya S/G2 (kromatid tipi aberasyonlar) fazında ortaya çıkışı hakkında bilgi verir (94).

MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. MN'lar ya klatojenlerin neden olduğu kromozom kırığı sonucu asentrik kromozom fragmentlerinden, ya da aneujenlerin neden olduğu sentromer bölünme hataları ve iğ ipliği fonksiyon bozukluğu sonucu anafaz sırasında geri kalan tam bir kromozomdan oluşurlar (95,96). Mikronukleus analizi için mutajen muamelesi görmüş hücrelere sitokalasin-B uygulanarak sitoplazma bölünmesi engellenir ve bu yolla 2 yavru nükleusun birlikte bulunduğu iki nükleuslu hücreler ve bu hücrelerin sitoplazmaları içinde yer alan mikronükleuslar değerlendirilirler.

Sitokalazin B, bölünen hücrenin ikiye ayrılmasını uyaran mikroflamentleri oluşturacak aktin polimerizasyonuna neden olan plazma membranındaki molekül ağırlığı büyük yapılara bağlanarak sitokinezi inhibe eder. Çekirdekli hücrelerdeki mikronükleusların sayılması ile araştırmacılar hücrenin bir kez bölünmüş olduğunu ispatlamış olurlar. Mikronükleus içeren iki çekirdekli hücreler/iki çekirdekli hücrelerin oranı, mikronükleuslu hücrelerin frekansının doğru ölçülmesini sağlar. Frekans şöyle hesaplanabilir: mikronükleus içeren hücreler/toplam hücre sayısı (bölünmemiş ve MN oluşturma olasılığı olmayan hücreleri içerir) (94).

Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klatojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunmaktadır.

MN'li hücrelerin frekansını etkileyebilecek faktörler:

1. MN'li hücrelerin daha fazla bölünmesi. Yavru hücrelere MN ayrılması rastgele olduğu için, bir MN bulunduran ana hücrenin bölünmesi ile sadece bir yavru hücre mikronükleusu alacaktır ve diğer yavru hücre bir MN alamayacaktır. Bu da MN'li hücrelerin frekansını düşürecektir. Aksine, çok sayıda MN içeren ana hücre varsa, her iki yavru hücre de MN alacaktır, bu da MN içeren hücrelerin frekansını artıracaktır.

2. MN yapısındaki DNA, hücresel fonksiyonlar için esansiyel ise, MN'li hücrelerin tekrar tekrar bölünmesi öldürücü olabilir. Hücre ölümleri de gözlenen hasarın frekansını düşürür.

3. Mikronükleusun ana çekirdekle yeniden birleşmesi, sonraki bölünmeler süresince, MN'den kromozom veya kromozom parçalarının sonraki telofaz boyunca ana çekirdek ile birleşme olasılığı vardır. Bu da popülasyondaki MN'li hücre frekansını düşürür.

4. Bir hücreden mikronükleusun çıkarılması. Bazı MN'ler, özellikle tam bir kromozom içeren daha büyük MN'ler, hücreden çıkarılabilir; bu da MN frekansını düşürür. Çoğalan DNA içeren MN, hücreden uzaklaştırılabilir. Bu faktörlerden dolayı, MN'li hücrelerin frekansı, metafazdaki aberasyonlu hücrelerin frekansından daha az bulunabilir. Bu durum, metafaz testleri ile MN testlerinin sonuçları karşılaştırılmak istendiğinde önemli bir sorun ortaya çıkarır

Günümüzde, hızlı endüstrileşmeye bağlı olarak çevresel kirliliğin giderek artmasıyla, canlılar daha fazla fiziksel ve kimyasal ajana maruz kalmakta dolayısıyla güçlü toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik faktörlerin olumsuz etkilerini tespit etme ve önlemler alma ihtiyacı kaçınılmaz olmaktadır. Bu nedenle MN testi sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi avantajı sağlamasıyla yaygın kullanım alanı bulan bir teknik olmuştur.

4.5.1. Mikronükleus tekniğinin gelişimi

MN testi 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde ve daha sonra Haddle ve arkadaşları tarafından kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Bazı araştırmacılar geliştirdikleri modifiye metotlarla anöploidiye yol açan ajanlar ile klastojenleri birbirinden ayırmada MN büyüklük farkından yararlanmışlar; klastojenlerce uyarılan MN'lerin asentrik kromozomal fragmanlar içeren küçük, anojenlerce uyarılan MN'lerin tam kromozomlar içeren daha büyük ebatlı olduğunu göstermişlerdir.

Eastmond ve Tucker aynı amaçla antikinetokor antikörleri kullanarak kinetokor pozitif MN'lerin tam bir kromozom, kinetokor negatif MN'lerin ise asentrik kromozom fragmanı

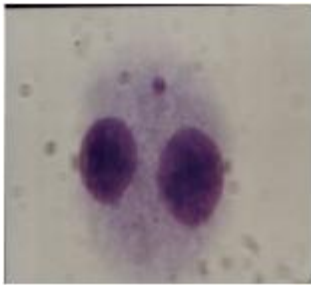
içerdiğini ve bu yöntemin anöploidi uyaran ajanları klastojenlerden ayırmada daha kesin bir yol olduğunu vurgulamışlardır.

Daha sonraları Fenech ve Morley geliştirilen Sitokinezi-Blok (Cytokinesis-Blocked) Metodu, bazı kinetik problemlerin ortadan kalkmasını ve tekniğin uygulanmasındaki güvenilirliğin artmasını sağlamıştır. Bu metot, küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan Cytochalasin-B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanmaktadır.

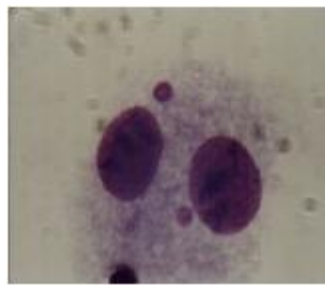
Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B ilavesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir. İncelenen alanda, kültür süresi içinde ikinci bölünmesini tamamlamış 4 çekirdekli hücelere de rastlanmaktadır; ancak MN sayımında Heddle ve Countryman'ın kriterleri kullanıldığından bu hücrelerde görülen MN'ler değerlendirme dışı bırakılmaktadır. Heddle ve Countryman'ın kriterlerine göre:

1. MN çapının esas çekirdeğin 1/3'ünden küçük olması;
2. Boya alma yoğunluğunun esas çekirdek ile aynı olması;
3. Sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MN'lerin sayılması esas alınmaktadır

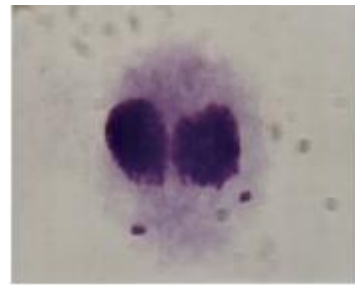
(Şekil 9, 10 ve 11).



