

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ**



**Akut Organofosfat İntoksikasyonuna Maruz Kalan Bireylerin
Lenfositlerinde CBMN Sitom Yöntemi ve Plazmalarında 8-OHdG Ölçümü
ile Kromozomal ve Oksidatif DNA Hasarının ve Adrenal, Hipofiz, Tiroid
Hormonlarında Meydana Gelen Değişikliklerin ve Birbirleri ile İlişkilerinin
Araştırılması**

Proje No: TSA-12-3792

Araştırma Projesi

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Yrd. Doç. Dr. Kürşat Gündoğan
Tıp Fakültesi/Dâhiliye Yoğun Bakım Ünitesi

Araştırmacılar

Prof Dr. Hamiyet Altuntaş
Prof Dr. Fahri Bayram
Prof. Dr. Gülden Başkol
Doç. Dr. Zuhale Hamurcu
Doç. Dr. Ramazan Coşkun
Yard. Doç. Dr. Nazmiye Bitgen
Öğr. Gör. Dr. Seçil Yılmaz

**OCAK 2015
KAYSERİ**

II

III

TEŞEKKÜR

“Akut Organofosfat İntoksikasyonuna Maruz Kalan Bireylerin Lenfositlerinde CBMN Sitom Yöntemi ve Plazmalarında 8-OHdG Ölçümü ile Kromozomal ve Oksidatif DNA Hasarının ve Adrenal, Hipofiz, Tiroid Hormonlarında Meydana Gelen Değişikliklerin ve Birbirleri ile İlişkilerinin Araştırılması” isimli araştırma projesinin yürütülmesi süresince değerli yardımlarıyla ve katkılarıyla destek olan Prof Dr. Hamiyet Altuntaş’a, Prof. Dr. Fahri BAYRAM’ a, Prof. Dr. Gülden Başkol’e, Doç. Dr. Zuhale Hamurcu’ya, Doç. Dr. Ramazan Coşkun’a, Yard. Doç. Dr. Nazmiye Bitgen’e ve Öğr. Gör. Dr. Seçil Yılmaz’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Sürekli olarak maddi ve manevi yönden desteklerini esirgemeyen aileme saygı ve şükranlarımı sunarım.

IV

İÇİNDEKİLER

KAPAK	I
-------------	---

BOŞ SAYFA	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
KISALTMALAR	VII
ŞEKİL, RESİM VE TABLO LİSTESİ.....	VIII

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM	9
2. GENEL BİLGİLER.....	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1.GEREÇLER.....	15
3.2. YÖNTEM	17
4. BULGULAR.....	24
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	27
6. KAYNAKLAR.....	31
7. EK 1. Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu (BGOF)	34

Akut Organofosfat İntoksikasyonuna Maruz Kalan Bireylerin Lenfositlerinde CBMN Sitom Yöntemi ve Plazmalarında 8-OHdG Ölçümü ile Kromozomal ve Oksidatif DNA Hasarının ve Adrenal, Hipofiz, Tiroid Hormonlarında Meydana Gelen Değişikliklerin, ve Birbirleri ile İlişkilerinin Araştırılması

ÖZET

Pestisitler, tarım sektöründe sıklıkla kullanılan bileşiklerdir. Özellikle organofosfatlar yoğun olarak kullanılan pestisitler arasındadır. Bu nedenle organofosfat (OF) zehirlenmeleri özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde sık görülmektedir. Bu çalışmanın amacı, akut OF intoksikasyonuna maruz kalan bireylerin lenfositlerinde hem CBMN sitom yöntemi ile kromozom /genom hasarı, hücre çoğalma indeksi ve hücre ölüm oranı incelenerek hem de oksidatif DNA hasarı tespit edilerek akut OF intoksikasyonunun genom instabilitesi üzerine etkileri araştırmaktır. Ayrıca OF'ların endokrin sistem özellikle de hipofiz hormonları üzerine etkileri değerlendirilecek ve bu hormonlarla genom hasarı arasında bir ilişkinin olup olmadığını da araştırmaktır.

Çalışmada, akut OF zehirlenmesi olan 13 hasta ile hastalarla benzer yaş ve cinsiyette toplam 13 sağlıklı bireyin kan örnekleri analiz edilmiştir.

Akut OF zehirlenmesi olan hastalara ait tedavi öncesi ve sonrası hormon düzeyleri, 8-OHdG seviyeleri ve CBMN sitom yöntemi parametreleri karşılaştırıldığında, tedavi sonrasında MN ve NPB frekanslarının ve apoptotik ve nekrotik hücre frekanslarının azaldığı bulunmuştur ($p<0.05$).

Hastalara ait tedavi öncesi ve sonrası CBMN sitom yöntemi parametreleri ve plazma 8-OHdG seviyelerinin, hipofiz hormonları ile ilişkisi değerlendirildiğinde ise, tedavi sonrası GH ile tedavi sonrası NPB hücre frekansının ($p<0.05$) ve tedavi sonrası NBUD hücre frekansının ($p<0.05$) arttığı; tedavi sonrası ST3 ile tedavi sonrası apoptotik hücre frekansının ($p<0.01$) ve tedavi sonrası nekrotik hücre frekansının ($p<0.01$) azaldığı; tedavi sonrası ST4 ile tedavi sonrası apoptotik hücre frekansının ($p<0.05$) ve tedavi sonrası nekrotik hücre frekansının ($p<0.05$) azaldığı bulunmuştur.

Sonuç olarak, ortaya koyduğumuz bu bulgularla çalışmamız ilk çalışma olması yönüyle önemlidir.

Anahtar Kelimeler: DNA hasarı; Organofosfat intoksikasyonu; sitom yöntemi; mikronükleus; 8-OHdG

Research into the Damage done to the Chromosomal and Oxidative DNA Damage and Changes Occurring in Adrenal, Pituitary and Thyroid Hormones and their Interrelationship in the Lymphocytes and Plasmas of the Individuals who were exposed to Acute OF Intoxication with the Method of CBMN Sitom and with 8-OHdG Measurement, Respectively

ABSTRACT

Pesticides are commonly used compounds in agriculture. Especially, organophosphates are among the extensively used pesticides. Therefore, organophosphate (OF) poisoning is common, especially in underdeveloped and developing countries.

The aim of this study was to research the effects of acute OF intoxication on genome instability in the individuals' lymphocytes that were exposed to acute OF intoxication chromosome with the method of CBMN sitom both by examining chromosome / genome damage, cell proliferation index and cell death rate and by determining oxidative DNA damage.

The purpose of this study was also to assess the effects of OFs on the endocrine system and primarily on pituitary hormones and to investigate whether a relation exists between these hormones and the genome damage

In the study, blood samples were analyzed of 13 healthy subjects of similar age and sex and of 13 patients with acute OF poisoning.

When hormone levels of the patients before and after the treatment, 8-OHdG levels and CBMN sitom method parameters were compared, it was found that MN ve NPB frequencies apoptotic and necrotic cell frequencies were reduced($p<0.05$).

When the connection was examined between the patients' CBMN sitom method parameters and plasma 8- OHdG levels and pituitary hormones, it was found that the cell frequencies of GH and NPB after the treatment ($p<0.05$) and NBUD cell frequencies ($p<0.05$) increased, ST3 after the treatment and apoptotic cell frequency ($p<0.01$) and necrotic. Cell frequency ($p<0.01$) decreased and ST4 after the treatment and apoptotic cell frequency ($p<0.05$) and necrotic cell frequency ($p<0.05$) decreased.

In conclusion, considering the findings we put forward, our study is of importance in view of becoming first in the area.

