AKDENİZ ANEMİLİ (BETA TALASEMİ MAJORLU) HASTALARIN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDEKİ GENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN GENOTOKSİSİTE TESTLERİYLE BELİRLENMESİ

Hafize GÖKÇE

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ŞUBAT 2012
ANKARA

Hafize GÖKÇE tarafından hazırlanan "AKDENİZ ANEMİLİ (BETA TALASEMİ MAJORLU) HASTALARIN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDEKİ GENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN GENOTOKSİSİTE TESTLERİYLE BELİRLENMESİ" adlı bu tezin Doktora tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU .....
Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Talia İLERİ .....
Ortak Tez Danışmanı, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof Dr. Zümrüt UYSAL .....
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, A.Ü.

Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU ……..
Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü.

Prof. Dr. Fatma ÜNAL …….
Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü.

Doç. Dr. Barbaros BALABANLI .....
Biyoloji Anabilim Dalı, G.Ü.

Doç. Dr. Serkan YILMAZ .....
Sağlık Bilimleri Fakültesi, A.Ü.

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Doktora derecesini onamıştır.

Tarih: 05/03/2012

Prof. Dr.Bilal TOKLU **…….**
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Hafize GÖKÇE

AKDENİZ ANEMİLİ (BETA TALASEMİ MAJORLU) HASTALARIN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDEKİ GENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN GENOTOKSİSİTE TESTLERİYLE BELİRLENMESİ
(Doktora Tezi)

Hafize GÖKÇE

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Şubat 2012

ÖZET

Talasemi major (TM), hemoglobinin globin zincirlerinde yapım azlığı veya hiç yapılamaması sonucu ortaya çıkan hematolojik bir hastalıktır. Hastaların büyük bir kısmının eritrosit desteğiyle yaşamlarını sürdürmek zorunda kalmaları bazı komplikasyonların gelişmesine de yol açar. Bunu önlemek amacı ile organlarda birikmiş demiri atmak için "desferroksamin (DFO), deferiprone (DFP), deferasiroks" adlı demir bağlayıcı ilaçlar kullanılmaktadır. Demir bağlayıcı ilaçlar her ne kadar biriken demiri uzaklaştırsa da son yıllarda yapılan çalışmalar bu ilaçların genotoksik etkilerinin olabileceğini gösterir yöndedir.

Bu çalışmanın amacı, talasemili hastalarda kullanımı zorunlu olan Desferroksamin, Deferiprone ve Deferasiroks ilaçlarının olası genotoksik etkilerini belirlemektir. Aynı zamanda saptanan değişikliklerin demir yükü ile ilişkisi araştırılmıştır. Bu amaçla 51 talasemik hastada ve 30 sağlıklı kişide Kromozomal Anormallik (KA), Kardeş Kromatit Değişimi (KKD), Mikronükleus (MN) ve Comet testleri ile yapısal kromozom değişimleri ve primer DNA hasarı saptanmaya çalışılmıştır.

Bu çalışmada yaşlara göre kromozomal anormallik frekansı değerlendirildiğinde, 0-20 yaş aralığındaki hastalarda kontrole göre anlamlı artış saptanmış; bununla fakat 20 yaştan büyük hastalarda kontrole göre bir anlamlılık gözlenmemiştir. DFO ve Deferasiroks tedavisi kullanan hastalarda kromozomal anormallik frekansı artmıştır. Ancak DFO+DFP kombine şelasyon tedavisi alan grubun yaş ve ferritin değerlerinin yüksekliğine rağmen, kromozomal anormallik frekansları kontrole göre bir farklılık göstermemiştir. TM'lü olgularda, yaş ile ters orantılı olarak mitotik indeksin düştüğü ve bu azalışın sağlıklı bireylerden daha fazla olduğu saptanmıştır. En düşük mitotik indeks DFO'lu hasta grubunda gözlenmiştir.

TM'lü hastalarda 10 yaşından sonra KKD ve MN frekansının arttığı gözlenmiştir. En yüksek KKD değeri, DFO ve DFO+DFP kombine tedavi alan gruplarda bulunmuştur. Deferasiroks ve DFO+DFP kombine tedavi alan olgularda MN frekansı yüksek bulunmuştur. DFO tedavisi alan hastalarda ise MN frekansı düşük bulunmuştur. TM'lü hastaların replikasyon indeksi (RI) ve nükleer bölünme indeksi (NBI) değerleri kontrole göre düşük bulunmuştur fakat anlamlı düzeyde değildir. Primer DNA hasarı yaşa göre değerlendirildiğinde 0-10 yaş ve 20 yaş üzerinde arttığı tespit edilmiş; 10-20 yaş arasında kayda değer bir artış görülmemiştir. İlaçlara göre değerlendirildiğinde primer DNA hasarının kontrole göre anlamlı şekilde artmış olduğu belirlenmiştir. Bu artışta kullanılan ilaçların etkisi incelendiğinde, tüm ilaçlarda hasarın arttığı ancak DFO+DFP kombine uygulamasının diğer tedavilere göre primer DNA hasarını biraz daha fazla artırdığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak; talasemi majörlü hastalarda yaşın artması ile paralel artan kan transfüzyon sayıları organlarda demir artışına neden olmaktadır. Bunun sonucunda oksidatif strese bağlı genotoksik hasar artmıştır. Demir bağlayıcı ilaçların olası genotoksik etkilerini karşılaştırmayı *ex vivo* olarak incelendi. İleride yapılacak *in vitro* çalışmalarla da bu sonuçlar desteklenebilir. Çalışmada elde edilen sonuçların, klinik yönlendirme ve demir bağlayıcı ilaç tedavi protokollerinin belirlenmesinde faydalı olacağı düşünülmektedir.

Bilim Kodu : **203.1.048**
Anahtar Kelimeler : **Beta Talasemi major, kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN), comet testi, mitotik indeks (MI**
Sayfa Adedi : **97**
Tez Yöneticisi : **Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU, Doç. Dr. Talia İLERİ**

DETERMINATION OF GENETIC ABNORMALITIES WITH GENOTOXICITY TESTING IN PERIPHERAL LYMPHOCYTES OF BETA THALASSEMIA MAJOR PATIENTS

(Ph. D. Thesis)

Hafize GÖKÇE

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

February 2012

ABSTRACT

Thalassemia major, is a hematological disease that is caused by absence or lower than normal production of globulin chains of hemoglobins. Most of the patients need erythrocyte transfusion to survive and this leads to serious complications. To prevent these complications iron chelating agents like "deferoxamine (DFO), deferiprone (DFP), deferasirox" are used. Although these agents remove accumulated iron from tissues, recent studies showed that they may also have genotoxic effects.

The aim of this study is to determine possible genotoxic effects of Deferoxamine, Deferiprone and Deferasirox which have to be used by patients who have thalassemia major. The relationship between iron load and the genetic abnormalities have also been studied. For this purpose, structural chromosomal abnormalities and primary DNA damage were determined by using Chromosomal Abnormalities (CA), Sister Chromatid Exchange (SCE), Micronucleus (MN) and Comet tests in 51 patients with thalassemia and 30 healthy individuals.

In this study it was found that chromosomal abnormality frequency is significantly higher in the patients between ages 0-20 compared to control group, on the other hand no significant difference is present between patients

and controls over 20 years of age. Chromosomal abnormality frequency is also higher in patients using DFO and Deferasiroks. On the other hand, in the group receiving combined chelator therapy with DFO+DFP, despite older age and higher ferritin values chromosomal abnormality frequency is not different from the control group. In the TM group mitotic index is found to have inverse relationship with age and it decreases more with increasing age in the TM group than in the control group. The patient group receiving DFO has the lowest mitotic index.

It was observed that SCE and MN frequencies increase after 10 years of age in the TM patient group. The groups receiving DFO alone and combined DFO+DFP treatment have the highest SCE number. MN frequency is found high in the cases taking Deferasiroks and combined DFO+DFP treatment. MN frequency is low in patients taking DFO. Replication index (RI) and nuclear division index (NBI) values are lower compared to the control group but not significantly. Primary DNA damage was evaluated according to age and found that it increases in the group 0-10 years and above 20 years of age but there is no significant change in the 10-20 years group. When evaluated according to drug intake, it was detected that primary DNA damage is siginificantly higher than the control group. It was searched whether the drug subtype has an effect on this increment, and found that there was an increase for all drugs but in the combined DFO+DFP group it was a bit higher but not significant.

In conclusion; in patients with TM, increasing number of blood transfusions lead to increased iron accumulation in the organs with increasing age. This leads to genotoxic damage due to oxidative stress. Genotoxic effects of iron chelating agents were compared *ex vivo*. Future *in vitro* studies may support these conclusions. Conclusion of this study will be useful for clinical guidance and in determining iron chelating drug therapy protocol

Science Code : 2031048
Key Words :Beta Thalassamia major chromosomal aberration (CA), sister chromatid exchange (SCE), micronuclei (MN), comet assay, mitotic index (MI),
Page Number: 97
Adviser :Ass. Prof. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU, : Ass. Prof Dr. Talia İLERİ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında her konuda beni destekleyen, bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, ilgi ve desteğini esirgemeyen danışman hocalarım Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU ve Doç. Dr. Talia İLERİ'ye; doktora eğitimim boyunca bilgi ve görüşlerinden her zaman yararlandığım saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Fatma ÜNAL ve Prof. Dr. Zümrüt UYSAL'a; değerli dost ve arkadaşım Uz. Biyolog Ceyda GÜRMAN'a; istatistiksel analizlerde yardımlarını esirgemeyen Araş. Gör. Can ATEŞ'e ve benden yardımlarını esirgemeyen laboratuvardaki tüm Yüksek Lisans ve Doktora öğrencisi arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca eğitimim boyunca maddi ve manevi destekleri için aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET iv

ABSTRACT vii

TEŞEKKÜR x

İÇİNDEKİLER xi

ÇİZELGELERİNLİSTESİ xiii

ŞEKİLLERİN LİSTESİ xvi

RESİMLERİN LİSTESİ xviii

SİMGELER VE KISALTMALAR xix

1. GİRİŞ 1

2. GENEL BİLGİLER 3

2.1. Hemoglobin 3

2.2. β - Talasemi (Akdeniz Anemisi 4

2.2.1. Genetik 6

2.3. Tedavi 9

2.3.1. Demir bağlayıcı ilaç tedavisi 10

2.4. Genotoksisite Testleri 17

2.4.1. Kromozomal anormallik (KA) testi 17

2.4.2. Kardeş kromatid değişimi (KKD)testi 18

2.4.3. Mikronükleus (MN) testi 20

2.4.4. Comet testi (Tek hücre jel elektroforezi, SCGE) 22

2.5. Talasemili Olgularda Yapılan Genotoksik Araştırmalar 23

Sayfa

3. MATERYAL VE METOT 26

3.1. Materyal 26

3.2. Metot 29

3.2.1. İn vitro kromozomal anormallik (KA) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) testleri 29