Şekil 9. Sitokinezi bloke edilmiş bir mikronükleus



Şekil 10. Sitokinezi bloke edilmiş iki mikronükleus bulunan hücre bulunan hücre (94).



Şekil 11. Mitoz bölünmede nükleuslarındışında kalan ve mikronükleus oluşturmaya aday iki kromozom görülen hücre (94).

4.5.2. Mikronükleus ve Kanser İlişkisi

MN frekansı ile kanser gelişimi arasındaki direk ilişki birçok bulgu ile desteklenmektedir. Cheng vd. 1996'da, Duffaud vd. 1997'de yaptıkları çalışmalara göre; kanser hastalarında periferik lenfositlerde olduğu gibi hedef dokuda da MN frekansı artmaktadır (95). Rudd vd. 1988'te, Rosin ve German 1985'teki bildirimlerine göre; Bloom sendromu veya ataxia telangiectasia gibi hastalıklardan etkilenen bireyler, yüksek MN frekansı ve kanser riski taşımaktadırlar (96). Sorsa vd. 1992 yılında yaptıkları araştırmaya göre; bazı ajanlar insan ve hayvanlarda MN frekansını arttırabilmekte, kanserojenite ve genotoksisite arasında bir ilişki bulunmaktadır ve bu ajanlar; iyonize radyasyon, benzen, sigaradır (96). Fenech ve Rinaldi 1995'te, Fenech vd. 1997'de, Blount vd. 1997'de, Fenech vd. 1998'de, MN'un kandaki vitamin ve folate konsantrasyonu ile çok kuvvetli ilişkisi bulunduğunu, bunların azlığı bazı kanser tiplerinde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir (96). Bu bulgular açıkça MN ve kanser arasında bağ olduğunu göstermektedir. KA ile kanser sıklığı arasında anlamlı ilişki vardır. Ancak bu ilişki KKD de bulunmamıştır. MN için henüz veriler yeterli sayıda değildir (96).

4.6. Metaryal ve Yöntem

4.6.1. Kan Numunelerinin Alınması

Çalışmamız ile ilgili kan örnekleri, İdiyopatik Trombositopenik Purpura (İTP) tanısı konulmuş, yaşları 18- 35 aralığında, sigara içmeyen ve başka bir hastalığı mevcut olmayan 30 kişiden (16 bayan ve 14 erkek) ve kontrol grubu olarak da yine yaş aralığı 18-35 aralığında hiç sigara içmemiş, herhangi bir sağlık problemi bulunmayan, sosyo-ekonomik durumu hasta grubu ile eşdeğer 30 kişiden (12 bayan ve 18 erkek) 5 ml venöz kan örneği alındı. Alınan kan örneklerinin 1 mL'si Comet Assay analizi için, geri kalan miktar ise IL-17 çalışılmak üzere santrifüj edilerek serum örnekleri depolandı.

4.6.2. Kullanılan malzemeler

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim dalındaki olanaklardan yararlanılmıştır.

1. Elektroforez düzeneği
2. Invert mikroskop

3. Manyetik karıştırıcı
4. Soğutmalı santrifüj
5. Hotplate
6. Hassas Terazî
7. -20 ve -80 derece derin dondurucu
8. +4 derece buzdolabı
9. Distile ve Deiyonize Su sistemi
10. Elisa washer
11. Elisa Reader
12. Multipipetler
13. Horizontal Shaker
14. Etüv
15. RayBio marka Human IL-17 ELISA kiti.

4.6.3. DNA Hasarı Yöntem Prensibi

Mononükleer lökosit DNA hasarı Singh ve ark. (97) tarafından geliştirilen Alkali Tek Hücre Elektroferez (Comet Assay) yöntemi modifiye edilerek çalışıldı. Yöntemin prensibi, alkali pH'da farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel alanda farklı uzaklıklara göç etmeleri esasına dayanmaktadır. Tek hücreler agaroz jele yerleştirilir ve lizisten sonra zarar görmemiş DNA'lar taşınma sırasında comet (kuyruk) oluşturmayacak şekilde yürürler. Oysa DNA zincirinde herhangi bir nedenle kırılmalar oluşmuşsa farklı moleküler ağırlıklara ve farklı elektrik yüklerine sahip olacaklarından, elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek kuyruk şeklinde bir görüntü oluştururlar. Elektroferezden sonra DNA molekülleri, DNA spesifik floresan boyalar ile boyanıp floresan mikroskopla incelendiğinde boyanmış DNA'lar gözle veya kinetik okuma programları ile değerlendirilebilir.

4.6.3.1. Yöntemin Uygulanışı

4.6.3.1.1. Slaytların Hazırlanması

% 1,0'lik normal melting point (NMP) agaroz jel hazırlanıp eritildikten sonra 80 µl alınarak kenarları buzlanmış lam üzerine damlatıldı. Lamaların üzeri lamel ile kapatılarak buzdolabında (2-4 0C) 5 dakika bekletildikten sonra lameller kaldırıldı. Hazırlanan lamalar

nemli kutularda bekletildi. PBS tamponu ile mm³ te 104 hücre olacak şekilde dilüe edilmiş mononükleer hücrelerden 10 il alınarak 80 il %0,6'lık low melting point (LMP) agaroz jel (37 °C) ile karıştırılarak birinci tabaka üzerine tabakalandırıldı. Daha sonra lamel ile kapatılarak buzdolabında donması için 5 dakika bekletildi ve ardından lameller kaldırılarak slaytların hazırlanma işlemi tamamlandı.

4.6.3.1.2. Lizis aşaması

Hazırlanan slaytlar 50 dakika yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren soğuk lizing solüsyonunda bekletildi.

Hücre zarlarının parçalanması için önce 2,5 M Sodyum klorür, 100 mM EDTA ve 10 mM trizma base distile suda çözülerek stok lizing solüsyonu hazırlandı (pH=10). Çalışmadan hemen önce stok lizing solüsyonuna %1 oranında Triton X-100 ve %10 oranında DMSO eklendikten sonra slaytlar 50 dakika bu taze soğuk lizing solüsyonunda bekletildi.