Key Words: DNA damage; Organophosphate intoxication; cytosine method; micronucleus; 8- OHdG

VII

KISALTMALAR

ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
CBMN	: Cytokinesis-Block Micronucleus; Sitokinez Blok Mikronükleus
Cyt-B	: Sitokalazin B
DMSO	: Dimetil sülfoksit
8-OHdG	: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ELISA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Testi
E2	: Östradiol
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
GH	: Büyüme Hormonu
IGF-1	: İnsuline-benzer Büyüme Faktörü-1
MN	: Mikronükleus
KA	: Kromozom aberasyon
KKD	: Kardeş kromatid değişimi
LH	: Lüteinize Edici Hormon
OF	: Organofosfat
PHA	: Phytohemagglutinin; Fitohemagglutinin
PRL	: Prolaktin
ROT	: Reaktif oksijen türevleri

ST3	: Serbest triiyodotironin
ST4	: Serbest tiroksin
ST	: Serbest Testosteron
TSH	: Hipofizer tiroidi uyaran hormon tirotropin
TT	: Total Testosteron

VIII

ŞEKİL, RESİM VE TABLO LİSTESİ

<u>Tablo ve Şekil Listesi</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 3.1. Standart Kalibrasyon Eğrisi	23
Tablo 4.1. Akut OF zehirlenmesi olan 13 hasta ve 13 sağlıklı kontrol kişiye ait yaş, hormon düzeyleri, 8-OHdG seviyeleri ve CBMN cyt yöntemi parametrelerinin ortalama değerleri (ort ± S.S.).	25

1. GİRİŞ / AMAÇ VE KAPSAM:

Pestisitler, tarım sektöründe sıklıkla kullanılan bileşiklerdir. Özellikle organofosfatlar yoğun olarak kullanılan pestisitler arasındadır. Bu nedenle organofosfat (OF) zehirlenmeleri özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde sık görülmektedir. Zehirlenme; bu kimyasalların üretim, taşınma ve kullanım alanlarında yada evde kaza sonucu oluşabilir. OF'ların Emilimi solunum yolundan, sindirim sisteminden, konjonktivadan, deriden ve mukozalardan olur. Yaygın olarak kullanılan bu kimyasal maddelerin yiyeceklere bulaşması ile kitlesel zehirlenme olasılığı da vardır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde intihar amaçlı OF kullanımı önemli bir sorundur (1).

Yapılan çalışmalarla, tarım ilaçlarına (pestisitlere) maruz kalma ile kanser, Parkinson ve diğer birçok nörolojik hastalıkların gelişimi arasında ilişki olduğu gösterilmiş olup bu ilişkinin DNA hasarı ve oksidatif strese bağlı olduğu ileri sürülmektedir (2).

Organofosfat pestisitlerinin de genotoksik etkilerinin olduğu birçok çalışmalarla desteklenmiştir. Böylece, OF'ın DNA hasarı üzerine olan etkileri tarım ile uğraşan (kullanım) veya diğer mesleki olarak (üretim, taşıma gibi) OF'a maruz kalan bireylerin lenfositlerinde araştırılmıştır (2-6). Ancak, literatür araştırmasında akut organofosfat intoksikasyonunun genom üzerine etkileri ile ilgili sadece bir çalışmaya rastlanılmıştır (7).

Bu nedenle, çalışmamızda akut OF intoksikasyonuna maruz kalan bireylerin lenfositlerinde hem CBMN sitom yöntemi ile kromozom /genom hasarı, hücre çoğalma indeksi ve hücre ölüm oranı incelenerek hem de oksidatif DNA hasarı tespit edilerek akut OF intoksikasyonunun genom instabilitesi üzerine etkileri araştırılacaktır.

Ayrıca OF'ların endokrin sistem üzerine özellikle de hipofiz hormonları üzerine etkilerinin olduğu ileri sürülmüştür (8). Bundan dolayı çalışmamızda, akut OF intoksikasyonuna maruz kalan bireylerde, Kortizol, Adrenokortikotropik hormonun (ACTH), serbest tiroksin (ST4) ve serbest triiyodotironin (ST3), hipofizer tiroidi uyaran hormon tirotropin (TSH), prolaktin (PRL), İnsuline-benzer Büyüme Faktörü-1 (IGF-1), GH (Büyüme Hormonu), Folikül Uyarıcı Hormon (FSH), Lüteinize Edici Hormon (LH), Total Testosteronun (TT), Serbest Testosteron (ST), Östradiol (E2) düzeyleri incelenerek hem bu hormonlar üzerine OF'ın etkileri değerlendirilecek hem de bu hormonlarla genom hasarı arasında bir ilişkinin olup olmadığı araştırılacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

Böcek öldürücü kimyasal maddeler, tarımsal ülkelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde kullanılan böcek öldürücü kimyasal maddeler, organofosfatlı bileşikler, karbamatlar, organoklorinler ve pretrinler olmak üzere dört grupta toplanır. OF içeren böcek öldürücülerin en önemlileri Diazinon, Orthene, Malathion, Parathion ve Chlorpyrifos'tur. Bu maddeler ayrıca kimyasal savaş ajanı olarak da 2. Dünya Savaşı'ndan bu yana kullanılmaktadırlar. Parathion gibi güçlü bileşikler öncelikle tarımda kullanılır. Coumaphos ve Trichlorfon gibi orta güçteki ürünler hayvan bakımında kullanılır. Diazinon ve Chlorpyrifos insanlarda nörotoksisiteye neden olduğu için kullanımı ev içinde yasaklanmıştır (1, 9). Tarım sektöründe sıklıkla kullanılan bileşikler olduğu için organofosfat

zehirlenmelerine özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde sık rastlanmaktadır. Zehirlenmeler, bu kimyasalların üretim, taşınma ve kullanım alanlarında, evde kaza sonucu ve intihar amaçlı oluşabilir. Yaygın olarak kullanılan bu kimyasal maddelerin yiyeceklere bulaşması ile kitlesel zehirlenme olasılığı da vardır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde intihar amaçlı OF kullanımı önemli bir sorundur.

OF'ların etkisi, alınan ürüne, alınış yoluna ve alınan miktara bağlı olarak değişir (1). OF'lu bileşiklere maruziyeti takiben genellikle 30 dakika ile 3 saat içinde zehirlenme bulguları görülür (10). Ağız yolu ile ciddi miktarlardaki alımları takiben 5. dakikada belirtiler başlayabilir ve 15. dakikada ölüm gerçekleşebilirken, az miktardaki cilt maruziyeti hafif şikayetlere yol açabilir. Genelde görülen ise çoğu ilk 8 saatte olmak üzere, ilk 24 saatte hemen hemen vakaların tamamının semptomatik hale gelmesidir. OF'lar, taşıdıkları yan gruplara göre sınıflandırılırlar ve bu yan grupları, toksisitelerinin belirlenmesinde önemli bir role sahiptir (9, 11).

Mikronükleus (MN) testi; kromozomal hasarın, genom instabilitesinin ve son yıllarda kanser riskinin bir belirteci olarak yaygın olarak kullanılan mutajenite/ genotoksisite testidir (11, 13). MN hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, ana çekirdeğe dahil olmayan küçük yuvarlak görünümlü ekstra nükleer yapıdır. Kromozom ya da kromatid kırıklarından veya hücre bölünmesinin anafaz evresinde kromozomların geri kalmasından oluşur (11-14). MN testi daha sonra Sitokinezi-Blok (Cytokinesis-Blocked, CBMN) testi olarak geliştirilmiştir. CBMN testi ile bölünen hücrelerde, tamir edilemeyen ya da yanlış tamir edilen DNA lezyonlarından, mitoz bölünme sırasındaki kusurlardan kaynaklanan hatalı kromozom ayrılmalarından oluşan MN'lar değerlendirildiği için güvenilir ve geçerli bir metoddur (15). CBMN testi son yıllarda, CBMN "cytome assay" (CBMN sitom testi) olarak geliştirilmiştir (16). Bu teknikle; Kromozom instabilitesi/genom hasarı, hücre çoğalması, hücre ölümü tespit edilebilmektedir. DNA hasarı için; MN'lu (kromozom kırıkları ve/veya kromozom

kayıplarını temsil eder), Nükleoplazmik köprülü (NPB, hatalı DNA tamirleri ve/veya telomer uç birleşmelerini gösterir) ve Nükleer budlu (NBUD; gen amplifikasyonlarını gösterir) binükleer hücreler sayılır. Hücre çoğalması için (Nükleer bölünme indeksi veya sitoztazi); mononükleer, binükleer, multi nükleer hücreler, skorlanarak hücre çoğalma oranları hesaplanır. Hücre ölümü için; apoptotik ve nekrotik hücreler skorlanarak hücre canlılık oranı belirlenir. Dolayısıyla, hem in vivo genotoksinlere maruz kalma hem de in vitro genotoksisite çalışmalarında, artık CBMN tekniği yerine CBMN sitom yöntemi kullanılmaktadır (16).