3.2.2. Mikronükleus çalışması 32

3.2.3. Comet analizi 34

3.2.4. İstatistiksel analiz 35

4. BULGULAR 36

4.1. Kromozomal Anormallik Sonuçları 36

4.2. Hücre Proliferasyonu Göstergesi: Mitotik İndeks Sonuçları 41

4.3. Kardeş Kromatit Değişim Testi Sonuçları 45

4.4. Mikronükleus sonuçları 50

4.5. Comet Sonuçları (Primer DNA hasarı) 56

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 67

KAYNAKLAR 80

ÖZGEÇMİŞ 93

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 3.1. Kullanılan araç ve gereçler 26

Çizelge 3.2. Kimyasal maddeler 27

Çizelge 4.1. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre kromozomal anormallik frekanslarının karşılaştırılması 36

Çizelge 4.2. Hasta ve kontrol gruplarında kromozomal anormallik (KA) frekanslarının demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre karşılaştırılması 39

Çizelge 4.3. Hasta gruplarında kromozomal anormallik (KA) frekanslarının ferritin düzeylerine ve cinsiyete göre karşılaştırılması 40

Çizelge 4.4. Hasta gruplarında kromozomal anormallik (KA) frekansları ile ferritin düzeyleri ve yaş arasındaki ilişki 41

Çizelge 4.5. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre mitotik indeks (Mİ) frekanslarının karşılaştırılması 42

Çizelge 4.6. Hasta ve kontrol gruplarında mitotik indeks (Mİ) frekanslarının demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre karşılaştırılması 43

Çizelge 4.7. Hasta gruplarında mitotik indeks(Mİ) frekanslarının ferritin düzeylerine ve cinsiyete göre karşılaştırılması 44

Çizelge 4.8. Hasta gruplarında mitotik indeks (Mİ) frekansı ile ferritin düzeyleri ve yaş arasındaki ilişki 45

Çizelge 4.9. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre kardeş kromatit değişim (KKD) frekanslarının karşılaştırılması 45

Çizelge 4.10. Hasta ve kontrol gruplarında kardeş kromatit değişim (KKD) frekanslarının demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre karşılaştırılmas 47

Çizelge 4.11. Hasta gruplarında kardeş kromatit değişim (KKD) frekanslarının ferritin düzeylerine ve cinsiyete göre karşılaştırılması 48

Çizelge 4.12. Hasta gruplarında kardeş kromatit değişim (KKD) frekansı ile ferritin düzeyleri ve yaş arasındaki ilişki 49

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.13. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre M1, M2, M3 ve Rİ frekanslarının karşılaştırılması 49

Çizelge 4.14. Hasta ve kontrol gruplarında demir bağlayıcı ilaç kullanımına ve ferritin düzeyine göre M1, M2, M3 ve Rİ frekanslarının karşılaştırılması 50

Çizelge 4.15. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre mikronükleus (MN) frekanslarının karşılaştırılması 51

Çizelge 4.16. Hasta ve kontrol gruplarında mikronükleus (MN) frekanslarının demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre karşılaştırılması 53

Çizelge 4.17. Hasta gruplarında mikronükleus (MN) frekanslarının ferritin düzeylerine ve cinsiyete göre karşılaştırılması 54

Çizelge 4.18. Hasta gruplarında mikronükleus (MN) frekansı ile ferritin düzeyleri ve yaş arasındaki ilişki 54

Çizelge 4.19. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre N1, N2, N3 ve NBİ frekanslarının karşılaştırılması 55

Çizelge 4.20. Hasta ve kontrol gruplarında demir bağlayıcı ilaç kullanımına ve ferritin düzeylerine göre N1, N2, N3 ve NBİ frekanslarının karşılaştırılması 56

Çizelge 4.21. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre comet kuyruk uzunluğunun karşılaştırılması 57

Çizelge 4.22 Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre comet kuyruk yoğunluğunun karşılaştırılması 58

Çizelge 4.23. Hasta ve kontrol gruplarında comet kuyruk uzunluğunun demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre karşılaştırılması..... 61

Çizelge 4.24. Hasta ve kontrol gruplarında comet kuyruk yoğunluğunun demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre karşılaştırılması..... 62

Çizelge 4.25. Hasta gruplarında comet kuyruk uzunluğu ve yoğunluğunun ferritin düzeylerine ve cinsiyete göre karşılaştırılması 64

Çizelge 4.26. Hasta gruplarında comet kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu ile ferritin düzeyi ve yaş arasındaki ilişki 64

Çizelge **Sayfa**

Çizelge 4.27. Hasta gruplarında elde edilen tüm genotoksisite test sonuçlarının yaşlarına göre özet karşılaştırılması 65

Çizelge 4.28. Hasta gruplarında elde edilen tüm genotoksisite test sonuçlarının demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre özet karşılaştırılması..... 65

Çizelge 4.29. Hasta gruplarında elde edilen tüm genotoksisite test sonuçlarının ferritin düzeylerine ve cinsiyete göre özet karşılaştırılması..... 66

Çizelge 4.30. Hasta gruplarında elde edilen tüm genotoksisite test sonuçlarının ferritin düzeyi ve yaş arasındaki ilişki 66

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 2.1. Her iki ebeveyn talasemi taşıyıcısı ise, çocuklarının sağlam, talasemi taşıyıcısı veya talasemi major doğma olasılığı 7

Şekil 2.2. Desferroksaminin kimyasal formülü ve üç boyutlu yapısı 13

Şekil 2.3. Deferiprone kimyasal formülü ve üç boyutlu yapısı..... 14

Şekil 2.4. Deferasirox kimyasal formülü ve üç boyutlu yapısı 16

Şekil 2.5. BrdU'nin DNA yapısına girmesi ile birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması..... 20

Şekil 2. 6. Sitotoksik ve genotoksik ajanların etkisiyle mikronükleus oluşumu, apoptozis ve nekroz 22

Şekil 3. 1. Birli, ikili, üçlü ve dörtlü kardeş kromatid değişimleri..... 32

Şekil 4. 1. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre anormal hücre(%) medyan değerlerinin dağılım grafiği 37

Şekil 4.2. Hasta ve kontrol gruplarında anormal hücre (%) medyan değerlerinin demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre dağılım grafiği 40

Şekil 4.3. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre mitotik indeks (Mİ) medyan değerlerinin dağılım grafiği 42

Şekil 4.4. Hasta ve kontrol gruplarında mitotik indeks (Mİ) medyan değerlerinin demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre dağılım grafiği..... 44

Şekil 4.5. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre kardeş kromatit değişimi (KKD) medyan değerlerinin dağılım grafiği 46

Şekil 4.6. Hasta ve kontrol gruplarında kardeş kromatit değişimi (KKD medyan değerlerinin demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre dağılım grafiğ 48

Şekil 4.7. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre mikronükleus (MN) medyan değerlerinin dağılım grafiği 51

Şekil 4.8. Hasta ve kontrol gruplarında mikronükleus (MN) medyan değerlerinin demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre dağılım grafiği 53

Şekil **Sayfa**

Şekil 4.9. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre comet kuyruk uzunluğu medyan değerlerinin dağılım grafiği 57

Şekil 4.10. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre comet kuyruk yoğunluğu medyan değerlerinin dağılım grafiği 59

Şekil 4.11. Hasta ve kontrol gruplarında comet kuyruk uzunluğu medyan değer lerinin demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre dağılım grafiği 61

Şekil 4.12. Hasta ve kontrol gruplarında comet kuyruk yoğunluğu medyan değerlerinin demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre dağılım grafiği..... 63

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim **Sayfa**

Resim 2.1. Talasemi majorlu hastanın periferik yayması 8

Resim 4.1. TM'lü hastalarda gözlenen kromozomal anormallikler..... 37

Resim 4.2. TM'lü hasta lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatit değişimi..... 46

Resim 4.3. İnsan lenfositlerindeki mikronükleüslu binükleat hücreler..... 52

Resim 4. 4. DNA hasarlarının comet testi ile görünümü 60

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılan bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	**Açıklama**
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µg/ml	Mikrogram/ mililitre
mg/kg	Miligram/kilogram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
rpm	Devir sayısı
V	Volt
mA	Miliamper
mm	Milimetre

Kısaltmalar	**Açıklama**
BrdU	Bromodeoksiüridin
Cyt-B	Sitokalasin-B
DFO	Desferal
DFP	Deferiprone
DNA	Deoksiribonükleikasit
DMSO	Dimetil sülfoksit

Kısaltmalar	Açıklama
DPX	Depex
EDTA	Etilendiaminotetra asetik asit
EMEA	Avrupa Tibbi Ürünler Değerlendirme Ajansı
FDA	Amerkan Gıda ve İlaç Dairesi
FNTA	Ferric nitrilotriacetate
Hb A	Hemoglobin A
Hb A_2	Hemoglobin A_2
Hb F	Hemoglobin F
H_2O_2	Hidrojen peroksit
HNO_3	Nitrikasit
ISCN	Uluslararası İnsan Sito genetik Adlandırma
KA	Kromozomal anormallik
KKD	Kardeş kromatid değişimi
KCI	Potasyum Klorür
L1	Deferiprone
Mİ	Mitotik indeks
MMC	Mitomisin-C
MN	Mikronükleus
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NBİ	Nükleer bölünme indeksi
8-OHdG	8 hidroksi deoksi guanin

Kısaltmalar	Açıklama
PBS	Fosfat tamponu
Rİ	Replikasyon indeksi
RR	Ribonükleotid redüktaz
SCE	Sister chromatid exchange
SCGE	Single cell gel electroforezis
SSC	Salin sitrat tamponu
TM	Talasemi major (Akdeniz anemisi)
UHK	Ulusal Hemoglobinopati Konseyi
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Talasemi, otozomal resesif geçiş gösteren kalıtsal bir kan hastalığıdır. Hemoglobin yapısında bulunan globin zincirlerinden birinin yapımının yokluğu veya azalması ile karakterize olan talasemi, heterojen bir hastalık grubudur. Bir globin zincirinin sentezindeki azalma hücre hemoglobininin azalmasına yol açabileceği gibi, diğer globin zincirinin sentezindeki artışla, ikincil bazı belirtilere de yol açabilir. "β-talasemi" de β globin zincir sentezi yoktur ya da çok azalmıştır ve talasemilerin en sık görülen formunu oluşturur. 11. kromozom üzerinde bulunan β globin genlerinde gelişebilen 200'den fazla mutasyonun "β-talasemi" ye yol açtığı gösterilmiştir [Orkin ve ark., 1998].