4.6.3.1.3. Elektroforez tamponu

Elektroforezde yürütülmeden önce DNA zincirlerinin ayrılması için slaytlar alkali elektroforez tamponunda 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Alkali elektroforez tamponu 1mM Na₂EDTA ve 300 mM NaOH'tan oluşmaktadır (pH <13).

4.6.3.1.4. Elektroforezde yürütme

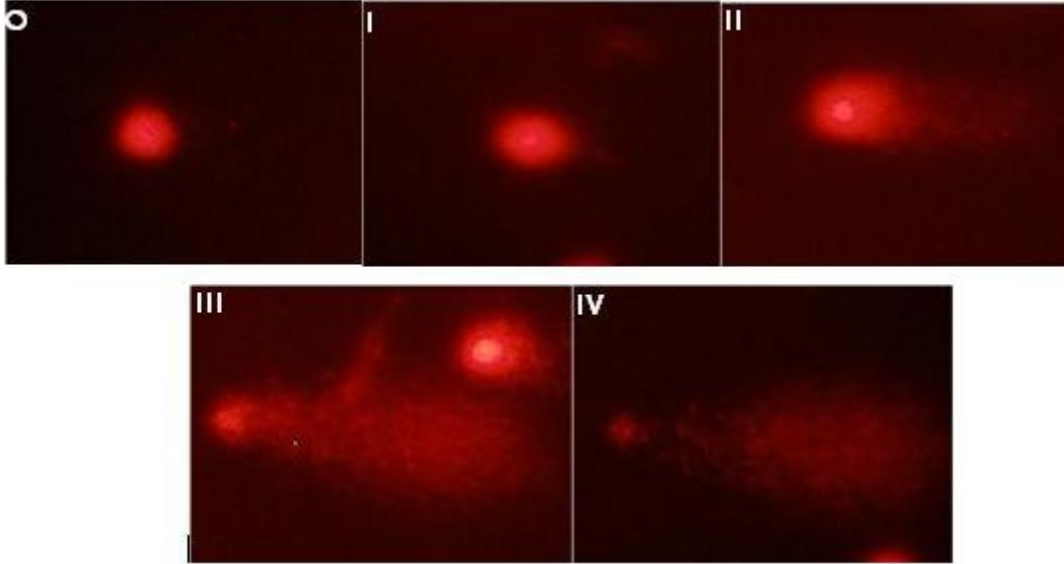
Alkali elektroforez tamponunda inkübasyon tamamlandıktan sonra DNA'lar bu tampon çözeltisi içerisinde 300 mA, elektrik akımında ve 5–25 °C'de 30 dakika yürütüldü.

4.6.3.1.5. Nötralizasyon

Elektroforezde yürütme işlemi tamamlandıktan sonra alkali elektroforez tampon çözeltisini ortamdan uzaklaştırmak için slaytlar 3 dakika süre ile 3 kez nötralizasyon tamponu (0.4 M Tris-HCl, pH 7.4) ile yıkandı.

4.6.3.1.6. Boyama

Nötralizasyon işleminden sonra boyama yapılarak cometler sayıldı. Boyama işlemi için floresan bir 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 büyütmeli floresan mikroskop (Olympus CKX41 Japan) ile (Eksitasyon DB: 546 nm, Emisyon DB: 580 nm) 100 adet DNA görüntüsü değerlendirildi. Değerlendirme işlemi için DNA'lar hasar düzeyine göre 5 evreye (0, 1, 2, 3 ve 4) ayrıldı(Şekil 12).



Şekil -12: DNA 'nın hasar düzeyine göre sınıflandırılması (66).

4.7. İnterlökin 17 Düzeyinin Ölçümü

Hasta ve kontrol gruplarının serum interlökin düzeyleri RayBio marka (Cat. No: ELH-IL 17-001) Human IL-17 ELISA Kitiyle ölçüldü. Sonuçlar pg/mL olarak ifade edilmiştir.

4.8. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) Versiyon 11.5 (SPSS Inc. Chicago, IL, United States of America (USA)) bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gruplardaki verilerin dağılımı Kolmogorov simirnov testi ile değerlendirilmiş, DNA hasarının dağılımı normal olmamasından dolayı nonparametrik testler, IL-17 testi için parametrik testler kullanılmıştır. Gruplar arasındaki istatistiksel ilişki Mann-Whitney U testi ve Student's *t* testi ile araştırılmıştır. $P < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



5. BULGULAR

Tablo-1’de çalışma gruplarının demografik verileri incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı bulunmuştur (Tablo -1).

	Hasta (n=30)	Kontrol (n=30)	<i>p</i>
Yaş(yıl)	22,15±1,80	26,55±1,80	0,338
Cinsiyet(E/K)	14/16	18/12	0,656
Boy (cm)	161,18±1,20	156,42±1,20	0,415
Kilo (kg)	75,45	64,68	0,219

Mean±Standart Deviation

Tablo-1: Çalışma gruplarının karakteristik ve demografik özellikleri

Hasta ve Kontrol grupları karşılaştırıldığında, DNA Hasarı bakımından anlamlı sonuçlar elde edilmiştir ($p=0.025$) (Tablo-2). IL-17 düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edilebilecek sonuçlar bulunmamıştır ($p=0,387$). (Tablo-3)