Oksidatif stresin, farklı mekanizmalar ile DNA'da baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları (kromozom kırıkları), DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım lezyonlara neden olarak hasara yol açtığı bilinmektedir (17). Bu hasara uğrayan bazlar arasında 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), oldukça duyarlı ve en sık karşılaşılan oksidatif DNA hasarının göstergesidir (17-19). Modifiye bir baz olan 8-OHdG, DNA'da guaninin 8. karbon atomuna hidroksil radikalinin bağlanması sonucu oluşur. DNA replikasyonu sırasında G-C'den A-T'ye dönüşüme neden olarak mutasyona eğilimi artırır (17-19) ve bu bileşiğin DNA'yı tamir edici enzimler tarafından ortadan kaldırılması da yeni hatalara sebep olur (20). Bu nedenle 8-OHdG ölçümü, DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilmekte olup oksidatif DNA hasarını belirlemek için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir (17-19).

Pestisitlerin mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilere sahip olduğu, tarım ile uğraşan veya diğer yollarla uzun süreli kronik olarak OF'a maruz kalan bireylerde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ancak, literatür incelemesine göre; akut OF intoksikasyonun genom üzerine etkileri ile ilgili sadece bir çalışma bulunabilmiştir (7). Bu çalışmada OF zehirlenmesine maruz kalan kişilerde (nasıl maruz kaldığı açıklanmamış) tedaviye başlanmadan önce ve tedaviden sonra kan örneklerinde MN, kardeş kromatid değişimi (KKD), değerlendirilmiş ve tedavi öncesi ile tedavi sonrası arasında fark bulunamamıştır (7).

Bizim çalışmamızda ise, akut OF intoksikasyonuna maruz kalan bireylerin lenfositlerinde hem CBMN sitom yöntemi ile; kromozom /genom hasarı (MN, NPB ve NBUD'lar skorlanacak), hücre çoğalma indeksi (mononükleer, binükleer, multi nükleer hücreler skorlanacak) ve hücre ölüm oranı (apoptotik ve nekrotik hücreler skorlanacak) değerlendirilerek hem de oksidatif DNA hasarı ile; 8-OHdG düzeyleri tespit edilerek akut OF intoksikasyonunun genom instabilitesi üzerine etkileri araştırılacaktır.

Ayrıca, OF'ların endokrin sistem üzerine özellikle de hipofiz hormonları üzerine etkilerinin olduğu gösterilmiştir (8). Bu çalışmada, akut OF intoksikasyonuna maruz kalan bireylerde, (zehirlenme sürecinde; tedaviden önce) ACTH, kortizol, ve PRL seviyelerinin tedavi sonrasında göre önemli ölçüde arttığı, FSH seviyelerinin ise zehirlenme sürecinde önemli ölçüde düştüğü, LH seviyesinde ise değişiklik olmadığı gösterilmiştir (8). Bundan dolayı çalışmamızda, akut OF intoksikasyonuna maruz kalan bireylerde, Kortizol, Adrenokortikotropik hormonun (ACTH), serbest tiroksin (ST4) ve serbest triiyodotironin (ST3), hipofizer tiroidi uyaran hormon tiotropin (TSH), PRL (prolaktin), İnsuline-benzer Büyüme Faktörü-1 (IGF-1), GH (Büyüme Hormonu), Folikül Uyarıcı Hormon (FSH), Lüteinize Edici Hormon (LH), Total Testosteronun (TT), Serbest Testosteron (ST), Östradiol (E2) düzeyleri hem tedavi öncesinde hem de tedaviden sonra incelenerek OF'ın bu hormonlar üzerine etkileri araştırılacaktır. Daha önce yapılan bir çalışmada IGF-1 ve MN sıklığı arasında doğrusal bir ilişkinin olduğu gösterilmiş (21) ve bu çalışma dışında hipofiz hormonlar ile genom instabilitesi arasında ilişkiyi gösteren bir araştırmaya rastlanılamamıştır. Çalışmamızda aynı zamanda, hipofiz hormonları ile genom instabilitesi (MN, NPB, NBUD) ve oksidatif DNA hasarı (8-OHdG) arasındaki ilişki de araştırılacaktır.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

Demirbaş Malzemeler

1. Etüv (Heto/ Cell Hause 200)
2. Su banyosu (Thermal)
3. Vorteks (Janke & Kunkel VF2)
4. Mikroskop (Nikon Labophot 2 ve Zeiss Primo Star model)
5. Santrifüj (ALC PK 110 ve Nüve NF 815)
6. Hassas terazi (Kern S 2000 ve Ohaus Pioneer)
7. Derin dondurucu
8. Buzdolabı
9. Dengeleme terazisi
10. Otomatik pipet
11. Fotomikroskop (Leica DM 2500)

12. Elisa Cihazı (Biotek-Epoch Multi-Volume Spectrophotometer System)
13. Laminar-air flow kabin (Faster, Safe Fast Elite)

Sarf Malzemeler

1. Hazır Medyum, (Biological Industries, B-01-198-1B) Peripheral Blood Karyotyping Medium (Complete culture medium w/o phytohemagglutinin),
2. Fitohemagglutinin (Biological Industries, B1-12-006-1H)
3. Sitokalazin-B (Sigma, C-6762)
4. Dimetil sülfoksit, DMSO (Merck)
5. Heparin (Nevparin, Mustafa Nevzat İlaç Sanayi)
6. Giemsa (Merck, 5400512)
7. KH_2PO_4 (Merck, 9021622)
8. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck, K1690176)
9. Glasiyal asetik asit (Merck, 247K18855556)
10. Metanol (Merck, 502K05275408)
11. Ksilol (Merck, 207K037553)
12. Entellan® (Merck, 640171987)
13. İmmersiyon yağı® (Merck, 09403569)
14. KCL (Merck, 340TA611835)
15. Alkol (%96'lık Tekel)
16. Distile su
17. Tüplük
18. Çeşitli cam malzemeler
19. Konik tabanlı 10ml'lik steril kültür tüpü
20. Enjektör
21. Çeşitli ebatlarda puarlar
22. Pastör pipeti
23. Filtre Kağıdı (Whatman Filter Papers 125 mm)
24. Lam (İsolab, 76x26 mm)
25. Lamel (İsolab, 24x32 mm)

26. 8-OHdG Eliza Kiti (NWK- 8OHdG02, Northwest Life Science Specialties, LLC, WA, USA)

3.2. YÖNTEM

Çalışma Grubu

Bu çalışma Ekim 2012 ve Ekim 2014 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesine akut OF zehirlenmesi ile başvuran hastalar üzerinde yapıldı. Çalışma öncesi Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alındı (Etik kurul karar no: 2011/29). Çalışmada, akut OF zehirlenmesi ile başvuran 13 hasta ve hasta ile aynı yaş ve cinsiyetteki 13 sağlıklı kişi olmak üzere toplam 26 kişiden kan örnekleri toplandı. Hasta ve kontrol kişilerin yaşları, 17-67 yaş aralığı arasındaydı.

Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların isim, soy isim, dosya numarası, yaş, cinsiyet, yaşadığı yer ve telefon numaraları kaydedildi. Ayrıca hasta ve kontrol kişilerin, az miktarda (3 fincan) çay içen, son altı ayda şiddetli enfeksiyon yada viral hastalık geçirmeyen, herhangi bir ilaç kullanmayan, bilinen genotoksik kimyasal bir ajana maruz kalmamış olan, farklı bir beslenme alışkanlığı olmayan, hipertansiyon, diyetle regüle diyabet, kalp, kanser gibi herhangi bir hastalığı olmayan ve ailede de kanser öyküsü olmayan kişiler olmasına dikkat edildi. Çalışmaya katılan kişilere çalışmanın amacı anlatılarak, yazılı onayları alındı (Ek 1).