Akdeniz ve Ortadoğu ülkelerinde sık görülen β-talasemi taşıyıcılığı Türkiye genelinde % 2,3-4,5 arasında bulunmakla birlikte bölgesel farklılıklara bağlı olarak Muğla, Antakya ve Antalya gibi Akdeniz kıyısındaki illerde % 13'lere varan taşıyıcılık sıklığı ile karşılaşılır [Arcasoy 1994; Canatan 2010]. Ülkemizde, doğum hızının yüksek, akraba evliliklerinin sık oluşu, ekip çalışmalarının ve kayıt sisteminin yetersizliği, prenatal tanı uygulanan bebek sayısının olması gerekenden düşük olması, eğitim ve bilgilendirme çalışmalarının tüm çabalara karşın yetersiz olması nedenleri ile halen "Talasemi major" hastalığına sahip bebeklerin doğumu önlenememektedir. Globin zincirinin sentezlenememesinin yol açtığı anemi, hastalık semptomlarının temelini oluşturur. Olgular hayatları boyunca düzenli olarak eritrosit desteği almadan yaşamlarını devam ettiremezler. Tek küratif tedavi yaklaşımının hematopoetik kök hücre nakli olduğu bu hastalıkta olguların ancak %25 kadarı bu şansa sahiptirler. Hastaların büyük kısmının eritrosit desteği ile yaşamlarını sürdürmek zorunda kalmaları bir kısım komplikasyonların gelişmesine de kaçınılmaz olarak yol açar. Bu komplikasyonların en önemlisi uygulanan kan transfüzyonları sonucu sekonder gelişen organlarda demir birikimidir. Biriken demirin zaman içinde kalp, karaciğer gibi organlarda fonksiyon bozukluğuna yol açması talasemi hastalarındaki ölüm nedenlerinin temelini oluşturmaktadır. Bunu önlemek amacı ile 1970'li yıllarda organlarda birikmiş demiri atmak için demir bağlayıcı ilaç olan "desferroksamin" kullanılmaya başlanmıştır. Ancak ilacın subkutan infüzyonla her

gün kullanılmasının gerekliliği büyük bir uyum sorunu getirmiş, bu nedenle oral demir bağlayıcı ilaçlar araştırılmaya başlanmıştır. İlk oral demir bağlayıcı ilaç olan "deferipronee" 1989 yılında kullanılmaya başlanmış, tek başına çok etkili olmamakla birlikte desferroksamin ile kombine kullanıldığında özellikle kalpte biriken demirin atılımını sağlamada etkili olduğu gösterilmiştir. Daha sonra 2008 yılında "deferasiroks" isimli üçüncü bir demir bağlayıcı ilaç kullanıma sunulmuştur. "Deferasiroks" günde tek doz olarak kullanılan ilk oral demir bağlayıcı ilaç olarak büyük bir avantaj sağlamakla birlikte etkinlik açısından henüz "desferroksamin"in yerini almamıştır. Yeni bir ilaç olması nedeni ile klinik kullanımda deferasiroks'un etkinliğini ve diğer demir bağlayıcı ilaçlar ile karşılaştırıldığında yerini gösteren çalışmalar hız kazanmıştır. Son yıllarda deferasiroksun, ferritin olarak adlandırılan depo demirini ve karaciğerdeki demir yükünü düşürmede etkili olduğunu gösteren çalışmalar yayınlanmakla birlikte, kardiyak demir üzerine olan etkisini araştıran çalışmalar da devam etmektedir.

Demir bağlayıcı ilaçlar her ne kadar biriken demiri uzaklaştıran ve talasemi major hastaları için hayati öneme sahip ilaçlar olsalar da son yıllarda yapılan çalışmalar bu ilaçların genotoksik etkilerinin olabileceğini gösterir yöndedir. Çalışmamızın amacı, talasemili hastalarda kullanımı zorunlu olan Desferroksamin, Deferipronee (L1, Ferriprox) ve Deferasiroks (ICL670, Deferasiroks) ilaçlarının ve demir yükünün olası genotoksik etkilerini belirlemektir. Bu amaçla 51 talasemik hastada Kromozomal Anormallik (KA), Kardeş Kromatit değişimii (KKD), Mikronükleus (MN) ve Comet testleri ile yapısal kromozom değişimleri ve primer DNA hasarı saptanmaya çalışıldı.

Çalışmada elde ettiğimiz sonuçların, demir bağlayıcı ilaç tedavi protokollerinin belirlenmesinde ve talasemili hastaların yaşam kalitesini artırmada katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Hemoglobinopatiler dünyada en sık görülen otozomal resesif geçişli tek gen hastalıklarıdır. Hemoglobin molekülünün yapısal anormallikleri ve normal globin zincirlerinin sayısal anormallikleri olarak iki ayrı grupta incelenir. Hemoglobinopatilerin büyük bir kısmını orak hücre anemisi (HbS) ve β talasemi oluşturmaktadır [Özkınay, 2010].

Talasemiler hemoglobinin globin zincirlerinde yapım azlığı veya hiç yapılamaması sonucu ortaya çıkan hematolojik bir hastalık grubudur. Otozomal resesif geçiş göstermekte olup, prenatal tanı ve taraması olan bir kan hastalığıdır. Erişkinlerde major hemoglobinin Hb A (2α; 2β) olması nedeniyle klinikte önemli olan ve en sık görülen talasemiler Hb A' yı oluşturan alfa ve beta globinleri ile ilgili, alfa ve beta talasemilerdir. Hemoglobinin üretimi ve sentezi birkaç genin kontrolündedir. Alfa globin genleri 16. kromozom üzerinde, beta globin genleri ise 11. kromozom üzerinde bulunur. Alfa talasemiler daha çok Uzak Doğu ülkelerinde, beta talasemiler ise Akdeniz ülkelerinde sık görülmektedir [Orkin ve ark., 1998].

2.1. Hemoglobin

Kırmızı kan hücrelerinde [eritrositler] bulunan proteinlerin % 90'ı hemoglobindir. Molekül ağırlığı 64.400 dalton ve çapı 5,0 x 5,5 x 6,4 nm'dir. Hem ve globin zincirleri bir araya gelerek, durağan bir hemoglobin dörtlüsünü oluştururlar. "Hem"-de bulunan demir molekülü vücuttaki oksijen taşınımını sağlar. Bu demirin kolaylıkla bağlanmasını ve oksijenin doku ve hücrelere iyi taşınmasını sağlar. Normal bir yetişkinin vücudunda dört gram demir bulunur ve bunun % 75'i hemoglobin sentezinde kullanılır [Orkin ve ark., 1998]**.** Zeta $_2$ – epsilon $_2$ globinlerini içeren Gower 1, alfa $_2$ – epsilon $_2$ globinlerini içeren Gower 2 ve zeta $_2$ – gama $_2$ globinlerini içeren Portland hemoglobinleri embriyonel tiplerdir; rahim içi 10. haftadan sonra kaybolurlar. Embriyonun biraz gelişmesi ile alfa $_2$ - gama $_2$ globinlerini içeren fötal hemoglobin (Hb F) görev alır. Alfa $_2$ - delta $_2$ globinlerini içeren Hb A_2 ise doğum öncesi dönemde yapılmaya başlar ve doğumdan sonra çok

hafif artarak yaşam boyu belli bir düzeyde kalır. Asıl erişkin hemoglobini olan $\alpha_2\beta_2$ globin zincirleri içeren Hb A rahim içi dönemde 6-8. haftadan sonra yapılmaya başlar. Doğum sonrasında Hb F giderek azalırken Hb A'nın giderek arttığı ve 1 yaş civarında eritrositlerde % 95 Hb A ($\alpha_2\beta_2$), % 2 veya daha az Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) ve % 3,5 Hb A_2 düzeyindedir [Arcasoy, 1994]**.** α - zinciri 141 aminoasit, β - zinciri 146 aminoasit içerir. A globin zinciri 16. kromozomun kısa kolu üzerinde bulunan iki α geni ($\alpha_1$ve α_2) tarafından kodlanırken γ, δ ve β globin zincirleri ise 11. kromozomun kısa kolu üzerinde bulunan γ^G, γ^A, δ ve β genleri tarafından kodlanır. Bu güne kadar moleküler düzeyde globin genlerinde yaklaşık 1000 civarında mutant alel saptanmıştır. Hemoglobin bozuklukları oluşturdukları klinik tablolara göre dört ana grupta incelenebilir;

1- β-talasemi
2- α- talasemi
3- Orak hücre anemisi
4- Hemolitik anemi, polisitemi [Clark ve Thein, 2004].

2.2. β - Talasemi (Akdeniz Anemisi)

Talasemi, ülkemizin de içinde bulunduğu Akdeniz ülkelerinin önemli bir halk sağlığı sorunudur. Kuzey ve Batı Avrupa, ABD ve Kanada da göçler nedeni ile talasemik olgular görülmeye başlanmıştır. Gelişmiş ülkelerde önleme ve tedavi programları ulusal sağlık politikasında yerini almıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre dünyada taşıyıcı sıklığı % 5,1 olup ülkelere ve ülkeler içindeki bölgelere göre de farklılık göstermektedir. Örneğin Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde taşıyıcılık % 15, Azerbaycan'da % 6,3, Bulgaristan'ın güney bölgesinde % 30 dur. Türkiye'de ilk çalışmalar 1950'li yıllarda, Aksoy tarafından başlatılmıştır [Aksoy ve ark., 1958]. 1970'li yıllarda, Çavdar ve arkadaşları tarafından talasemi taşıyıcı sıklığı bölgelere göre değişmekle birlikte genel olarak % 2,1 bulunmuştur [Çavdar ve Arcasoy, 1971]. Ulusal Hemoglobinopati Konseyi'nin (UHK) verilerine göre Marmara, Ege ve Akdeniz bölgelerindeki 16 merkezde toplam 377.399 sağlıklı bireyin taranması ile

son beş yılda belirlenen oranlar % 0,7 – 13,1 arasındadır. KKTC, İtalya ve Yunanistan'da son 10 yıldır yapılan toplum taramaları ile evlilik öncesi taşıyıcılar saptanmış, iyi bir genetik danışmanlık verilerek, halk bilgilendirilmiş ve prenatal tanı yöntemleri ile de hasta çocuk doğması önlenmiştir [Canatan ve Aydınok, 2007, internet 1].

Ülkemizde 1993 yılında hemoglobinopatilerin tanı ve tedavisi ile ilgili Kalıtsal Kan Hastalıkları Mücadele Kanunu çıkarılmıştır. 2002'de "Hemoglobinopati Kontrol Programı" ile "Tanı ve Tedavi Merkezi" yönetmeliği yayınlanmıştır. Böylece, Sağlık Bakanlığı tarafından ülke çapında talasemi taşıyıcılığın yüksek olduğu bölgelerde eğitim, tarama, genetik danışma, prenatal tanı ve diğer tanı tedavilere yönelik çalışmalar başlatılmıştır. 2005 yılında talasemi derneklerinin bir araya gelmesi ile talasemi federasyonu kurulmuş ve hastalığın önlenmesi, tedavisi ve yeni tedavi yaklaşımları konularında çalışmalara başlamıştır. Tarama programlarında, özellikle evlilik öncesi olmak üzere, kan sayımı ve hemoglobin elektroforezi testleri yapılarak talasemi taşıyıcıların tespiti mümkündür. Taşıyıcılığı tespit edilen bireylerin bilgilendirilmesi ve çocuk istedikleri zaman mutlaka doktora başvurarak prenatal tanı yöntemlerinden faydalanmaları anlatılmalıdır. Ülkemizde moleküler düzeydeki çalışmalar ancak birkaç merkezde yapılmakta ve prenatal tanı konulabilmektedir [Canatan, 2010].