	Hasta (n=30)	Kontrol (n=30)	<i>p</i>
DNA Hasarı, AU	1,0 ± 8,00	0,0 ± 2,00	0,025

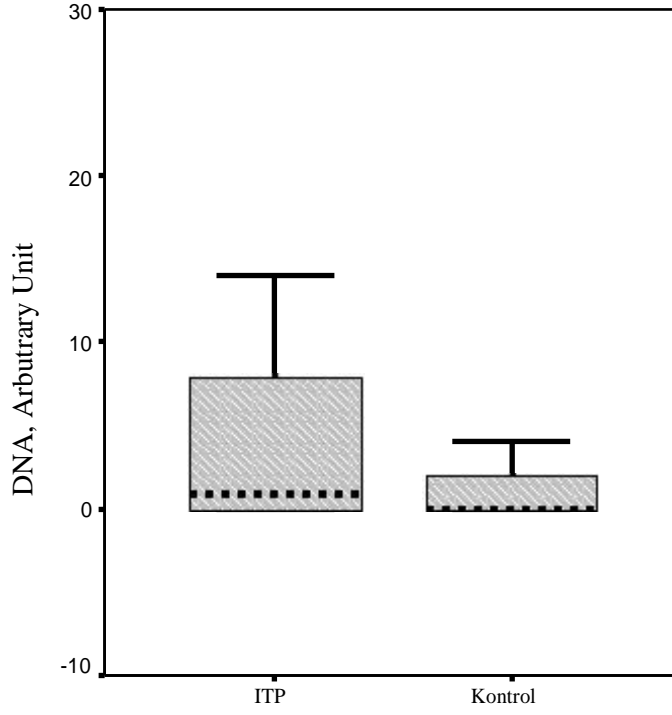
Median±İnterquartile range

Tablo-2: Hasta ve Kontrol gruplarının DNA Hasarı Düzeyleri

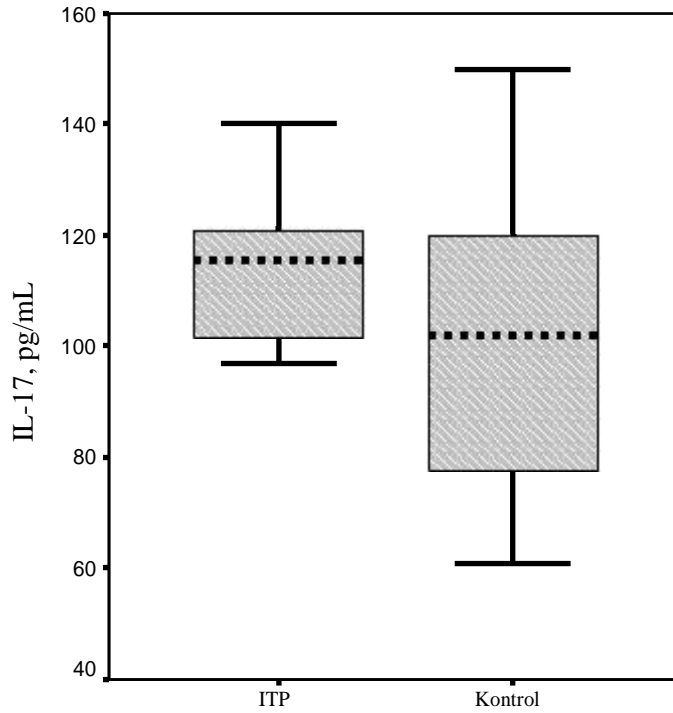
	Hasta (N=30)	Kontrol (N=30)	<i>p</i>
IL-17, pg/mL	116,83 ± 19,50	106,50 ± 72,50	0,387

Mean ± Standart Deviation

Tablo-3: Hasta ve Kontrol grupların IL-17 Düzeyleri



Grafik 1: Hasta ve kontrol gruplarının DNA Hasarı düzeylerinin arasındaki fark ve dağılımları



Grafik 2: Hasta ve kontrol gruplarının IL-17 düzeylerinin arasındaki fark, dağılım ve standart sapmaları

		IL-17	WBC	RBC	HGB	PLT
DNA	<i>r</i>	-,050	-,266	-,308	-,042	,161
	<i>p</i>	,792	,155	,098	,826	,395
IL-17	<i>r</i>		,190	-,110	,089	,093
	<i>p</i>		,314	,562	,640	,625
WBC	<i>r</i>			,250	,181	,132
	<i>p</i>			,182	,338	,488
RBC	<i>r</i>				,635	-,096
	<i>p</i>				,000	,613
HGB	<i>r</i>					,059
	<i>p</i>					,758

Tablo – 4: Hasta grubunda DNA hasarı, IL-17 ve hematolojik parametreleri arasındaki korelasyon tablosu

r: Pearson korelasyon katsayısı

p: İstatistiksel önem

Hasta grubunda DNA hasarı, IL-17 ve hematolojik parametrelerin korelatif ilişkileri yukarıdaki tabloda gösterilmektedir. Tablodan da görüldüğü gibi DNA hasarı ile IL-17, WBC, RBC ve HGB değerleri arasında negatif, PLT arasında pozitif bir korelasyon bulunmasına karşın, istatistiksel olarak anlamlı değildir. IL-17 düzeyi ile RBC düzeyleri arasında negatif bir korelasyon tespit edilmişken, diğer hematolojik parametreler arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur. Fakat istatistiksel olarak anlamlı değildir. Hasta grubunun kliniği gereği kan RBC değerleri ile HGB değerleri arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur ve istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,001$).

6.TARTIŞMA

İdiopatik trombositopenik purpura (primer immün trombositopenik purpura) (İTP) çocuk ve erişkin yaş grubunda akkiz olarak görülen, klinik bulgu olmadan sadece trombositopeni ile seyreden, diğer trombositopeni nedenlerinin ekarte edilmesiyle tanı konulabilen bir hastalıktır.

İTP’de trombositopeninin bilinen sebebi trombositlerin erken yıkılmasıdır. Trombosit yüzeyine karşı otoantikor oluşumu, bu otoantikorlarla kaplı trombositlerin retiküloendotelial sistemin makrofajları üzerindeki Fc reseptörleri tarafından tanınması ve fagositoz ile ortamdan uzaklaştırılması İTP’nin bilinen temel fizyopatolojisidir. İTP çocukluk yaş grubunda en sık akut trombositopeni nedenlerinden biridir. Çocuklarda görülme insidansı erişkinlerden fazladır. Yılda milyonda 46 yeni vaka olarak bildirilmiştir. En sık görülme yaşı 2-4 yaştır ve her iki cinsiyette de eşit oranda görülmektedir.

İTP bir grup hastalıkla birlikte görülebilmektedir. Enfeksiyonlar, kollajen doku hastalıkları, kemik iliği transplantasyonu sonrası trombositopeni, neonatal alloimmün trombositopeni, posttransfüzyon purpura, ilaca bağlı immün trombositopenik purpura seyrinde görülen İTP, sekonder İTP olarak adlandırılmaktadır. İTP akut, kronik veya rekürren olarak seyretmektedir. Akut formu sıklıkla çocuklarda, kronik formu ise genç erişkinlerde bildirilmektedir. Çocukluk çağında İTP’nin %80-90 akut seyrettiği, geçici bir kanama epizodu olduğu, bir kaç gün ile altı ay içinde düzeldiği bilinmektedir. Trombositopeni altı aydan uzun sürerse kronik İTP olarak adlandırılmaktadır. Çocuklardaki kronik İTP erişkinlerde görülen klinik özelliklere benzerlik göstermektedir.