CBMN Sitom Yöntemi

CBMN yöntemine göre özetle, hastalardan alınan kan örnekleri hücre kültür medyumu içeren kültür tüplerine eklendi ve 72 saatlik tam kan kültürü yapıldı. Kültürün 44. saatinde sitokalazin-B (cyt-B) ilave edilerek binükleer hücrelerin oluşması sağlandı. 72 saatlik kültür sonrası kültür sonlandırılarak preparatlar hazırlandı (16, 22-26).

1. Kültür Ortamının (Besiyerinin) Hazırlanması

Kullanılan malzemeler ve miktarları;

<u>Malzeme</u>	<u>Miktarı</u>
Hazır Medyum	100 cc (complete culture medium)
Fitohemaglutinin	2.5 cc

Besiyeri, steril ortamda 100 cc'lik hazır medyum içine fitohemaglutinin eklenip, elle yavaş bir şekilde bir kaç kez karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan medyum yine steril ortamda 5'er cc olmak üzere steril vidalı kapaklı konik tabanlı kültür tüplerine bölünüp, 10-15 dakika laboratuarda bekletildikten sonra -20 °C'ye kaldırıldı.

2. Kan rneklerinin Alınması

Hastaların veya yakınlarının yazılı onayları alındıktan sonra, hastalardan tedaviye başlamadan önce ve tedavileri tamamlandıktan sonra olmak üzere iki kez heparinle yıkanmış enjektörlere 5 ml periferik kan örnekleri alındı. Sağlıklı kişilerden de yazılı onayları alındıktan sonra, heparinle yıkanmış enjektörlere 5 ml periferik kan örnekleri alındı.

3. Kültür Tekniği

Önceden 37 °C'ye getirilmiş olan 5 cc medyum içeren kültür tüplerine steril ortamda, alınan kan örneklerinin ilk 3-4 damlası dışarı atıldıktan sonra 12 damla (~0.4 ml) kan ilave edildi. Tüplerin zerine kişi adı yazıldı ve her bir kişi için 2 tüpe ekim yapıldı. Tüpler hafifçe karıştırılarak 37 °C' lik etüvde 44. saatte binükleer hücre elde etmek için cyt-B (final konsantrasyonu: 3µg/ml) eklenmek koşuluyla 72 saat kültüre edildi.

4. Çıkarım İşlemleri

MN elde etmek için kullanılan Fenech (16) metoduna göre ve bazı modifikasyonlarla (22-26) çıkarım işlemleri yapıldı.

1. 72 saat inkübasyondan sonra kültür tüpleri etüvden çıkartılarak 1200 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi.
2. Dipte 0.6-0.7 ml kalıncaya kadar üstteki süpernatantlar atıldı.
3. Daha sonra tüplere laboratuvar ısısında beklemiş olan 0.1 M hipotonik solüsyonundan 6 ml eklenerek 4 dakika laboratuvar ısısında bekletildi.
4. Hücreler hipotonik solüsyonunda bekletildikten sonra 1200 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi.
5. Süpernatantları atılıp üzerine taze hazırlanmış soğuk fiksatiften 6 ml (3:1, metanol: glasial asetik asit) yavaşça damla damla ilave edilip bekletmeden 6 dakika 1200 rpm'de santrifüj edildi.
6. Süpernatantları tekrar atılıp üzerine aynı fiksatiften 6 ml ilave edilip, 6 dakika 1200 rpm'de santrifüj edildi.
7. Dipte 0.7 ml fiksatifli hücre bırakılarak süpernatantları tekrar atıldı ve bir gün buzdolabında (+4 °C) bekletildi.

5. Preparat Hazırlama

Lamlar temizlenerek içinde %70'lik metanol bulunan şaleye yerleştirilip soğuyuncaya kadar buzdolabı buzluğunda bekletildi. Daha sonra şaleden çıkarılan lamlar iyice kurulandı. Pastör pipeti ile fiksatifli hücre içeren kültür tüplerine pipetaj yapılarak hücre süspansiyonundan pastör pipeti yardımıyla lamlara yakın mesafeden (1- 2 cm yukarıdan)

9-10 damla damlatıldı. Lamlara hafifçe üflenerek hücrelerin lam üzerine iyice dağılması sağlandı ve kurumaya bırakıldı. Her bir kişi için, bir kültür tüpünden 2 tane olmak üzere toplam 4 preparat hazırlandı. Her kültür tüpü için ayrı pastör pipeti kullanılarak farklı preparatlar hazırlandı ve lamlar ayrı ayrı kodlandı.

6. Preparatların Boyanması ve Saklanması

Sorenson boya tamponu (pH=7.0):

Sorenson boya tamponu 5.26 g KH_2PO_4 ve 8.65 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılıp distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

94 ml Sorenson boya tamponu üzerine 6 ml giemsa boyası eklenerek giemsa boyası hazırlandı. Kurumuş olan preparatlar yeni hazırlanan % 6'lık giemsa da 8 dakika boyandıktan hemen sonra 2 kez distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar ksilolden geçirildikten sonra entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.

7. Lamların İncelenmesi

Hazırlanan preparatlarda ışık mikroskobunda X40 büyütmede;

DNA hasarı için; 1000 binükleer hücre sayıldı ve bulunan MN sayıları kaydedildi.

Sitokinezi bloke edilmiş binükleer hücreler, MN frekansını değerlendirebilmek için aşağıdaki kriterleri içermek zorundadırlar (16) :

- Hücreler iki çekirdekli olmalıdır.
- BN hücredeki iki çekirdeğin boyutu yaklaşık olarak aynı olmalı ve yoğun boyanmalıdır.

- BN hücredeki iki çekirdek, nükleoplazmik bir köprü ile bağlanabilir. Bu nükleoplazmik köprü, çekirdek çapının $\frac{1}{4}$ 'ünden büyük olmamalıdır.
- BN hücredeki iki çekirdek birbirine temas edebilir, ancak ideal olarak birbirinin üzerine çıkmamış olmalıdır. İki çekirdeği üst üste çıkmış olan bir hücre eğer her bir çekirdeğin çekirdek sınırları ayırt edilebiliyorsa sayılmalıdır.
- BN hücrenin sitoplazmik sınırı ya da zar yapısı bozulmamış olmalı ve komşu hücrelerin sitoplazmik sınırından açıkça ayırt edilebilmelidir.

MN sayma kriterleri:

MN'lar morfolojik olarak çekirdek ile aynı ancak çekirdekten daha küçüktür. MN özellikleri aşağıda belirtilmiştir (16) :

- a) İnsan lenfositlerindeki MN'ların çapı, genellikle ana çekirdeğin ortalama çapının $\frac{1}{16}$ ve $\frac{1}{3}$ 'ü arasında değişebilir.
- b) MN'lar kırılmalı olmamalıdır ve böylece boyanan partiküller gibi artefaktlardan kolayca ayırt edilebilir olmalıdır.
- c) MN'lar ana çekirdekle birleşmiş veya bağlantılı olmamalıdır.
- d) MN'lar ana çekirdeğe temas edilebilir ancak üstüne binmiş olmamalıdır ve mikronükleer sınır çekirdek sınırından ayırt edilebilir olmalıdır.
- e) MN'lar genellikle ana çekirdekle aynı yoğunlukta boyanmalıdır, ana çekirdek bazen daha yoğun (koyu) boyanabilir.
- f) Hücrelerin 6 tane MN'dan daha fazlasını içermemesi gerekir.