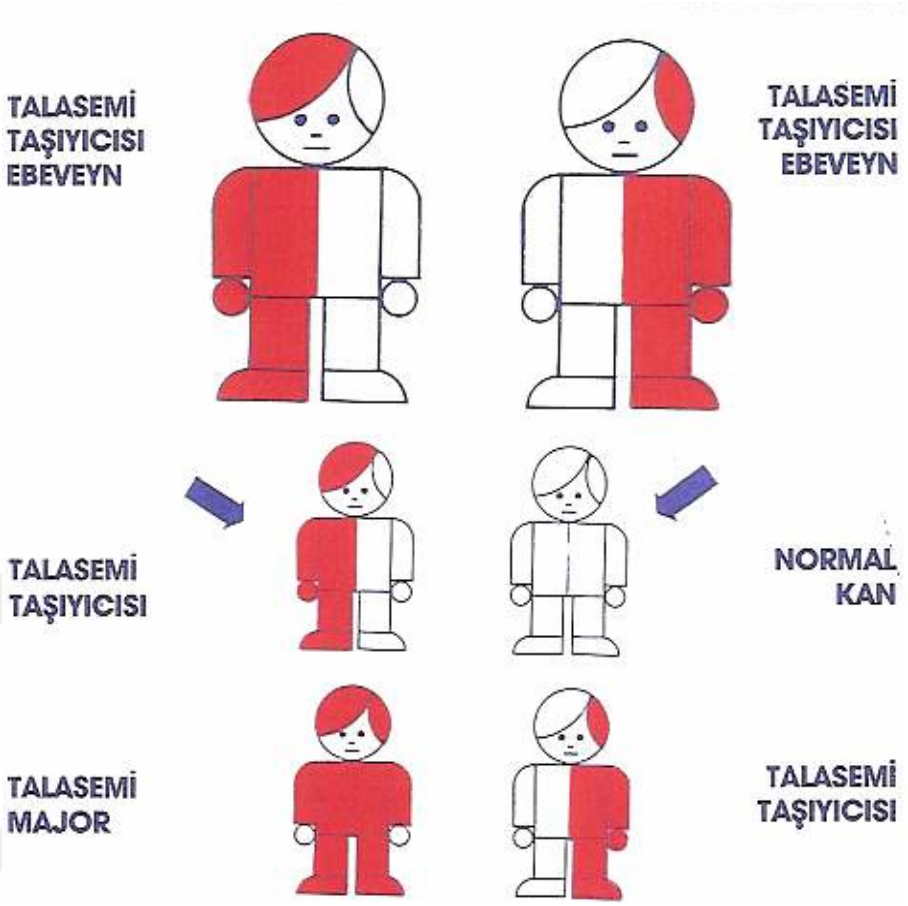
Dünyada β - talasemiye yol açan moleküler defektler oldukça iyi incelenmiş ve 200 den fazla mutasyon tanımlanmıştır. 1987'de Türk toplumunda talasemiye ait ilk moleküler çalışmalar Akar ve arkadaşları tarafından yapılmıştır [Akar ve ark., 1987]. 2002 yılında Bilenoğlu ve arkadaşları Türk toplumunda beta talaseminin moleküler spektrumunu yayınladılar [Bilenoğlu ve ark., 2002]. Türkiye'de β- talasemiler üzerinde yapılan çalışmalarda 35 den fazla mutasyon saptanmıştır ki bunlardan en yaygın olanı IVS- I – 110 (G – A)'dir ve ağır klinik tablo göstermektedir. Ülkemizde talasemi mutasyonları heterojenite göstermektedir. Bazı bölgesel farklar olmakla birlikte, hemen her mutasyona ülkemizin herhangi bir bölgesinde rastlanabilmektedir [Arcasoy, 1994].

2.2.1. Genetik

Rekombinant DNA teknikleri ile tüm insan globin genlerinin klonlanması ve nükleotit dizilimlerinin saptanması mümkün olmuştur. Her β globin geni üç kodlama ekson bölgesi içerir. Bunlar iki ara bölge intron ile birbirinden ayrılmışlardır. 5' ucu belirleyen promotor dizileri ise β globin mRNA sentezinin başlaması için gerekli sinyali sağlar. Talasemili olgular anne ve babanın taşıyıcı olması halinde dünyaya gelmektedir. Anne ve baba taşıyıcı ise her gebelik için hasta çocuk doğma olasılığı % 25, taşıyıcı olasılığı % 50, sağlam çocuk olasılığı % 25'dir (Şekil 2.1). Anne ve babadan biri taşıyıcı, diğeri sağlıklı ise her gebelikte % 50 olasılıkla taşıyıcı, % 50 olasılıkla sağlam çocuk doğar. β talaseminin üç klinik formu vardır [Arcasoy 1994]:

Talasemi minör (talasemi taşıyıcılığı)

Talasemi taşıyıcılarında bir mutasyonlu genin yanı sıra bir de sağlam gen bulunduğundan hastalık ortaya çıkmaz. Klinik olarak hiçbir yakınma gelişmezken, laboratuvar incelemelerinde tam kan sayımında hafif anemi saptanır. Herhangi bir tedavi gerektirmez. Taşıyıcılar hastalık genini kendilerinden sonraki kuşaklara taşımayı sürdürürler; doğacak olan çocukların % 25'i sağlıklı, % 25'i hasta ve %50'si taşıyıcı olma olasılığı bulunmaktadır. Taşıyıcı çiftler evlenebilir, ancak bebek sahibi olmak istedikleri zaman prenatal tanı merkezlerine başvurmalıdırlar [Arcasoy 1994; Ridolfi, 2007].



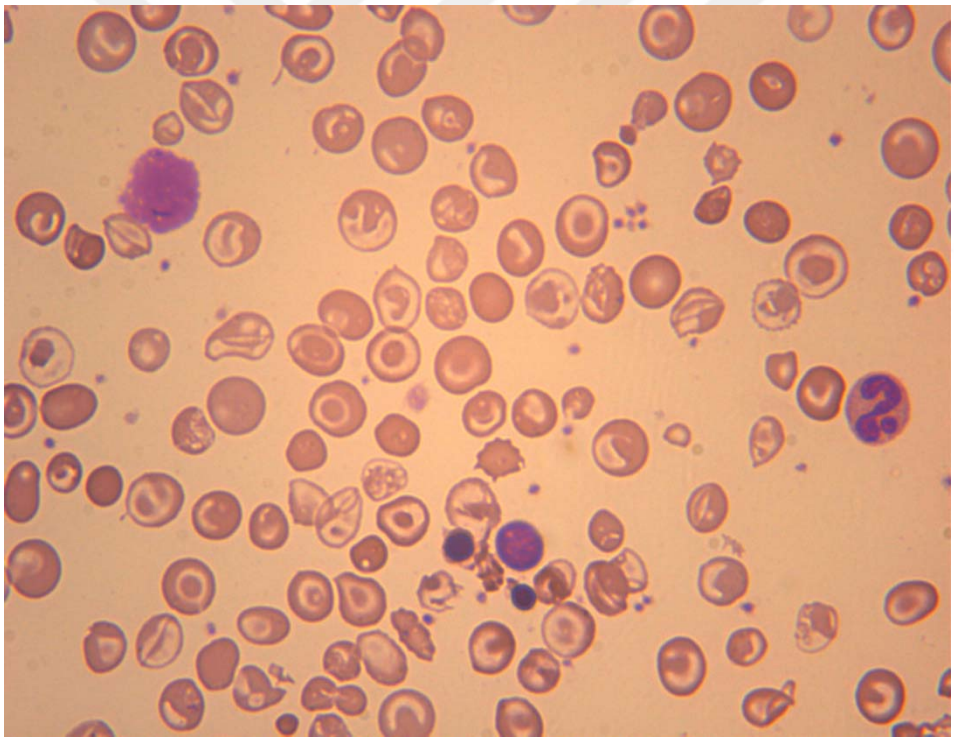
Şekil 2.1. Her iki ebeveyn talasemi taşıyıcısı ise, çocuklarının sağlam, talasemi taşıyıcısı veya talasemi major doğma olasılığı [Arcasoy, 1994].

Talasemi intermedia:

Hastalığın ara formudur. Talasemi intermedialı hastaların çoğunda altta yatan moleküler defekt hafif veya sessiz beta talasemi mutasyonların homozigot formudur ve izlemde de her an majore dönebilir. Heterozigot anne ve babadan mutasyonlu talasemi genlerinin geçiş gösterdiği homozigot form olmasına karşın, klinik tablo talasemi majorden daha hafif seyreder. Genelde kan transfüzyonuna bağımlılık göstermeden yaşamlarını sürdürebilmelerine karşın, klinik spektrum oldukça geniştir. Talasemi minore yakın bir seyirden, majore yakın seyir izleyebilir [Ünal, 2010].

Talasemi major

Talasemi major Türkiye'de sık görülen bir hemoglobinopatidir. Anne ve babadan mutasyonlu talasemi genlerinin geçiş gösterdiği homozigot form olup ağır klinik seyir gösterir. Hastalarda temel bulgular ağır anemi (3-7g/dl), belirgin karaciger ve dalak büyüklüğüdür. Kesin tanı, tam kan sayımı, periferik yayma ve hemoglobin elektroforezi ile konur. Talasemi majorde kırmızı kan hücrelerinin büyüklüğü, hacmi ve içlerindeki hemoglobin miktarı azdır. Mikroskopta incelendiğinde kırmızı kan hücreleri soluk (hipokromik), daha küçük (mikrositik) ve farklı boyut ve şekillerde (anizositozis ve poikilositozis) görülür (Resim 2.1) [Gümrük, 2006; Vergin, 2010].



Resim 2.1. Talasemi majorlu hastanın periferik yayması

Hastalar çoğunlukla 6-12. aydan itibaren ömür boyu sürecek olan kan transfüzyon desteğine ihtiyaç duyarlar. Temel tedavi; düzenli kan transfüzyonları ve buna bağlı olarak vücutta artan demirin uzaklaştırılması için demir bağlayıcı ilaç tedavisidir [Uysal, 1994].

Yaşamın ilk yılında derin anemi, solukluk, karın şişliği ile hastaneye başvuran bu hastalarda karaciğer ve dalak büyüklüğü belirgindir. Yaşam kalitesi, 3-4 haftada bir uygulanan kan transfüzyonlarının düzenli olmasına bağlıdır. Ancak her transfüzyonda eritrositlerle birlikte vücuda giren fazla miktarda demir-doğal yollardan atılamayıp organlarda birikime neden olacağından bu hastalarda klinik bulguların daha da karışmasına, demir biriken organlarda disfonksiyona neden olmaktadır [Ünal, 2010].