Çoğunlukla belirgin bir klinik bulgu göstermeden sinsi seyretmekte, adölesan yaşta ve kızlarda daha sık görülmektedir. Trombositopeni ataklarının aralıkları üç aydan daha uzun sürerse rekürren İTP olarak adlandırılmaktadır. Rekürren İTP, kronik İTP’nin bir formu olarak düşünülmekte ve İTP’li çocukların %1- 4’ünde görülmektedir. Kronik İTP’de trombosit üretiminin azalmasıyla (viral enfeksiyon gibi bir nedenle) veya artmış otoantikor üretimi veya trombosit tüketimi gibi faktörlerin arasındaki dengenin bozulmasıyla hastalarda rekürrens görülmektedir. Bununla beraber kompanse evredeki İTP’li bir annenin bebeğinde neonatal trombositopeni riski bulunmaktadır.

Erişkinlerde trombositopeninin yaygın nedeni olan kronik İTP altı aydan uzun süren trombositopeni ve genellikle deri ve mukoza kanamalarıyla kendini gösteren otoimmün bir hastalıktır. Özellikle dalakta olmak üzere retiküloendotelyal sistemde yıkım sonucu kalıcı trombositopeni ile karakterize bir hastalıktır (98). Trombosit otoantikörleri suçlanan temel patogenetik mekanizmadır. İTP’li olgularda bulunan antikörler veya immün kompleksler muhtemelen megakaryositlerle etkileşir. Klinik olarak eşlik eden başka bir hastalığın bulunmaması durumunda trombositopeninin saptanması, periferik yaymada trombositopeninin doğrulanması, gerektiğinde yapılacak olan kemik iliği aspirasyonunun normal sonuçlanması ile tanı konur (99).

Sitokin, hayvan ve bitki hücrelerince üretilen, hücrelerin birbirleriyle iletişimini sağlayan protein ve peptidlerin bir grubudur. Hücre yüzeyi sitokin reseptörleri aracılığıyla görevlerini yaparlar. Yangı (enflamasyon) ve bağışıklık reaksiyonlarında, aktif lenfositler, makrofajlar, endotel, epitel ve konnektif dokular tarafından oluşturulurlar. Salımları geçicidir. Sitokinler, hücrelerdeki reseptörlere bağlanarak hücre çoğalmasını uyarırlar.

İnterleukin terimi, araştırmacılar tarafından önceleri genellikle beyaz kan hücrelerine hedeflenen bu sitokinler için kullanılmıştır. Artık geniş anlamda günden güne keşfedilen daha yeni sitokin moleküllerinin tanımı ve bunların tahmin edilen işlevlerindeki küçük ilişkileri anlatmak için kullanılmaktadır. Bunların çok büyük derecesi T hücrelerince üretilmektedir. İnterlökin 17 (IL-17), Pro-inflamatuar bir sitokin olup, inflamasyonla ilgili bir çok mediatörün ekspresyonunu indükler (16-17). IL-17 ‘nin immün sistemin düzenlenmesindeki önemine dair artan delillerin yanı sıra, inflammatuar hastalıklar, otoimmün hastalıklar ve kanserde aktif rol oynayabileceği de bildirilmiştir (18).

Rocha ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada İTP’li hastalarda serum IL-17 seviyesinin, normal olan kontrol grubuna göre 5 kat arttığı ve CD4 hücrelerden salınan diğer interlökinlerinde salınımında artış olduğu bildirilmiştir (102). Bu çalışmanın dışında Zhang ve arkadaşlarının yaptıkları bir başka çalışmada da İTP’li hastaların serumunda serum IL-17 seviyesinin arttığı ve IL-17 salgılayan CD4/IL17 hücrelerinin de seviyelerinin arttığını göstermiştir (101). Bizim yaptığımız çalışmada da literatürle uyumlu olarak İTP’li hastalarda IL-17 düzeyleri, kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. İmmün trombositopenik purpura hastalığının etyolojisinde antiplatelet antikörlerini üreten otreaktif B lenfositler sorumlu tutulsa da otoimmün hastalıklarda IL-17 düzeylerinin

yüksekliğinin T lenfosit aktivasyonunun ve sitokin yolağındaki düzenlenmenin bozulmasından dolayı yükseldiğini düşünmekteyiz.

Bu bulgularla klinik olarak İTP olduğu düşünülen hastalarda serum IL-17 düzeylerinin ölçülmesinin hastalığın tanısını için yardımcı bir parametre olabileceği kanaatindeyiz. IL-17 düzeyini yükselten mekanizmalara yönelik ileride yapılacak olan araştırmaların, bu hastalığın tedavisine özgü yöntemleri geliştirilebileceğini düşünmekteyiz.

Canlının her bir hücresinde günde onbinlerce DNA molekülü hasara uğramakla birlikte oluşan hasar DNA tamir mekanizmaları ile tamir edilmektedir. Normalde hasar ve tamir denge halindedir. Denge hasar lehine bozulduğunda tamir mekanizmaları yetersiz kalmakta, neticede kontrollü hücre ölümü olarak nitelendirilen “Apoptozis” veya mutasyon, delesyon insersiyon, kanser oluşumu gibi DNA molekülünde kalıcı değişiklikler oluşmaktadır. Bazı durumlarda ise stres faktörlerinin olumsuz etkileri ancak organizmanın hayat evresinin son aşamasında açığa çıkmaktadır. Dolayısı ile, organizmada kalıcı hücre hasarların oluşmadan önlenmesi için DNA'nın durumu hakkında kaliteli bilgi veren bir test, kaliteli bir test olma özelliği taşıyacaktır. Comet analiz yöntemi olarak da bilinen tek hücre jel elektroforez yöntemi son yıllarda genişleyen uygulama alanı, güvenilirliği ve uygulaması kolay olması bakımından kimyasal ve fiziksel etmenlerin canlılar üzerinde yol açtığı genotoksik ve sitotoksik etkilerin bir göstergesi olan DNA hasar seviyelerinin ölçülmesini sağlayan önemli bir metoddur (103).

DNA gen regülasyonu olağan gen fonksiyonları ve aktivitesi için önemli bir role sahiptir. DNA hasarı hayatı fonksiyonlara varan birçok hastalığın temelinde var olduğu bilinen ana mekanizmalardan biridir. Systemic Lupus Erythematosus (SLE) ve Romatid Artrid (RA) gibi otoimmün hastalıkların birçoğunda da DNA hasarının rolü gösterilmiştir. İTP patogenezinde de DNA hasarının olduğunu gösteren az sayıda çalışma bulunmaktadır (104). Çinli popülasyonu içeren başka bir çalışmada da özellikle bazı DNA noktalarında hasar saptanmıştır (100). Fakat bu çalışmaların dışında Chen ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada da Çin popülasyonunda İTP hastalarında DNA hasarı saptanmamıştır. Bizim yaptığımız çalışmada ise DNA hasar düzeyi İTP hastalarında, kontrol grubuna göre yüksek ve istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu saptanmıştır.