8. CBMN Sitom yöntemi diğer parametrelerinin belirlenmesi

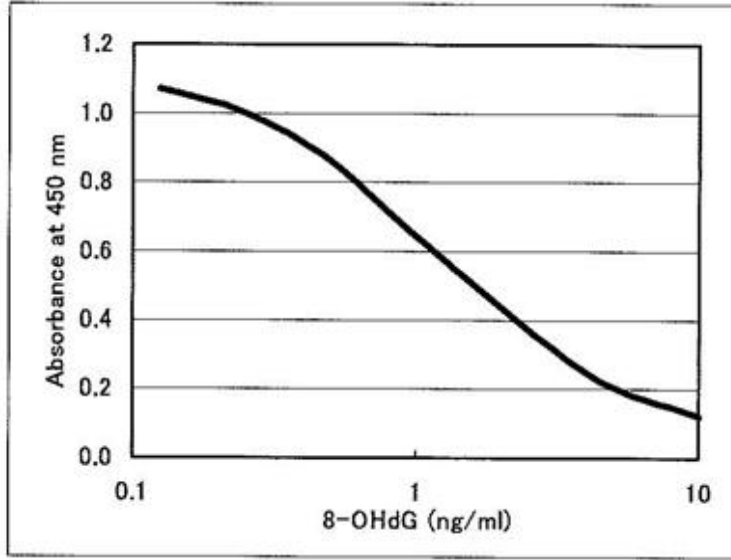
Aynı preparatlarda mikronükleuslu hücreler sayılırken, gözlenen metafaz sayısı, apoptotik ve nekrotik hücre sayıları, nükleer budlar ve nükleoplazmik köprülü hücre sayıları da kaydedilecek ve 1000 tane bir çekirdekli (mononükleer) hücre sayılırken aynı zamanda iki çekirdekli, üç çekirdekli, dört çekirdekli (binükleer, trinükleer ve tetranükleer) her bir hücre kaydedilecek ve Nükleer Bölünme İndeksi (NDI) oranları da hesaplanacaktır (16).

9. 8-OHdG seviyelerinin belirlenmesi

Kan örnekleri alındıktan hemen sonra 1500 devirde 10 dk santrifüj edilerek plazmaları ayırt edildi ve çalışma yapılncaya kadar plazma örnekleri -80°C 'de depolandı (25, 26). Plazma 8-OHdG seviyesi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında bulunan Biotek Marka ELISA cihazında, ticari kit (Northwest Life Science Specialties, LLC, WA, USA) kullanılarak belirlendi.

İşlem: Reaktiflerin tamamı oda ısısına getirildi. Plaka üzerinde standartların ve örneklerin konulacağı kuyucuklar belirlendi, 50 μL standartlardan ve örneklerden kendileri için belirlenen kuyucuklara eklendi. Blank için ayrılan kuyucuğa da 50 μL PBS eklendi. Sulandırılmış primer antikordan blank haricindeki bütün gözlere 50 μL ilave edilip, içeriğin düzgün karışmasını sağlamak için plaka hafifçe çalkalandı. Ağız kısmına kapak yapıştırılan plaka bir gece boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakıldı. İçeriği boşaltılan kuyucukların her birine 250 μL yıkama tamponu ilave edilip, yıkamadan iyi sonuç almak için plaka yavaşça sallandıktan sonra içeriği boşaltıldı ve yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. Yıkama işleminin ardından sulandırılmış sekonder antikordan her bir göze 100 μL eklenip, içeriğin karıştığından emin olmak için yavaşça çalkalandı. Yapışkan bant ile ağız kapatılan plaka oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası plaka içeriği boşaltıldı ve yıkama işlemi üç defa tekrarlandı. Plakanın her gözüne 100 μL TMB substrat eklendikten sonra hafifçe karıştırılarak karanlıkta ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Her bir göze 100

μL stop solüsyonu eklenerek 450 nm’de absorbansı okundu. Standart eğri ELISA kiti içinde mevcut olan standardize edilmiş örneklerden elde edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Standart Kalibrasyon Eğrisi

10. Hormon düzeylerinin belirlenmesi

Hastalardan alınan kan örneklerinde, kortizol, ACTH, IGF-1, GH, TT, ST4, ST3, TSH, PRL, FSH, LH, E2 hormon düzeyleri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında rutin yöntemlerle belirlendi.

11. İstatistiksel Değerlendirme

Hastalara ve kontrollere ait CBMN sitom yöntemi parametreleri ve plazma 8-OHdG seviyeleri istatistiksel olarak nonparametrik testlerden Mann-Whitney U testi ve Wilcoxon testi ile karşılaştırıldı. Ayrıca hastalara ait CBMN sitom yöntemi parametreleri ve plazma 8-OHdG seviyelerinin, yaş ve hipofiz hormonları ile ilişkisi Pearson korelasyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama±standart sapma olarak verildi. P değeri < 0.05 olduğunda anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda akut OF zehirlenmesi ile başvuran 20 hasta toplanması planlanmasına rağmen, akut OF zehirlenmesi ile 15 hastadan kan örneği toplanabilmiş ve bu hastalardan 2'sinin tedavi sonrası kanı alınamamıştır. Dolayısıyla 13 hastadan ve benzer özelliklere sahip 13 sağlıklı kişiden alınan kan örnekleri materyal ve metotta belirtilen yöntemlere göre kültüre edildi ve kültür sonunda preparatları hazırlandı. Hazırlanan preparatlar CBMN Sitom yöntemine göre CBMN Sitom yöntemi parametreleri için değerlendirildi. Ayrıca, bu hasta ve kontrol kişilere ait plazma örneklerinde 8-OHdG seviyeleri de ölçüldü.

CBMN Sitom yöntemine göre, elde edilen preparatlar mikroskopta incelenerek, DNA hasarını belirlemek için, 1000 kadar binükleer hücreler sayıldı ve MN'lu, nükleer budlu ve nükleoplazmik köprülü binükleer hücreler kaydedildi. Ayrıca, 1000 tane bir çekirdekli (mononükleer) hücre sayılırken apoptotik ve nekrotik hücre sayıları kaydedildi ve aynı zamanda iki çekirdekli, üç çekirdekli, dört çekirdekli (binükleer, trinükleer ve tetranükleer) her bir hücre kaydedildi ve Nükleer Bölünme İndeksi (NDI) oranları da hesaplandı.

$$NDI = (M1 + 2 M2 + 3 M3 + 4 M4 / N)$$

M1- M4; 1-4 çekirdek içeren hücrelerin sayısını belirtir ve N, hesaplanan toplam canlı hücre sayısını belirtir (nekrotik ve apoptotik hücreler hariç).

Ayrıca, hastalardan alınan kan örneklerinde, ACTH, IGF-1, GH, TT, ST4, ST3, TSH, PRL, FSH, LH, E2 hormon düzeyleri belirlendi.

Akut OF zehirlenmesi olan 13 hasta ve 13 sağlıklı kontrol kişiye ait yaş, hormon düzeyleri, 8-OHdG seviyeleri ve CBMN sitom yöntemi parametrelerinin ortalama değerleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Akut OF zehirlenmesi olan 13 hasta ve 13 sağlıklı kontrol kişiye ait yaş, hormon düzeyleri, 8-OHdG seviyeleri ve CBMN cyt yöntemi parametrelerinin ortalama değerleri (ort ± S.S.).