Yaklaşık 2- 2,5 yaşında başlanan demir bağlayıcı tedavilerin etkin kullanımı önemlidir. Düzenli demir şelasyon tedavisi almayan hastalar yirmili yaşlarda genellikle kalp yetmezliğinden ve aritmiler yüzünden kaybedilmektedir [Olgar, 2010]. Endokrin organlarla ilgili kısa boy, diabetus mellitus, hipogonadism, hipotiroidi, hipoparatiroidi ve osteoporoz gibi komplikasyonlar oluşur [Sangün ve Dündar, 2010]. Karaciğerde demir birikimi siroza neden olur. Ayrıca transfüzyona bağlı olarak transfüzyonla geçiş riski olan hepatit B ve hepatit C enfeksiyonlarına maruz kalmaktadırlar [Uysal ve ark., 1995; Sönmezoğlu 2010].

2.3. Tedavi

Son kırk yıllık klinik inceleme ve araştırmalarla talasemi tedavi edilebilir kronik bir hastalığa dönüşmüştür. Düzenli kan transfüzyonu hastaların yaşam sürelerinin uzaması ve artmasını sağlayan en önemli etkenlerden biridir. Ancak hastalarda demir birikiminin ana kaynağı periyodik olarak alınan kan transfüzyonlarıdır [Orkin ve ark., 1998].

Yaşamları boyunca kan transfüzyonuna bağımlı olan talasemi hastalarında yaşam süresinin uzatılması demir bağlayıcı ilaçların gelişimine paralellik göstermektedir. Demir bağlayıcı ilaçlar hücrelerin sitoplâzmasına geçerek serbest demiri bağlar ve serbest radikal oluşumuna ve doku hasarına engel olur. 1970'li yıllarda demir bağlayıcı ilaç tedavisi ile demir yükü azaltılmaya yönelik ilk adımlar atılmıştır [Modell ve Beck, 1974]. Uzun yıllar süresince demir bağlayıcı ilaç tedavisi amacı ile kullanılabilen tek ilacın desferroksamin olması ve subkutan olarak uzun süreli

infüzyonla kullanılmasının gerekliliği hastalarda uyum problemini ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle oral demir bağlayıcı ilaçlar ile ilgili uygulamalar devreye girmiştir [Borgna-Pignatti ve ark., 2005]. Son yıllarda oral demir bağlayıcı ilaçlar ile ilgili ülkemizin de katıldığı ortak çalışmalar ile önemli gelişmeler olmuş ve bu çalışmalar halen yoğun olarak devam etmektedir.

Hastalığın tek küratif tedavi yaklaşımı olan hematopoetik kök hücre transplantasyonu 1980'li yıllardan başlayarak talasemi hastalarında başarı ile uygulanmaya başlanmıştır. Talasemide ilk kök hücre nakli Seattle'da 1981 yılında 14 aylık İtalyan bir erkek hastada gerçekleştirilmiştir [Thomas ve ark., 1982; Del Castello, 2010]. Bu güne kadar 1500'ün üzerinde talasemi hastasına uygulanmıştır.

Bu tedavilerin dışında, Hb F yükseltici ilaçlar gündeme gelmiştir. Bu ilaçlar kemik iliği aktivitesini baskılamakta, gama zincir oluşumunu artırmaktadır. Gama zincirleri ile alfa zincirleri eşleştiklerinde fetal hemoglobin artmaktadır ve serbest alfa zincir miktarı azalmaktadır. Bu ilaçlar (5-azactadin, sitozin, arabinosid, hidroxyüre, eritropoetin, myleran vs.) kısıtlı bir grup hastada uygulanmış, ancak hem toksik etki göstermeleri hem de talasemi majorda çok etkili olmamaları nedeniyle çok tercih edilmemektedir. Ancak talasemi intermediada halen iyi seçeneklerdir [Liu ve ark. 1990].

Talasemi major tedavisindeki son yaklaşım kemik iliğindeki kök hücrelerin içine sağlıklı genlerin transferidir. Son 10 yılda hastaların kök hücrelerine sağlıklı genlerin transferi üzerine yapılan biyolojik çalışmalar konusunda gelişmeler olmuştur. Transfer için γ- globin / β- LCR içeren lentiviral vektörlerin kullanımı ile ilgili çalışmalar deneme aşamasındadır [Drakopolou ve ark., 2011].

2.3.1. Demir bağlayıcı ilaç tedavisi

Transfüzyon, normal büyüme ve gelişmeyi sağlamakta ancak demir birikimine neden olmaktadır. Transfüzyonlarla kazanılan demir ilk olarak kemik iliği ve retikuloendotelial sistem (karaciğer ve dalak) makrofajları tarafından depolanır.

Retikuloendotelial sistemin 10-15 gram olan depolama kapasitesi aşılınca, demir makrofajlardan plazma transferine verilir ve oradan da parankimal hücrelere girerek doku hasarına neden olur. Aşırı demir yüklü olgularda, transferinin demir taşıma kapasitesi dolmakta ve transferine bağlı olmayan demir (serbest demir) oluşmaktadır. Serbest demirin dokulara girişi transferin demirinden daha hızlıdır ve çok kolaylıkla negatif yük elektron kazanabilir veya kaybedebilir. Eğer demir elektron kazanırsa üç değerlikli halinden ferröz forma (Fe^{+2}) indirgenir ya da iki değerlikli halinden ferrik forma (Fe^{+3}) yükseltgenir Demir böyle iki ve üç değerlikleri arasında devamlı değişim yaşarsa serbest radikal oluşumunu başlatarak demir toksisitesine neden olur. DNA negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, Fe^{+2+3} katyonları rahatlıkla bağlanabilmektedir. DNA'ya bağlı demir iyonları ile H_2O_2'in reaksiyonundan oluşan OH^- radikalleri DNA hasarı oluşturur. Serbest radikaller, lipidler, nükleik asitler ve proteinler gibi hemen tüm hücresel komponentlerde hasar oluşturarak hücre nekroz ve fibrozisine neden olur [Balla ve ark., 1990; Aydınok, 2007].

Serbest radikallerin oluşumu (Fenton Reaksiyonu):

$$O_2 + Fe^{+3} \rightarrow O_2 + Fe^{+2}$$

$$H_2O_2 + Fe^{+2} \rightarrow OH^- + OH^- + Fe^{+3}$$

Demir, etkin bir şekilde uzaklaştırılamaz ise başta kalp olmak üzere, karaciğer ve endokrin parankimal hücrelerde ve bütün dokularda birikerek, organ fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır. Demir şelatörleri hücre içine girerek serbest demiri bağlamak suretiyle onu etkisizleştirirler, böylece Fenton reaksiyonunu ve sonuçta hidroksil radikali oluşumunu inhibe ederler.

Demir bağlayıcı ilaç tedavisinin amacı, doku demirini güvenli seviyelerde tutmak ve demir birikimine bağlı hasarı önlemektir. Demir bağlayıcı ilaç tedavisinde hedef depo demiri olan serum ferritin düzeyini 500 - 1000 µg/L civarında tutmaktır. İstenilen demir bağlayıcı ilacın özellikleri aşağıdaki gibi olmalıdır [Güven, 2007]:

1. Fe^{+3} yüksek afinitesi olan
2. Metabolizması yavaş olan
3. Doku ve hücrelere iyi ve etkin penetre olan
4. Etkin demir atılımı sağlayabilen
5. Bağlanmış olduğu demirin geri salınımına izin vermeyen
6. Sadece demiri uzaklaştıran, demir bağımlı enzim sistemleriyle etkileşmeyen
7. Negatif demir dengesi sağlayan
8. Vücuda toksik etkisi en düşük düzeyde olan
9. Fiyatı yüksek olmayan
10. Uygulanımı kolay olan

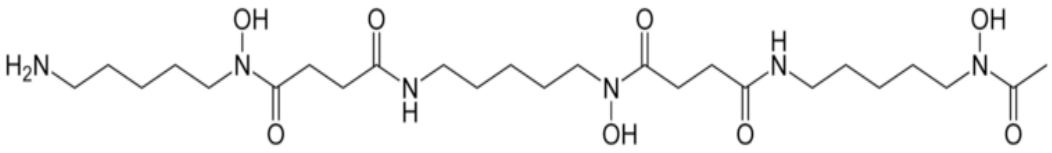
Demir bağlayıcı ilaçlar

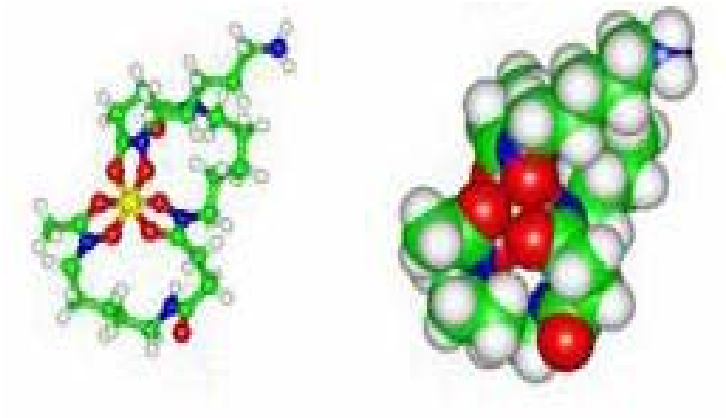
Talasemi majorda genellikle 3 yaş civarında demir şelasyon tedavisine başlanmaktadır. Demir şelasyon tedavisinde serum ferritin düzeylerinin 1000 µg/L düzeyinde tutulması amaçlanmaktadır. Günümüzde demir bağlayıcı ilaç olarak Desferroksamin, deferiprone ve deferasiroks kullanılmaktadır [Kwaikowski, 2011].

Desferroksamin (DFO, Desferal®, Novartis, İsviçre)

Streptomyces pilorus'tan elde edilen [1961] Fe^{+3}'e yüksek afinitesi olan polyhidroxamic asittir. DFO iki yolla çalışmaktadır birinci yol yavaş olup 1 mol Desferroksamin, 1 mol demir bağlamakta ve demiri bir zarf gibi sarmaktadır. Oluşan ferrioxamin kompleksi suda eriyebilen bir tuz şeklinde idrar ve dışkı ile atılmaktadır. DFO'nun ikinci rolü hızlı olup serbest radikaller üzerinden demirin zararlı etkilerinin azaltılmasıdır. DFO vücuttaki iki ana demir kaynağının demirini bağlar. Birinci havuz eritrositlerin yıkımı ile oluşan demirdir. DFO tarafından bağlanan demir havuzunun % 70 ini oluşturmakta olup idrar ile atılır. DFO tarafından bağlanan ikinci demir havuzu karaciğerde olup vücuttaki en büyük demir deposunu oluşturmaktadır [Uysal, 1994; Modell ve ark., 2000].