Bulgularımız ışığında, İTP hastalarında DNA hasarının kontrol grubuna göre yüksek düzeyde bulunmasının trombositopeninin etiyopatogenezinde rol oynayabileceğini söylemek mümkün gözükmemektedir. İTP hastalarında ve Kontrol grubunda DNA hasarı ve IL-17 düzeylerini araştırmaya yönelik yaptığımız bu çalışmamızda, DNA hasarının ve IL-17

düzeylelerinin birlikte değerlendirildiğinde hastalığın tanı ve takibinde hedefe yönelik tedavilerin tespiti için faydalı olacağı kanısındayız. Sonuçlarımızın yeni araştırmalara ışık tutması açısından konu ile ilgili daha fazla hasta sayısı üzerinde, moleküler düzeyde daha ayrıntılı ve daha kapsamlı araştırmalar yapılmasına gereksinim duyulmaktadır.



KAYNAKLAR

- 1-** Marshall Al Lichtman, Ernest Beutler, Kenneth Kaushansky, Thomas J. Kipps, Uri Seligsohn, Josef Prchal. Thrombocytopenia. Williams Hematology, Seventh Edition,2005, 1749-60.
- 2-** John P. Greer, John Foerster, George M. Rodgers, Frixos Paraskevas, Bertil Glader. Thrombocytopenia. Wintrobe's Clinical Hematology, Twelfth edition, Volume 2, 2008.1289-94.
- 3-** Anthony S. Fauci, Eugene Braunwald, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, J. Larry Jameson, and Joseph Loscalzo, Eds. Harrison İç Hastalıkları Prensipleri,12.baskı, 2004; 745-9.
- 4-** Imbach P, Kuhne T, Signer E. Historical aspects and present knowledge of idiopathic thrombocytopenic purpura. British journal of Hematology, 2002;119;894-900
- 5-**<http://www.bilgimanya.com/itp-hastaligi-nedir-itp-nedenleri-ve-tedavisi/23146>. 05/08/2013.
- 6-** Terry Gernsheimer. The Oncologist Chronic Idiopathic Thrombocytopenic Purpura: Mechanisms of Pathogenesis, 2009; 14: 12–21.
- 7-** McMillan R. Autoantibodies and autoantigens in chronic immune thrombocytopenic purpura. Semin Hematol, 2000; 37: 239 –48.
- 8-** Escher R, Muller D, Vogel M et al. Recombinant human natural autoantibodies Against GPIIb/IIIa inhibit binding of autoantibodies from patients with AITP. Br J Haematology,1998;102: 820–8.
- 9-** Kunicki TJ, Newman PJ. The molecular immunology of human platelet proteins. Blood, 1992; 80: 1386 –404.
- 10-** Cines DB, Blanchette VS. Immune thrombocytopenic purpura. New Engl J Med., 2002; 346: 995–1008.
- 11-**Moseley , TA, haudenschild, DR, Rose, L, Reddi, AH. İnterleukin-17 family and IL-17 receptors. Cytokine growth Factor Rev., 2003; 14: 155-74.
- 12-** Witowski J, Ksiazek K, Jorres A. İnterleukin-17: a mediator of inflammatory responscs. Cell Mol Life Sci., 2004;61: 567-79.

- 13-** Martínez-Neri PA, López-Rincón G, Mancilla-Jiménez R, Del Toro-Arreola S, Muñoz-Valle JF, Fafutis-Morris M, Bueno-Topete MR, Estrada-Chávez C, Pereira-Suárez AL. *Cytokine*. 2014 Sep 10;71(1):38-44.
- 14-** Gaffen SL, Kramer JM, Yu JJ, Shen F. The IL-17 cytokine family. *Vitam Horm*, 74 2006; 255-82.
- 15-** Caramori G, Adcock IM, Di Stefano A, Chung KF. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2014 Apr 28;9:397-412.
- 16-** Skyberg JA, Rollins MF, Samuel JW, Sutherland MD, Belisle JT, Pascual DW., *Infect Immun*. 2013 Sep;81(9):3099-105.
- 17-** Hartwig C, Tschernig T, Mazzega M, Braun A, Neumann D. *Cytokine*. 2008 Jun;42(3):298-305.
- 18-** Middleton GW, Annels NE, Pandha HS. *Cancer Immunol Immunother*. 2012 Jan;61(1):1-7.
- 19-** N. Vural, “Toksikoloji”, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 2005; 115-29.
- 20-** Hashizume M, Mouner M, Chouteau JM, Gorodnya OM, Ruchko MV, Wilson GL, Gillespie MN, Parker JC. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2014 Aug 22;7(8):894-912.
- 21-** 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, 2001;977-1046.
- 22-** McAllister KA, Yasseen AA, McKerr G, Downes CS, McKelvey-Martin VJ. *Front Genet*. 2014 Aug 8;5:233.
- 23-** Rimmelé P, Bigarella CL, Liang R, Izac B, Dieguez-Gonzalez R, Barbet G, Donovan M, Brugnara C, Blander JM, Sinclair DA, Ghaffari S. *Stem Cell Reports*. 2014 Jun 6;3(1):44-59.
- 24-** Aydin OZ, Marteiijn JA, Ribeiro-Silva C, Rodríguez López A, Wijgers N, Smeenk G, van Attikum H, Poot RA, Vermeulen W, Lans H. *Nucleic Acids Res*. 2014 Sep 1;42(13):8473-85.

- 25-** 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.
- 26-** Akbaş E, Çelik A, Derici E, Silemez F. Sigara kullanımının lenfosit yaşam süresi ve genotoksik etkilerinin incelenmesi. *Geriatrics*, 2001;4(1):15-8.
- 27-** Michalska J, Motykiewicz G, Pendzich J, Kalinowska E, Midro A, Chorazy M. Measurement of cytogenetic endpoints in women environmentally exposed to air pollution. *Mutat Res.*, 1999;445(2):139-45.
- 28-** Vineis P, Husgafvel-Pursiainen K. Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis*, 2005;26(11):1846-55.
- 29-** Rossner P, Boffetta P, Ceppi M, Bonassi S, Smerhovsky Z, Landa K, Juzova D, Sr RJ. Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer. *Environ Health Perspect*, 2005;113(5):517-20.
- 30-** Phillips D.H.: Smoking- related DNA and protein adducts in human tissues. *Carcinogenesis*, 2002;23(12):1979-2004.
- 31-** 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.
- 32-** 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.
- 33-** 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; 29-32.
- 34-** 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.
- 35-** Debeleş B, Kantarcı G. Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi. *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 2006;35(2):149-170.