	Tedavi öncesi hastalar	Tedavi sonrası hastalar	Kontrol kişiler	P değeri ^a (Wilcoxon Test)
Yaş (yıl)	42,23±16,09		42,23±15,08	
MN frekansı (%)	2,72±1,31**	2,05±0,94**	0,82±0,38	< 0,05
NPB'li BN hücre frekansı (%)	4,72±4,29	2,98±2,74	2,15±1,01	< 0,05
NBUD'lu BN hücre frekansı (%)	1,17±1,68	0,63±0,61*	0,94±0,46	> 0,05
Apoptotik hücre sayısı (%)	3,36±3,56**	2,09±1,90	1,29±0,66	< 0,05
Nekrotik hücre sayısı (%)	5,46±5,03	2,90±1,62	2,96±1,32	< 0,05
BN hücre frekansı (%)	23,15±13,65	24,16±18,32	24,65±10,54	> 0,05
Nükleer bölünme indeksi (NDI)	1,21±0,12	1,21±0,14	1,23±0,07	> 0,05
8-OHdG seviyesi (ng/mL)	0,47±0,41*	0,33±0,23**	0,64±0,19	> 0,05
ACTH	25,14±13,48	20,30±6,21		> 0,05
IGF-1	162,32±90,77	150,31±91,08		> 0,05
GH	0,62±0,86	0,41±0,47		> 0,05
ST3	2,71±0,43	2,50±0,49		> 0,05
ST4	1,19±0,25	1,34±0,31		> 0,05
TSH	2,37±2,91	2,06±2,03		> 0,05
E2	23,73±15,66	27,48±12,47		> 0,05
FSH	7,15±10,17	6,07±7,55		> 0,05
LH	5,58±6,44	5,39±3,58		> 0,05
PRL	19,67±16,87	10,42±6,27		> 0,05
TTes	157,07±139,89	187,24±152,42		> 0,05
P değeri (Mann-Whitney U Test)	* < 0,05 ** < 0,01	* < 0,05 ** < 0,01		

^a Tedavi öncesi ve sonrası hastalar arasında karşılaştırma.

* ve ** kontrol kişilerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değerler.

Akut OF zehirlenmesi olan hastalara ait tedavi öncesi ve sonrası hormon düzeyleri, 8-OHdG seviyeleri ve CBMN sitom yöntemi parametreleri karşılaştırıldığında, tedavi sonrasında MN ve NPB frekanslarının ve apoptotik ve nekrotik hücre frekanslarının azaldığı bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 4.1). Hastalara ait tedavi öncesi ve sonrası hormon düzeyleri arasında ise bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$).

Akut OF zehirlenmesi olan hastaların tedavi öncesi ve sonrası ile kontrollere ait CBMN sitom yöntemi parametreleri ve 8-OHdG seviyeleri karşılaştırıldığında, tedavi öncesi ve sonrası hastaların MN frekanslarının kontrollere göre önemli derecede yüksek ($p < 0.01$), tedavi sonrası hastaların NBUD frekansının kontrollere göre daha düşük ($p < 0.05$), tedavi öncesi hastaların apoptotik hücre frekansının kontrollere göre oldukça yüksek ($p < 0.01$) ve tedavi öncesi ve sonrası hastaların 8-OHdG seviyelerinin kontrollere göre önemli derecede düşük (sırasıyla, $p < 0.05$ ve $p < 0.01$) olduğu bulunmuştur (Tablo 4.1).

Ayrıca hastalara ait tedavi öncesi ve sonrası CBMN sitom yöntemi parametreleri ve plazma 8-OHdG seviyelerinin, yaş ve hipofiz hormonları ile ilişkisi Pearson korelasyon analizi ile değerlendirildi. Buna göre, yaş ile tedavi öncesi ($r: 0.651$, $p: 0.016$) ve sonrası ($r: 0.668$, $p: 0.013$) NPB frekansları, tedavi sonrası NBUD ($r: 0.640$, $p: 0.018$) frekansları arasında; tedavi sonrası GH ile tedavi sonrası NPB hücre frekansı ($r: 0.712$, $p: 0.032$) ve tedavi sonrası NBUD hücre frekansı ($r: 0.778$, $p: 0.013$) arasında; tedavi sonrası ST3 ile tedavi sonrası apoptotik hücre frekansı ($r: -0.760$, $p: 0.007$) ve tedavi sonrası nekrotik hücre frekansı ($r: -0.767$, $p: 0.006$) arasında; tedavi sonrası ST4 ile tedavi sonrası apoptotik hücre frekansı ($r: -0.656$, $p: 0.028$) ve tedavi sonrası nekrotik hücre frekansı ($r: -0.691$, $p: 0.019$) arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmuştur.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Projede hedeflenen 20 akut OF zehirlenmesi olan hastadan ancak 15 hastanın ve benzer özelliklere sahip 13 sağlıklı kişinin kan örnekleri toplanmıştır. Yine bu hastalardan 2'sinin tedavi sonrası kanı alınamamıştır. Dolayısıyla 13 hastanın ve 13 sağlıklı kişinin preparatları CBMN Sitom yöntemi parametreleri için incelenmiş ve plazma örneklerinde 8-OHdG seviyeleri de ölçülmüştür.

Ayrıca, hastalardan alınan kan örneklerinde, ACTH, IGF-1,GH,TT, ST4, ST3, TSH, PRL, FSH, LH, E2 hormon düzeyleri de ölçülmüştür.

Günümüzde kullanılan böcek öldürücü kimyasal maddeler, organofosfatlı bileşikler, karbamatlar, organoklorinler ve pretrinler olmak üzere dört grupta toplanır (1, 9). Tarım sektöründe sıklıkla kullanılan bileşikler olduğu için organofosfat zehirlenmelerine özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde sık rastlanmaktadır. Zehirlenmeler, bu kimyasalların üretim, taşınma ve kullanım alanlarında, evde kaza sonucu ve intihar amaçlı oluşabilir. OF'lu

bileşiklere maruziyeti takiben genellikle 30 dakika ile 3 saat içinde zehirlenme bulguları görülür (10).

CBMN sitom yöntemi ile, kromozom instabilitesi/genom hasarı, hücre çoğalması, hücre ölümü tespit edilebilmektedir. DNA hasarı için; MN'lu, NPB'lü, ve NBUD'lu binükleer hücreler sayılır. Hücre çoğalması mononükleer, binükleer, multi nükleer hücreler, skorlanarak hücre çoğalma oranları (NDI) hesaplanır. Hücre ölümü için; apoptotik ve nekrotik hücreler skorlanarak hücre canlılık oranı belirlenir. Dolayısıyla, hem in vivo genotoksinlere maruz kalma hem de in vitro genotoksisite çalışmalarında, CBMN sitom yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır (16). Ayrıca, 8-OHdG ölçümü, DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilmekte olup oksidatif DNA hasarını belirlemek için yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir (17-19).

Yapılan literatür incelemesine göre; akut OF intoksikasyonun genom üzerine etkileri ile ilgili sadece bir çalışma bulunabilmiştir (7). Bu çalışmada OF zehirlenmesine maruz kalan kişilerde tedaviye başlanmadan önce ve tedaviden sonra kan örneklerinde MN, kardeş kromatid değişimi (KKD) ve NDI değerlendirilmiş ve tedavi öncesi ile tedavi sonrası MN ve KKD değerleri arasında fark bulunamazken, NDI değerlerinde önemli artış göstermişlerdir (7). Bizim çalışmamızda ise, akut OF intoksikasyonuna maruz kalan bireylerin tedaviye başlanmadan önce ve tedaviden sonraki lenfositlerinde hem CBMN sitom yöntemi ile; MN'un dışında kromozom /genom hasarı (MN, NPB ve NBUD'lar skorlandı), hücre çoğalma indeksi (mononükleer, binükleer, multi nükleer hücreler skorlandı, NDI oranları hesaplandı) ve hücre ölüm oranı (apoptotik ve nekrotik hücreler skorlandı) hem de oksidatif DNA hasarı (8-OhdG düzeyleri ölçümü ile) değerlendirildi. Bu çalışmanın tersine, akut OF zehirlenmesi olan hastalara ait tedavi öncesi ve sonrası hormon düzeyleri, 8-OHdG seviyeleri ve CBMN sitom yöntemi parametreleri karşılaştırıldığında, tedavi sonrasında MN ve NPB frekanslarının

ve apoptotik ve nekrotik hücre frekanslarının azaldığı bulunurken ($p<0.05$), tedavi öncesi ve sonrası NDI değerleri arasında fark bulunamadı ($p>0.05$).