[C_{12} H_{15} N_3 O_4]





Şekil 2.2. Desferroksaminin kimyasal formülü ve üç boyutlu yapısı [internet 2]

Karaciğerde depolanan demir, ferritin ve hemosiderin olmak üzere iki maddenin karaciğer hücreleri tarafından parçalanması ile elde edilir. Hepatositlerdeki demir DFO ile bağlanır ve dışkı ile atılır. Yarı ömrü 20-30 dakikadır. 500 mg'lık flakon, 5 ml distile su ile sulandırılır. Desferroksamin, ferritin değerine göre 20–60 mg/kg/gün, özel infüzyon pompası ile subkutan veya intravenöz olarak, 8-12 saat süreyle ve haftada 5-7 gün uygulanmaktadır. Uygulama süresinin uzun olması ve zahmetli olması tedaviye uyumu azaltmaktadır [Kwaikowski, 2011; Şahin, 2011].

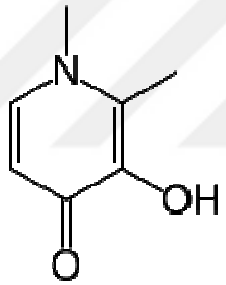
Avantajları

Uzun süreli deneyim
Etkinliği açısından güvenilir
Sürekli infüzyon ile kardiyak disfonksiyonda düzelme
Deferipronee ile kombine kullanılabilirlik

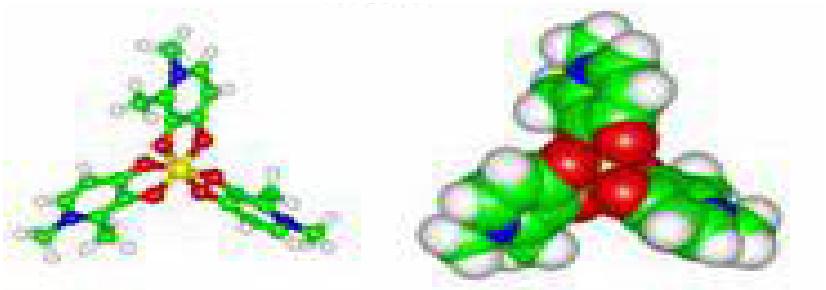
Dezavantajları

Parenteral uygulama
Uygulama bölgesinde şişlik ve kızarıklık şeklinde lokal reaksiyonlar
Kulak, göz, kemik toksisitesi
Uyum sorunu
Yersinia enfeksiyonu
Kas ağrısı

Deferipronee (L1, DFP9; Ferriprox®, ApoPharma, Kanada, Kelfer®, Cipla, Hindistan)



($C_7H_9NO_2$)



Şekil 2.3. Deferipronee kimyasal formülü ve üç boyutlu yapısı [internet 2]

Talasemi majorda ölüm nedenlerinin başında kardiyak sebeplerin görülmesi ve desferoksamine uyum zor olduğundan ve hastalar bu ilacı kullanamadıklarından

demir yüklerinin azaltılamaması araştırmacıları, subkutan Desferroksamin tedavisine alternatif çözümler aramaya yönlendirmiştir. Deferipronee, ilk oral demir bağlayıcı ilaç olarak 1989'da kullanılmaya başlanmıştır. İngiltere ve İtalya gibi çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda deferiproneun, kardiyak demiri uzaklaştırarak kalp fonksiyonlarını düzeltmede, Desferroksamin ile kombine kullanımda etkili olduğu gösterilmiştir. Anderson ve arkadaşlarının retrospektif çalışması ve Borgna-Pignati'nin deferipronee ile kardiyak komplikasyonsuz verileri değerlendirildiğinde, DFP'nin kardiyak demiri uzaklaştırmada DFO'dan üstün olduğu düşünülebilir. Desferroksamin tedavisi alan hasta gruplarını karşılaştırmış ve Deferipronee kullanan grubun kardiyak problemlerinin anlamlı olarak az olduğunu bildirmişlerdir [Anderson ve ark., 2002; Borgna- Pignati ve ark., 2005]. Bir demir iyonunu, üç molekül deferipronee çevreler. Bu bileşik, dokulardaki toksik demirin atılmasını sağlar [Shalev ve ark., 1995]. Demir atılımı idrar yoluyla olur. Doz 75 – 100 mg/kg/gün ve yarılanma ömrü 3- 4 saat olduğundan günde üç kez verilir [Aydınok 2007, 2010; Janet ve Kwaikowski, 2011].

Avantajları

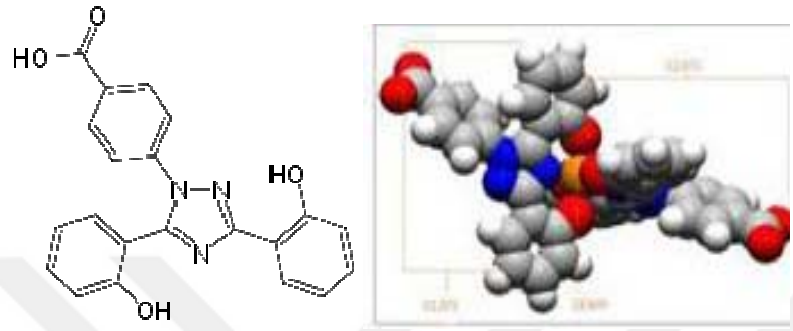
Ağızdan kullanılabilirlik
Güvenilirlik
Kardiyak demiri uzaklaştırmada etkinlik
Desferroksamin ile kombine kullanılabilirlik

Dezavantajları

Nötropeni
Eklem ağrıları
Gastrointestinal sistem şikâyetleri
Çinko eksikliği
Karaciğer toksisitesi

Deferasirox (ICL670; Defarosiroks®, Novartis, İsviçre)

$C_{21}H_{15}N_3O_4$



Şekil 2.4. Deferasirox kimyasal formülü ve üç boyutlu yapısı [İnternet 2]

Deferasirox, 1998'den beri Faz I ve Faz II klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. 2003 yılında başlatılan ve tüm dünyada 586 pediatrik ve erişkin talasemili hastanın katıldığı Faz III çalışma sonucunda, Kasım 2005'te, iki yaşın üzerindeki hastaların demir bağlayıcı ilaç tedavisinde kullanılmak üzere FDA onayı, ardından EMEA onayı almış ve Mart 2008'de ülkemizde ruhsatlandırılmıştır. $Fe^{+3'}$ e yüksek affinitesi olan tridentate bir demir bağlayıcı ilaçtır. Bir demir atomunun altı koordinasyon alanını bağlamak için iki deferasiroks molekülü gerekir [Güven, 2007; Ekici, 2008].

Suda eriyebilir tablet formundadır. Günde tek doz oral kullanımı, 24 saat yeterli atılım sağlar. Demir için yüksek ölçüde spesifiktir, çinko ve bakır gibi iki değerli elementlere affinitesi düşüktür. Deferasiroks 125, 250 ve 500 mg tablet formunda bulunmaktadır. Günde bir kez, su veya portakal suyunda eritilerek içilir. Doz 20–30 mg/kg/gün ve yarılanma ömrü 8 – 16 saattir. Demir atılımı dışkı yoluyla olur [Cappelini ve ark., 2006; Janet ve Kwaikowski, 2011].

Avantajları

Ağızdan kullanılabilirlik
Günde tek doz kullanım

Doku ve hücre penetrasyonu iyi

Dezavantajları

Gastrointestinal sistem şikâyetleri
Karaciğer fonksiyon testlerinde bozulma
Ciltte döküntü
Lens opasitesi ve işitme kaybı
Böbrek toksisitesi
Kombine kullanımının olmaması
Negatif demir balansı sağlayan en etkin doz aralığının henüz netleşmemesi

2.4. Genotoksisite Testleri

Genotoksisite, kimyasal, fiziksel veya biyolojik ajanın genetik materyalde hasar yapabilme özelliği olarak tanımlanır. Genotoksisite testleri, fiziksel etkenler, ilaçlar, çevresel kirleticiler ve gıda katkı maddeleri gibi günlük yaşamda sıklıkla maruz kaldığımız her türlü kimyasal maddenin genotoksik ve kanserojenik potansiyellerinin araştırılmasını ve kanser riskinin tahmin edilmesini sağlayan testlerdir. Günümüzde canlılar çevrelerinde bulunan çok sayıda kimyasal ve fiziksel ajana sürekli maruz kaldıkları için, bu ajanların potansiyel riskleri ve olumsuz etkilerini değerlendiren genotoksisite çalışmaları gittikçe artan bir önem kazanmaktadır. Genotoksik etkileri belirlemek için Comet testi ve sitogenetik tarama testlerinden MN (mikronükleus), KKD (kardeş kromatit değişimii), KA (kromozomal anormallik) tekniklerinden yararlanılır [Tucker ve Preston, 1996; Yılmaz, 2008].

2.4.1. Kromozomal anormallik (KA) testi

Kromozomal anormallikler DNA düzeyindeki hasarın bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Genetik materyalde oluşan bu tip hasarlar tamir edilemediğinde ortaya çıkan yüksek KA frekansı ise, artmış kanser riskini göstermektedir [Bolognesi, 2003; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006]. Kullanılan fiziksel veya kimyasal ajanların etkisine göre