- 36-** Albers AB, Siegel M, Cheng DM, Rigotti NA, Biener L. Effects of restaurant and bar smoking regulations on exposure to environmental tobacco smoke among Massachusetts adults. *Am J Public Health.*, 2004; 94(11):1959-64.
- 37-** Liju VB, Jeena K, Kuttan R. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(16):6575-80.
- 38-** Morrow PE, Bruce MC, Doull J. *Toxicol Sci.* 2001 Oct;63(2):151-2.
- 39-** Ahmed HH, Khalil WK, Hamza AH. *Toxicol Mech Methods.* 2014 Sep 4:1-10.
- 40-** Li P, Zhou L, Liu X, Jin X, Zhao T, Ye F, Liu X, Hirayama R, Li Q. *Toxicol Lett.* 2014 Oct 1;230(1):36-47.
- 41-** 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 2001;321-50.
- 42-** 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.*, 2000;12-21.
- 43-** Wang Z, Ayoub E, Mazouzi A, Grin I, Ishchenko AA, Fan J, Yang X, Harihar T, Saparbaev M, Ramotar D. *DNA Repair (Amst).* 2014 Aug 7;22C:53-66.
- 44-** Kurtulmuş Sevcan, Aydın Kevser Dental döküm alaşımlarının genotoksisite,mutajenisite ve karsinogenisite SÜ Diş hek Fak Derg., 2007;16:73-8.
- 45-** Kassayová M, Bobrov N, Strojny L, Kisková T, Mikeš J, Demečková V, Orendáš P, Bojková B, Pěč M, Kubatka P, Bomba A. *Anticancer Res.* 2014 Sep;34(9):4969-75.
- 46-** Tang M, Wen G, Luo Y, Liang A, Jiang Z. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2014 Aug 10:1032-8.
- 47-** You CX, Yang K, Wang CF, Zhang WJ, Wang Y, Han J, Fan L, Du SS, Geng ZF, Deng ZW. *Molecules.* 2014 Aug 27;19(9):13225-34.
- 48-** Singer R, Atar S, Atias O, Oron E, Segal D, Hirsch JA, Tuller T, Orian A, Chamovitz DA. *Nucleic Acids Res.* 2014 Nov 1;42(15):9761-70.
- 49-** Taylor DL, Kutil NJ, Malek AJ, Collie JS. *Mar Environ Res.* 2014 Aug;99:20-33.

- 50-** Dizdaroğlu M., Karakaya A.E.: *Advances in DNA Damage and Repair*. Plenum Publishers, 1997;181-191.
- 51-** Albertini R.J., Anderson D., Douglas G.R., Hagmar L., Hemminki K., Merlo F., Natarajan A.T., Norppa H., Shuker D.E., Tice R., Waters M.D., Aitio A.: *IPCS Guidelines for the Monitoring of Genotoxic Effects of Carcinogens in Humans*. International Programme on Chemical Safety, *Mutat. Res.*, 2000; 463-72.
- 52-** Stephan G, Pressl S. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes from healthy subjects as detected in first cell division. *Mutat Res.*, 1999;446(2):231-7.
- 53-** Tucker JD, Preston RJ: Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. *Mutation Research*, 1996;147-59.
- 54-** Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie.*, 2006; 88(11):1515-31.
- 55-** 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.
- 56-** Burhansstipanov L, Krebs LU, Dignan MB, Jones K, Harjo LD, Watanabe-Galloway S, Petereit DG, Pingatore NL, Isham D. *J Cancer Educ.* 2014 Sep;29(3):420-7.
- 57-** Bojková B, Orendáš P, Kubatka P, Pěč M, Kassayová M, Kisková T, Kajo K. *Pathol Res Pract.* 2014 Aug;210(8):465-72.
- 58-** Tucker J.B., Auletta A., Cimino M.C., Dearfield K.L., Jacobsonkram D., Tice R.R., Carrano A.V.: *Sister Chromatid Exchange: Second Report of the GeneTox Program*, *Mutat. Res.*, 1996;27: 39-45.
- 59-** Betti C., Davini T., Gianessi L., Loprieno N., Baral E.R.: *Comparative Studies by Comet Tests and SCE Analysis in Human Lymphocytes From 200 Healthy Subjects*, *Mutat. Res.*, 1995;3:20-7.
- 60-** Martin V.J., Gren M.H.L., Schmezer P.: *The Single Cell Gel Electrophoresis Assay: A European Review*, *Mutat. Res.*, 1993;2:47-63.
- 61-** Eger E.I., Laster M.J., Winegar R., Han C., Gong, D.: *Compound A Induces Sister Chromatid Exchanges in Chinese Hamsters Ovarial Cells*, *Anesthesiology*, 1997;6:18-22.

- 62-** Dunnick KM, Badding MA, Schwegler-Berry D, Patete JM, Koenigsmann C, Wong SS, Leonard SS. *J Toxicol Environ Health A*. 2014;77(20):1251-68.
- 63-** Olive P.L., Banath J.B., Durand R.E.: Heterogeneity in Radiation Induced DNA Damage and Repair and Tumor and Normal Cells Measured Using The “Comet” Assay, *Radiat. Res.*, 1990;2:86-94.
- 64-** Fairbairn D.W., Olive P.L., O’neill, K.L.: The Comet Assay: A Comprehensive Review, *Mutat. Res.*, 1995;3:37-59.
- 65-** Gedik C.M., Evren S.W.B., Collins A.R.: Single Cell Gel Electrophoresis Applied to the Analysis of UVC Damage and its Repair in Human Cells, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1995;6:313-20.
- 66-** Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.*, 2004; 26(3):249-61
- 67-** <http://www.geocities.com/cometassay>, 05/08/2013.
- 68-** Martin V.J., Gren M.H.L., Schmezer P.: The Single Cell Gel Electrophoresis Assay: A European Review, *Mutat. Res.*, 1993;2:47-63.
- 69-** Kassie F., Parzefall W., Knasmuller S.: Single Cell Gel Electrophoresis Assay: A New Technique for Human Biomonitoring Studies, *Mutat. Res.*, 2000;463:13-31.
- 70-** Collins A.R., Raslova K., Somorovska M., Petrovska H., Ondrusova A., Vohnout B., Fabry R., Dusinska M.: DNA Damage in Diabetes Correlation with Clinical Marker, *Free Radic. Biol. & Med.*, 1998;25:373-7.
- 71-** Sardas S., Yilmaz M., Oztok U., Cakir N., Karakaya A.E.: Assessment of DNA Strand Breakage by Comet Assay in Diabetic Patients and the Role of Antioxidant Supplementation, *Mutat. Res.*, 2001;4:12-39.
- 72-** Binkova B., Lewtas J., Miskova I., Rossner P., Mrackova M.C., Mumford S.M.: Biomarker Studies in Northern Bohemia, *Environ. Health. Perspect.*, 1996;591-7.
- 73-** W.N. Choy, *Genetic toxicology and cancer risk assessment*, Marcel Dekker, New York, 2001;21-7.
- 74-** J. McCann E. Choi E. Yamasaki B.N. Ames, “Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals”, *Proc Nat Acad Sci.*, 1975;72: 5135-39.