Ayrıca, CBMN sitom yöntemi parametreleri ve 8-OHdG seviyeleri, akut OF zehirlenmesi olan hastaların tedavi öncesi ve sonrası değerleri kontrollere ait değerler ile karşılaştırıldığında, tedavi öncesi ve sonrası hastaların MN frekanslarının kontrollere göre önemli derecede yüksek ($p<0.01$), tedavi sonrası hastaların NBUD frekansının kontrollere göre daha düşük ($p<0.05$), tedavi öncesi hastaların apoptotik hücre frekansının kontrollere göre oldukça yüksek ($p<0.01$) ve tedavi öncesi ve sonrası hastaların 8-OHdG seviyelerinin kontrollere göre önemli derecede düşük (sırasıyla, $p<0.05$ ve $p<0.01$) olduğu bulunmuştur.

Diğer taraftan, hastalara ait tedavi öncesi ve sonrası hormon düzeyleri arasında ise bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Ancak, hastalara ait tedavi öncesi ve sonrası CBMN sitom yöntemi parametrelerinin ve plazma 8-OHdG seviyelerinin, yaş ve hipofiz hormonları ile ilişkisi Pearson korelasyon analizi ile değerlendirildiğinde, yaş ile tedavi öncesi ve sonrası NPB frekanslarının ($p<0.05$), ve tedavi sonrası NBUD frekanslarının ($p<0.05$) arttığı; tedavi sonrası GH ile tedavi sonrası NPB hücre frekansının ($p<0.05$) ve tedavi sonrası NBUD hücre frekansının ($p<0.05$) arttığı; tedavi sonrası ST3 ile tedavi sonrası apoptotik hücre frekansının ($p<0.01$) ve tedavi sonrası nekrotik hücre frekansının ($p<0.01$) azaldığı; tedavi sonrası ST4 ile tedavi sonrası apoptotik hücre frekansının ($p<0.05$) ve tedavi sonrası nekrotik hücre frekansının ($p<0.05$) azaldığı bulunmuştur.

Sonuç olarak, araştırmamızda, akut OF intoksikasyonuna maruz kalan bireylerin lenfositlerinde hem kromozomal (CBMN sitom yöntemi ile) hem de oksidatif DNA düzeyinde (8-OhDG düzeyleri ölçümü ile) genom hasarı incelenmiştir. Akut OF intoksikasyonuna maruz kalan bireylerin tedavi sonrasında MN ve NPB'lü hücre frekanslarının ve apoptotik ve nekrotik hücre frekanslarının azaldığı gösterilmiştir. Kontrollerle karşılaştırıldığında ise,

tedavi öncesi ve sonrası hastalara ait MN frekanslarının daha yüksek, NBUD frekansının daha düşük, apoptotik hücre frekansının daha yüksek, ve 8-OHdG seviyelerinin önemli derecede düşük olduğu da gösterilmiştir.

Çalışmamız, akut OF intoksikasyonuna maruz kalan kişilerin lenfositlerinde, MN dışında, şimdiye kadar çalışılmamış olan CBMN sitom parametrelerinin ve şimdiye kadar hiç araştırılmamış olan oksidatif DNA hasarının belirlenmesi yönüyle ilk çalışmadır. Aynı zamanda, hipofiz hormonları ile CBMN sitom parametreleri ve 8-OHdG düzeyleri arasında olası bir ilişkinin araştırılması yönüyle de ilk çalışmadır.

KAYNAKLAR

1. Robey WC, Meggs WJ, Tintinalli JE, et al. Insecticides, herbicides, rodenticides. Emergency Medicine 6th ed. New York; McGraw-Hill Co 2004:1134-1143.
2. Muniz JF, McCauley L, Scherer J, Lasarev M, Koshy M, Kow YW, Nazar-Stewart V, Kisby GE. Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. Toxicol Appl Pharmacol. 2008, 227:97-107.
3. Webster LR, McKenzie GH, Moriarty HT. Organophosphate-based pesticides and genetic damage implicated in bladder cancer. Cancer Genet Cytogenet. 2002, 33:112-7.
4. Singh S, Kumar V, Thakur S, Banerjee BD, Rautela RS, Grover SS, Rawat DS, Pasha ST, Jain SK, Ichhpujani RL, Rai A. Paraoxonase-1 genetic polymorphisms and susceptibility to DNA damage in workers occupationally exposed to organophosphate pesticides. Toxicol Appl Pharmacol. 2011;252:130-7.
5. Atherton KM, Williams FM, Egea González FJ, Glass R, Rushton S, Blain PG, Mutch E. DNA damage in horticultural farmers: a pilot study showing an association with organophosphate pesticide exposure. Biomarkers. 2009 ;14:443-51.
6. Kisby GE, Muniz JF, Scherer J, Lasarev MR, Koshy M, Kow YW, McCauley L. Oxidative stress and DNA damage in agricultural workers. J Agromedicine. 2009;14:206-14.
7. Satar S, Kayraldiz A, Rencuzogullari E, Karakoc E, Sebe A, Avci A, Yesilagac H, Topaktas M. The genotoxicity and cytotoxicity among patients diagnosed with organophosphate poisoning. Bratisl Lek Listy. 2009;110:476-9.
8. Güven M, Bayram F, Unlühizarci K, Keleştimur F. Endocrine changes in patients with acute organophosphate poisoning. Hum Exp Toxicol. 1999; 18:598-601.
9. Guven M, Sungur M. Organophosphorus poisoning and future directions. Current Topics in Toxicol 2005;2: 57-65.

10. Joshi S, Biswas B, Malla G. Management Of Organophosphorus Poisoning. Update in Anaesthesia 2005; 19:1-2.
11. Kwong TC. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. Ther Drug Monit 2002;24:144-149.
12. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutat Res 1985; 147: 29-36.
13. Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, et al. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. Mutat Res 2008; 658: 215-233.
14. Iarmarcovai G, Ceppi M, Botta A, et al. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis. Mutat Res 2008; 659: 274-283.
15. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, et al. HUMAN Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. Mutat Res 2003; 534: 65-75.
16. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nat Protoc 2007; 2:1084-1104.
17. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB J ; 17:1195- 214, 2003
18. Chen HI, Liou SH, Ho SF, Wu KY, Sun CW, Chen MF, Cheng LC, Shih TS, Loh CH. Oxidative DNA damage estimated by plasma 8-hydroxyguanosine (8-OHdG): Influence of 4, 4'-methylenebis (2-chloroaniline) exposure and smoking. J Occup Health; 49: 389-98, 2007.
19. Dincer Y, Erzin Y, Himmetoglu S, Gunes KN, Bal K, Akcay T. Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease. Dig Dis Sci; 52: 1636-41, 2007.
20. Luan Y, Suzuki T, Palanisamy R, Takashima Y, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Saito M, Matsufuji H, Yamagata K, Yamaguchi T, Hayashi M, Honma M. Potassium

- bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells. *Mutat Res*; 619: 113-23, 2007.
21. Hamurcu Z, Cakir I, Donmez-Altuntas H, Bitgen N, Karaca Z, Elbuken G, Bayram F. Micronucleus evaluation in mitogen-stimulated lymphocytes of patients with acromegaly. *Metabolism*. 2011 May 5. [Epub ahead of print]
22. Donmez-Altuntas H, Bitgen N. Evaluation of the genotoxicity and cytotoxicity in the general population in Turkey by use of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutat Res*. 748: 1-7 (2012). *Mutat. Res.: Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.05.013>
23. Dönmez-Altuntas H, Dumlupinar G, Imamoglu N, Hamurcu Z, Liman B. C. Effects of the mycotoxin citrinin on micronucleus formation in a cytokinesis-block genotoxicity assay in cultured human lymphocytes. *J Appl Toxicol*; 27: 337-41, 2007.
24. Hamurcu Z., Dönmez-Altuntaş H., Patıroğlu T., Basal level micronucleus frequency in stimulated-lymphocytes untreated patients with leukemia. *Cancer Genet and Cytogenet*, 2008; 180:140-144.
25. Hamurcu Z., Saritaş N., Başkol G., Akpınar N.. Effect of wrestling exercise on oxidative DNA damage, nitric oxide level and paraoxonase activity in adolescent boys. *Pediatr Exerc Sci*, 2010; 22:60-8 ()
26. Hamurcu Z., Bayram F., Kahriman G., Dönmez-Altuntas H., Baskol G.. Micronucleus frequency in lymphocytes and 8-hydroxydeoxyguanosine level in plasma of women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*, 2010; 26:590-595.