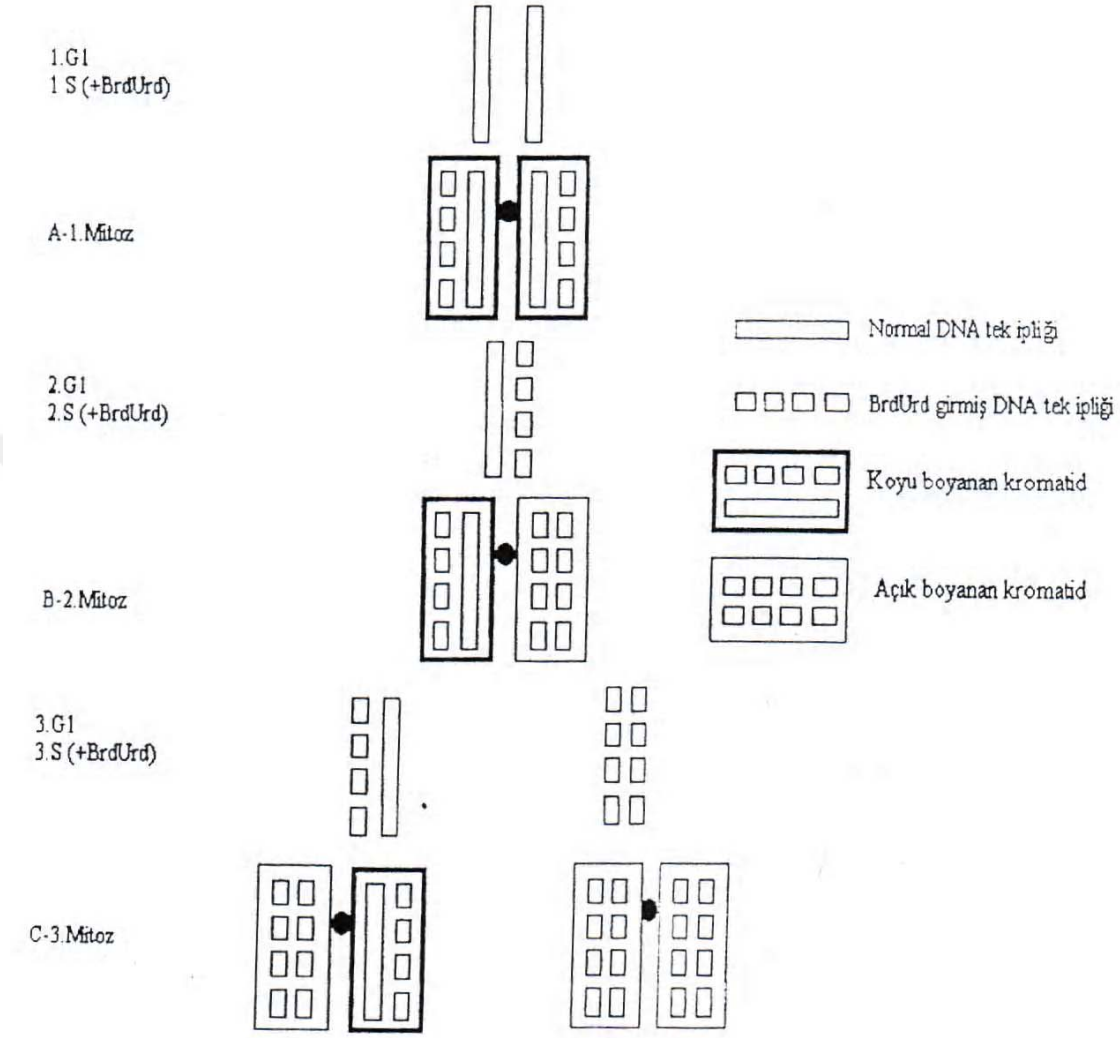
kromozom kırığı, kromatid kırığı, fragment, disentrik kromozom, kardeş kromatidlerde birleşme (sister union), halka kromozom, kromatidlerde değişim (triradial, quadriradial şekiller), gap, kromozom kontraksiyonu, poliploidi, endoreduplikasyon, translokasyon, inversiyon gibi kromozom aberasyonları meydana gelebilir [Çakmak, 2000; Çelik, 2003]. Yakın kromozomlardaki basit kırıklarda, kırık uçlar tekrar birleşebilmekte ve ortaya yeniden düzenlenmiş kromozomlar çıkmaktadır. Bu olay onarılma şeklinde ya da disentrik kromozomlar, translokasyonlar, ters dönmeler (inversiyon) biçiminde olabilmektedir. Daha karmaşık düzenlemeler ise halka (ring) şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Asentrik fragmentlerin oluşumu ise kromozomlardaki basit kırıklar sonucudur. Kromatid açıklığı olan gap ise kromatid kolundaki boyanmamış açıklıklar olarak bilinir, bunlar kromatid koluyla aynı uzantıdadır ve kromatid koluyla arasındaki uzaklık kol kalınlığına eşit ya da daha küçüktür. Kırıklar ise kromozomun bir veya iki kolundaki kopmuş bölgelerdir ve genişlikleri bir kromatidin genişliğinden daha fazladır [Mace ve ark., 1978]. Kültüre alınmış insan lenfositlerinde, genotoksik ajanlara maruziyet sonucunda oluşan kromozomal anormalliklerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Çünkü hücrelerde ortaya çıkan kromozomal anormalliklerin kanser gelişiminde öncü haberci rolü oynadığı bilinmektedir [Krishnaja ve Sharma, 1994, 1995; Bonassi ve ark., 1995; Landi ve ark., 1999; Hagmar ve ark. 1998; Mamur ve ark., 2010].

2.4.2. Kardeş kromatid değişimi (KKD) testi

Kardeş kromatid değişimi, bir kromozomun iki kromatidinin homolog bölgelerinde kromatidlerin kırılan parçaları yer değiştirdikten sonra yeniden birleşmesi sonucunda oluşmaktadır [David ve Thompson, 2007]. BrdU, DNA'nın yapısında bulunan timin bazlarının analoğu olduğundan kültür ortamına BrdU eklendiğinde hücre DNA'sını replike ettiği sırada (1.S fazında) yeni sentezlenen polinükleotid ipliği içine timinin yerine ortamda bulunan BrdU'ni alacaktır. Böyle hücrelerin kromozomları boyandığında bir kromozomun her iki kromatidi de homojen koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler 1. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden meydana gelen yavru hücreler tekrar S fazına girdiğinde timin ihtiva eden polinükleotid ipliğine komplementer olarak sentezlenen

yeni DNA ipliğinde BrdU yer alacaktır. Bu iki polinükleotid ipliği bir kromozomun koyu boyanan kromatidini (BrdU/dT) oluşturacaktır. BrdU'li ipliğe komplementer olarak sentezlenen yeni ipliğe de BrdU girecektir ve bir kromatidi oluşturan iki polinükleotid ipliği de BrdU ihtiva ettiklerinden (BrdU/BrdU) bu kromatid aynı kromozomun açık boyanan kromatidini oluşturacaktır. Bu esnadaki metafaz devresinde preparat yapıldığında, hücrenin tüm kromozomlarının kromatidlerinden biri koyu diğeri ise açık renkte boyanacaktır. Bunlar da ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir. Bu hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdU'li ortamda 3.S fazı) ikinci mitozda açık boyanan kromatidden tüm polinükleotid ipliklerine BrdU girmiş olan bir kromozom meydana gelecektir. Bu kromozomun her iki kromatidi de açık renkte boyanacaktır (Şekil 2.5) [Latt ve ark., 1980]. BrdU'nin hücre döngüsü sırasında kardeş kromatidlerin arasına girmesinin ardından, flörasan ışık altında ışınlanıp Giemsa ile boyanarak kardeş kromatidlerdeki kırıklar görünür hale gelir [Natarajan, 2002]. Boyama sonrasında, tek bir ipliğinde yer değiştirme olmuş kromatid, her iki ipliğinde yer değiştirme olmuş kromatide göre daha parlak flüoresan verir. Yapılan incelemede, bir kromatid iki tane BrdU içeren zincir taşıdığı için açık renk, diğeri bir timinli bir de BrdU'li zincir taşıdığı için koyu renkli gözlenir [Perry ve Wolff, 1974]. Bu şekilde kardeş kromatidlerdeki değişimler belirlenmiştir.

KKD, kromozom morfolojisinde bir değişme olmadan, bir kromozoma ait iki kromatidin homolog bölgelerindeki kırılan parçaların karşılıklı yer değiştirdikten sonra tekrar birleşmesi ile oluşmaktadır. Mitoz bölünme sırasında oluşan kardeş kromatid değişimlerinin frekansında meydana gelen artışlar, genotoksisitenin değerlendirmesinde ve DNA hasarına neden olan ajanların erken biyolojik etkilerinin belirlenmesinde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [Perry ve Evans, 1975; Houpter 1985; Aksoy ve ark., 2006; Çelik ve ark., 2006]. KKD tek başına genotoksik riski belirlemede yetersizdir. Fakat, KKD deneysel çalışmalarda, indikatör test olarak insanlarda genotoksik etkileri göstermede uygun bir yöntem olarak kullanılmaya devam etmektedir [Norppa ve ark., 2006].



Şekil 2.5. BrdU'nin DNA yapısına girmesi ile birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması [Topaktaş ve Speit, 1990]

2.4.3. Mikronükleus (MN) testi

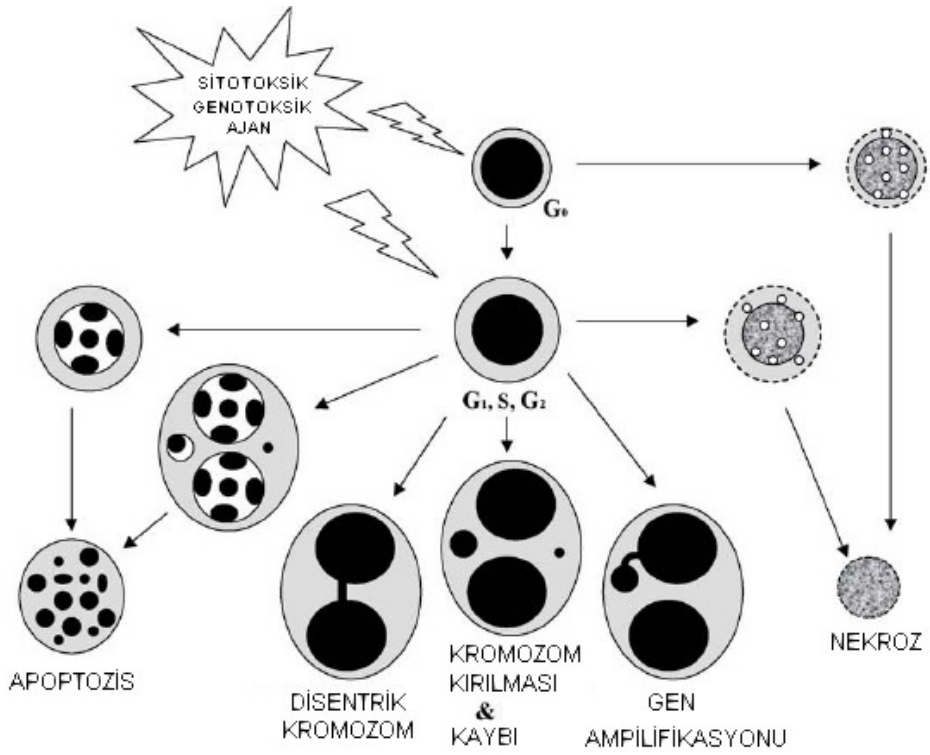
Mikronükleus yöntemi ilk olarak 1886 yılında anemik kedilerin kırmızı kan hücrelerinde Howell'in gözlemleriyle ortaya çıkmıştır. 1907'de Jolly, mikronükleusların varlığını doğrulamıştır. Bu yüzden mikronükleuslar, hematolojide Howell-Jolly cisimleri olarak bilinirler [Anwar ve ark., 1994].

1976 yılında Countryman ve Heddle insan lenfositlerinde mikronükleus yöntemini genotoksik hasarın belirlenmesi için metafaz analizine alternatif olarak önermiştir. Sitokinezin durdurulduğu mikronükleus yönteminde kullanılan Cyt B, aktin polimeraz inhibitörü olan bir maddedir. Bu özelliği ile nükleer bölünmeyi durdurmadan, mitotik sitokinezi yani sitoplâzmanın bölünmesini durdurur. Cyt B etkisiyle, hücre çekirdeği bölünürken, sitoplâzma bölünmesi (sitokinez) durur ve iki nükleuslu hücreler ortaya çıkar [Kirkland, 2010; Kirsch-Volders ve ark., 2011].