- 75-** K. Mortelmans E. Zeiger, “The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay”, *Mutat Res*, 2000; 455: 29-60.
- 76-** N. Vural, “Toksikoloji”, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 2005;115-129.
- 77-** D.R. Maron, B.N. Ames, “Revised methods for the Salmonella mutagenicity test”, *Mutat Res.*, 1983;113: 173-215.
- 78-** U.K. Alekperov, B.N. Ames, T. Kada, L.W. Wattenberg, “Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis: Report by ICPEMC expert group on antimutagens and desmutagens”, *Mutat Res.*, 1986;168: 47-65.
- 79-** S.A. Latt R.R. Sehrek K.S. Loveday C.P. Dougherty C.F. Schuler, “Sister chromatid exchange”, *Adv Hum Genet.*, 1980;10: 267-331.
- 80-** S. Wolff, “Sister chromatid exchange”, *Advances in Human Genetics*, 1980;10: 183-201.
- 81-** P.E. Perry, E.J. Thompson, “The methodology of sister chromatid exchanges”, In: Kilbey B.J., Legator M., Nichols W., Ramel C., eds. *Handbook of mutagenicity test procedures*, Elsevier Science, Amsterdam, 1984;495–529.
- 82-** E. Sonoda, M.S. Sasaki C. Morrison Y. Yamaguchi-Iwai, M. Takata, S. Takeda, “Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells”, *Mol Cell Biol.*, 1999; 19 (7): 5166-69.
- 83-** T. Helleday, “Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells”, *Mutat Res.*, 2003;532: 103-15.
- 84-** D.M. Wilson, L.H. Thompson, *Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange*, *Mutat Res.*, 2007;616: 11–23.
- 85-** R.J. Albertini D. Anderson G.R. Douglas L. Hugmar K. Hemminki F. Merlo, A.T. Natarajan H. Norppa D.E.G. Suhaker R. Tice, M.D. Waters A. Aitio, “IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans”. *Mutat Res.*, 2003; 463: 11-72.
- 86-** Karaman A , Keskinler F, “Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda genomik hasar”, *Turkiye Klinikleri J Med Sci.*, 2009; 29 (6): 1392-97.
- 87-** A.V. Carrano L.H. Thompson P.A. Lindl, J.L. Minkler, “Sister chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis”, *Nature*, 1987; 271:551-3.
- 88-** M. Cheng, M.K. Conner, Y. Alaria, “Potency of some carbamates as multiple tissue sister chromatid exchanges in bloom’s syndrome lymphocytes”, *Cancer Res.*, 1987; 71: 4508-12.

- 89-** Topaktaş M., Speit G., “Induction of SCE and CA in human lymphocytes with prometryn”, *Tr J Biol.*, 1980; 14: 69-78.
- 90-** A.T. Natarajan, Chromosome aberrations: past, present and future, *Mutat Res.*, 2000;3-16.
- 91-** Topaktaş M., Rencüzoğulları E., “Sitogenetik”, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 2010; 87-
- 92-** Mateuca, R., et al., Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring, *Biochimie* 2006;2:245-7.
- 93-** Toossi MT, Mohebbi S, Samani RK, Soleymanifard S. *J Med Phys.* 2014 Jul;39(3):192-6.
- 94-** Aardema M.J., Kirsch-Volders M., *The In Vitro Micronucleus Assay*, Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment. Choy, Wai Nang (Editor), New York, NY, USA: Marcel Dekker Incorporated, 2001; 163-4.
- 95-** Fenech M., Morley A.A., Measurement of Micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, 1985; 147, 29-36.
- 96-** Fenech M., Holland N., Chang W.P., Zeiger E., Bonassi S., *The Human MicroNucleus Project-An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans.* *Mutation Research*, 2007; 428, 271-83.
- 97-** Zhang J, Ma D, Zhu X, Qu X, Ji C, Hou M. Elevated profile of Th17, Th1 and Tc1 cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Haematologica.* 2009;94(9):1327-8.
- 98-** The American Society of Hematology ITP Practice Guideline Panel. Diagnosis and treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura: recommendations of the American Society of Hematology. *Ann Intern Med.*, 1997; 126:319-26.
- 99-** Woods VL Jr, Kurata Y, Montgomery RR, Tani P, Mason D, Oh EH, et al. Autoantibodies against platelet glycoprotein Ib and IIb/IIIa complex in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. 1984; 64:156- 60.
- 100-** Yi T, Zhao D, Lin CL, Zhang C, Chen Y, Todorov I, LeBon T, Kandeel F, Forman S, Zeng D. Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. 2008 Sep 1;112(5):2101-10.
- 101-** Zhu X, Ma D, Zhang J, Peng J, Qu X, Ji C, et al. Elevated interleukin-21 correlated to Th17 and Th1 cells in patients with immune thrombocytopenia. *J Clin Immunol.*, 2010;30(2):253-9.

102- Rocha AMC, Souza C, Rocha GA, Melo FF, Saraiva IBS, Clementino NCD, Marino MAC, Queiroz DMM. IL1RN VNTR and IL2-330 polymorphic genes are independently associated with chronic Immune Thrombocytopenia. Br J Haematol., 2010;150(6):679–84.

103- Dikilitaş M, Koçyiğit A. Canlılarda “Tek Hücre Jel Elektroforez” Yöntemi ile DNA hasar Analizi (Teknik Not): Comet Analiz Yöntemi. HR.Ü.Z.F. Dergisi, 2010, 14(2): 77- 89.

104- Chen WC, Lai YH, Chen HY, Guo HR, Su IJ, Chen HH. Interleukin-17-producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor. Histopathology. 2013 Aug;63(2):225-33.