Ek 1:

GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

PROJE NO	
Başvuru Tarihi	27.05.2011
Proje Süresi (ay)	24
İlgili Alt Komisyon	

Gönüllünün (Hastalar için) _____

Adı, Soyadı, Adresi :

Varsa protokol ve Tel. No :

BİLGİLENDİRME

Bu katıldığınız çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın adı “Akut Organofosfat İntoksikasyonuna Maruz Kalan Bireylerin Lenfositlerinde CBMN Sitom Yöntemi ve Plazmalarında 8-OHdG Ölçümü ile Kromozomal ve Oksidatif DNA Hasarının Adrenal, Hipofiz, Tiroid Hormonlarında Meydana Gelen Değişikliklerin, ve Birbirleri ile İlişkilerinin Araştırılması”dır.

Bu araştırmanın amacı organofosfat(OF) intoksikasyonu ile İç Hastalıkları Yoğun Bakım Ünitesine yatırılan hastalarda yatışının ilk günü ve tedavi edildikten sonra 15 cc kan alınıp OF zehirlenmelerine maruz kalan bireylerde DNA hasarının belirlenmesi için tedavi öncesi ve tedavi sonrası durum karşılaştırılacaktır.

Pestisitler, tarım sektöründe sıklıkla kullanılan bileşiklerdir. Özellikle organofosfatlar yoğun olarak kullanılan pestisitler arasındadır. Bu nedenle organofosfat (OF) zehirlenmeleri özellikle az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde sık görülmektedir. Zehirlenme; bu kimyasalların üretim, taşınma ve kullanım alanlarında yada evde kaza sonucu oluşabilir. OF’ların emilimi solunum yolundan, sindirim sisteminden, konjonktivadan, deriden ve mukozalardan olur. Yaygın olarak kullanılan bu kimyasal maddelerin yiyeceklere bulaşması ile kitlesel zehirlenme olasılığı da vardır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde intihar amaçlı OF kullanımı önemli bir sorundur.

Yapılan çalışmalarla, tarım ilaçlarına (pestisitlere) maruz kalma ile kanser, Parkinson ve diğer birçok nörolojik hastalıkların gelişimi arasında ilişki olduğu gösterilmiş olup bu ilişkinin DNA hasarı ve oksidatif strese bağlı olduğu ileri sürülmektedir.

Organofosfat pestisitlerinin de genotoksik etkilerinin olduğu birçok çalışmalarla desteklenmiştir. Böylece, OF’ın DNA hasarı üzerine olan etkileri tarım ile uğraşan (kullanım) veya diğer mesleki olarak (üretim, taşıma gibi) OF’a maruz kalan bireylerin lenfositlerinde araştırılmıştır (2-6). Ancak, literatür araştırmasında akut organofosfat intoksikasyonun genom üzerine etkileri ile ilgili sadece bir çalışmaya rastlanılmıştır.

Bu nedenle, çalışmamızda akut OF intoksikasyonuna maruz kalan bireylerin lenfositlerinde hem CBMN sitom yöntemi ile kromozom /genom hasarı, hücre çoğalma indeksi ve hücre ölüm oranı incelenerek hem de oksidatif DNA hasarı tespit edilerek akut OF intoksikasyonunun genom instabilitesi üzerine etkileri araştırılacaktır.

Ayrıca OF'ların endokrin sistem üzerine özellikle de hipofiz hormonları üzerine etkilerinin olduğu ileri sürülmüştür (8). Bundan dolayı çalışmamızda, akut OF intoksikasyonuna maruz kalan bireylerde, Kortizol, Adrenokortikotropik hormonun (ACTH), serbest tiroksin (ST4) ve serbest triiyodotironin (ST3), hipofizer tiroidi uyaran hormon tirotropin (TSH), prolaktin (PRL), İnsuline-benzer Büyüme Faktörü-1 (IGF-1), Büyüme Hormonu (GH), Folikül Uyarıcı Hormon (FSH), Lüteinize Edici Hormon (LH), Total Testosteronun (TT), Serbest Testosteron (ST), Östradiol (E2) düzeyleri incelenerek hem bu hormonlar üzerine OF'ın etkileri değerlendirilecek hem de bu hormonlarla genom hasarı arasında bir ilişkinin olup olmadığı araştırılacaktır.

Bu çalışma yapılırken hastaya normal uyguladığımız tıbbi tedavide herhangi bir değişiklik yapılmayacaktır. Hastadan bu çalışma için kan alınırken hastaya yan etkisi olacak herhangi bir işlem yapılmayacaktır.

Bu çalışmada sizin alacağınız hiçbir sorumluluğunuz yoktur.

Fakültemiz Etik Kurulu bu çalışmanın Helsinki Deklerasyonunda belirtilen maddelere göre ahlaki, vicdani ve tıbbi kurallara uygun olduğunu onaylamış olup çalışma denetime açıktır. Çalışma öncesinde bu tıbbi uygulama ile ilgili tedaviyi istediğinize dair bir evrak imzalamanız gerekmektedir. Bu çalışmaya katılmakta özgürsünüz. Başlangıçta kabul edip daha sonra fikir değiştirip, hiçbir gerekçe göstermeden çalışmadan ayrılabilirsiniz. Bu durumda sizinle ilgili tıbbi özende bir değişiklik olmayacaktır.

GÖNÜLLÜ ONAMI

Aşağıda imzası bulunan ben, Akut Organofosfat İntoksikasyonuna Maruz Kalan Bireylerin Lenfositlerinde CBMN Sitom Yöntemi ve Plazmalarında 8-OHdG Ölçümü ile Kromozomal ve Oksidatif DNA Hasarının Adrenal, Hipofiz, Tiroid Hormonlarında Meydana Gelen Değişikliklerin, ve Birbirleri ile İlişkilerinin Araştırılması planlanan , klinik çalışma hakkında,

Dr.....'dan tam olarak bilgi aldığımı beyan ederim. Bu ilacın/ tıbbi uygulamanın etki açısından Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nun kurallarına uygun olarak incelendiğini ve planlanan doz/ yöntemin insanlara uygulanmasının sakıncalı olmayacağı bana anlatıldı. Ayrıca bana, bu çalışmanın tıbbi olarak geçerli olduğu ve en son bilimsel yöntemlere uygun olarak yapılacağı bildirildi.

Bunun, denetime açık bir çalışma olduğu bana anlatıldı.

Beni muayene eden doktora, daha önceki ve şu andaki tüm hastalıklarımı ve şu anda uygulanan tedaviyi bildirdiğimi teyid ederim. Son dört haftada herhangi bir çalışmada yer almadım.

Yalnızca kadınlar için: Yukarıda belirtilen doktor, tıbbi olarak geçerli bir doğum kontrol yöntemiyle korunmam gerektiğini ve hamile kalmam halinde çalışmayı bırakmak zorunda olduğumu açıkladı.

Aşağıda imzası bulunan doktordan bu bilgileri aldıktan sonra ben, yapılması planlanan çalışmanın özelliklerini ve sonuçlarını (muhtemel geçici yan etkiler de dahil) anlıyorum. Bana verilen bu bilgiler temelinde, istediğim herhangi bir zaman, hiçbir sakınca olmadan, çalışmadan çekilebileceğimi teyid ediyorum.

Araştırma sonuçlarının eğitim ya da bilimsel amaçlarla kullanılması sırasında mahremiyetime saygı gösterileceğine inanıyorum. Bu şartlar altında sözkonusu araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Tarih:

Bilgilendirmeyi yapan

Katılımcı

Kuruluş Görevlisi Tanık

Dr. Adı, Soyadı

Adı, Soyadı

Adı, Soyadı

İmza:

İmza:

İmza:

Not: Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasisinin onamı alınacaktır.

Not: Bu çalışma Erciyes Üniversitesi BAP tarafından desteklenmiştir.