Mikronükleuslar, spontan olarak ya da genotoksik ajanlara maruz kalmak sonucunda, asentrik kromozomal fragmentlerin ya da tüm kromozomların hücre bölünmesi sırasında, ana çekirdek dışında yavru çekirdek şeklinde kalmasından oluşmaktadır. Mitozun anafazında sentrik elementler kutuplara çekilirken, genotoksik ve/veya aneugenik etkiler sonucu ortaya çıkmış asentrik elementler ve iğ ipliklerine bağlanamamış kromozomlar kutuplara çekilemezler. Bunlar hücre bölünmesi sonunda aynı sitoplâzma içinde, hücre çekirdeğinden ayrı olarak membranla çevrili bir yapı oluşturur [Çakmak, 2000; Kirsch-Volders ve ark., 2011].

MN kromozom instabilitesini gösteren bir belirteçtir. MN, tümör hücrelerinde, DNA tamir mekanizması zarar görmüş hücrelerde ve hücre siklusu kontrol noktaları bozulmuş hücrelerde yüksek bulunmuştur [Terrades ve ark., 2010].

Günümüzde mikronükleus metodu, genotoksisite ve sitotoksisite çalışmalarında; kromozom kırığı, kromozom kaybı, kromozomların farklı şekillenmesi (nükleoplasmik köprüler), hücre bölünmesinin inhibe edilmesi, gen ampilifikasyonu, nekrosis ve apoptosisin basit morfolojik ölçütler kullanılarak değerlendirilmesini sağlar [Fenech, 2000, 2006; Fenech ve ark., 2003].



Şekil 2.6. Sitotoksik ve genotoksik ajanların etkisiyle mikronükleus oluşumu, apoptozis ve nekroz [Fenech, 2006'dan]

2.4.4. Comet testi (Tek hücre jel elektroforezi, SCGE)

Comet testi; hızlı, basit ve hücresel düzeyde uygulanması kolay, DNA hasarını yüksek hassasiyetle belirlemede kullanılan genotoksisite testlerinden biridir [Valverde ve Rojas, 2009; Kumaravel ve ark., 2009]. Comet testi yönteminin temel prensibi; kimyasal ve fiziksel nedenlerle oluşan genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreler üzerindeki etkilerini, hücrelerin DNA'larını tek tek inceleyerek tespit etmektir [Poli ve ark., 1999]. Eğer çeşitli genotoksik ajanlarla hasara uğrayan DNA'lar tamir mekanizmaları ile tamir edilememiş, tek veya çift DNA zincirlerinde kırılmalar oluşmuş ise; kırılan parçalar molekül ağırlıklarına ve taşıdıkları elektrik yüküne göre elektroforetik ortamda farklı hızlarda göç ederler.

DNA molekülleri ethidium bromid ile boyanıp flüoresan mikroskop altında incelendiğinde hasarın derecesine göre DNA'lar kuyruklu yıldıza benzer görüntüler

oluşturur. İlk kez 1984 yılında Ostling ve Johanson tarafından tek hücre düzeyinde DNA hasar tespitinin hassasiyetini artırmak üzere 'Tek Hücre Jel Elektroforez Tekniği' geliştirilmiştir. Bu teknikte mikroskop lamı üzerinde, ince bir tabaka agar jeline süspanse edilen az sayıda hücre yoğun tuz ve deterjan içeren lizis çözeltisinde bekletilip nötral pH şartlarda kısa bir süre elektroforeze tabii tutulmuştur. DNA göçünün miktarı DNA'ların etidyum bromür ile boyanmasıyla oluşan flüoresansın yoğunluğunun flüoresans mikroskobu ile ölçülmesi sonucu belirlenmiştir Nötral şartlarda gerçekleşen bu teknik ile DNA çift sarmal kırılmaları tespit edilirken, tek sarmal kırılmaları tespit edilememiştir. Oysaki DNA hasarına sebep olan çoğu ajan DNA çift sarmalından ziyade DNA tek sarmalında daha çok hasar meydana getirmektedir. Üstelik nötral koşullar altında çalışılan bu teknikle proteinler tam olarak uzaklaştırılmamaktadır [Ostling ve Johanson, 1984].

Yöntem daha sonra 1988 yılında Singh ve arkadaşları tarafından modifiye edilmiştir. Günümüzde birçok comet testi versiyonu vardır. Kullanılan tüm versiyonlar fiziksel ve kimyasal ajanların tetiklediği DNA hasarını alkali elektroforez ile belirleyen, Singh ve arkadaşlarının 1988 yılında yayınladığı versiyonu temel alır. Bu versiyon, uygulanan daha güçlü lizis şartları ile proteinlerin % 95'inden fazlasını yok edebilmektedir. Alkali elektroforez uygulaması ile çift zincir kırıklarının yanı sıra tek zincir kırıkları, alkali labil bölgeleri, onarımı tamamlanmamış DNA bölgeleri basit ve hassas bir şekilde belirlenmesi sağlanmıştır [Anderson ve ark., 1998; Hoffmann ve ark., 2005; Valverde ve ark., 2009]. Comet yöntemi sayesinde mutajenlerin neden olduğu olası DNA hasarı farklı hücre sikluslarında bile tespit edilebilmektedir [Mc Art ve ark., 2010]. Comet testi, DNA hasar oranı ve tamirini incelemede kullanılan hassas, güvenilir ve hızlı bir metoddur [Singh ve ark., 1990; Ghazalla ve ark., 2010].

2.5. Talasemili Olgularda Yapılan Genotoksik Araştırmalar

Talasemi, tedavi alanındaki yeni gelişmelerle fatal seyirli hastalıktan, kronik seyirli bir hastalığa dönüşmüştür. Demir bağlayıcı tedavilerin uygulamaya geçmesi ile hastalarda yüz güldürücü sonuçlar elde edilmiştir. Ancak yapılan genotoksisite çalışmalarında, bu ilaçların genotoksik etkilerinin de olabileceği gösterilmiştir [Hileti

ve ark., 1995]. Hastaların demir bağlayıcı ilaçları ömür boyu kullanmaları gerekmektedir. Her ilaçta olduğu gibi çok uzun süreli kullanımı gereken bu ilaçların da mevcut genotoksik etkisinin bilinmesi, hastaların takip ve tedavileri açısından büyük önem taşımaktadır.

Còtė ve Lagoyannı 1979 yılında, talasemili hastaların ve sağlıklı bireylerin periferal kan lenfosit kültürlerinde kromozomal anormalliklerine bakmışlardır. Talasemi majorlu olgulardaki kromozomal anormalliğin kontrol grubundan yüksek olduğunu belirlemişlerdir [Còtė ve Papadakou-Lagoyannı 1979].

Silva ve arkadaşları talasemili bireylerde, folat düzeyi ile kardeş kromatid değişim frekansı arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Düşük folat düzeyine sahip homozigot talasemili hastalar ile normal folat düzeyi olan heterozigot talasemili olgular ve sağlıklı bireyler karşılaştırılmıştır. Talasemili hastalarda KKD frekansı anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur [Silva ve ark., 1992].

Talasemi majorlu hastaların retikülositlerinde, artmış demir yükünün genotoksisitesini değerlendirmek amacıyla immuno manyetik seperasyon tekniğini kullanarak MN frekansını incelenmiştir. Kontrol ile hasta grubunun karşılaştırılmasında, hasta grubunun retikülositlerindeki MN frekansı yüksek bulunmuştur. MN frekansının yüksekliği organlarda biriken demirin genotoksik etkisi olduğunu göstermiştir [Offer ve ark., 2005] .

İtalya'da yapılan bir çalışmada 25 gün arayla kan transfüzyonu alan 10 talasemili olguda, kromozom anormallikleri incelenmiştir. Bu araştırmada, 1. gruba, 1. transfüzyonda deferiprone, 2. transfüzyonda desferroksamin, 3. transfüzyonda desferroksamin verilmiştir. 2. gruba ise 1. transfüzyonda desferroksamin, 2. transfüzyonda deferiprone, 3. transfüzyonda deferiprone kullanılmıştır. Bu iki gruptan 3. transfüzyonu takip eden 7. ve 20. günlerdeki kültür lenfositlerinde kromozom aberasyonları incelenmiştir. Birinci gruptaki (desferroksamin kullanan)

kromozom aberasyonları, ikinci gruba (deferiprone kullanan) göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur [Marshall ve ark., 2003].

Bunu takiben 2007 yılında demir bağlayıcı ilaç olan desferroksamin ile yapılan in vitro bir çalışmada Mikronukleus ve Comet testleri ile desferroksaminin genotoksik etkisi belirlenmiştir. İnsan lenfositlerinde desferroksamin P53 kontrol noktasını aktive ederek mitokondrial hasar ile apopitozise neden olmaktadır. 130 μM Desferroksamin ile belirli sürelerde (0, 3, 6, 12 ve 18 saat) muamele edilen lenfositlerde, mikronukleus frekansının süre uzadıkça arttığı gözlenmiştir. Ayrıca aynı doz desferroksamin ile 0, 12 ve 24 saat süreyle muamele edilen lenfosit kültürlerinden yapılan comet testinde ise comet kuyruk uzunluğunun süre ile doğru orantılı olarak (DNA hasarı) arttığı gözlenmiştir [Byeong ve ark., 2007].

2008 yılında Söker transfüzyona bağımlı 83 talasemili hastada oksidan / antioksidan sistem ve DNA hasarı oluşumunu ve saptanan değişikliklerin demir yükü ile ilişkisini araştırmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında talasemili hastalarda DNA hasarının artmış olduğu belirlenmiş ve talasemili olgularda serum ferritin düzeyi ile DNA hasarı arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir [Söker, 2008].

2008 yılında deferosiroks adlı ilacın da kullanıma sunulması ile aynı amaç için piyasaya sürülen bu ilaçların (desferroksamin, deferiprone ve deferosiroks) genotoksik etki açısından karşılaştırılmasını gündeme getirmiştir ve bu alanda yapılmış herhangi bir çalışma yoktur.

3. MATERYAL VE METOT

Çalışma, Gazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Genetik Toksikoloji Laboratuvarı ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD - Hematoloji Laboratuvarında yapılmıştır.

3.1. Materyal

Çalışmada kullanılan araç ve gereçler ile kimyasal malzemeler Çizelge 3.1 ve 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan araç ve gereçler

Adı	Marka
Vortex	NÜVE 400, TM
Santrifüj cihazı	Eppendorf Centrifüge 5804, Almanya
Mikrodalga fırın	Arçelik, TM
Hassas Terazi	Precisa XB 220, İsveç
Derin dondurucu (-80 ^{0}C)	Heto Ultra Freeze UF 5420,
Floresan mikroskop	Nikon Eclipse E 200
Uv tankı	TM
Elektroforez tankı	Cleaver scietific, İngiltere
Güç kaynağı	Thermo Electron Corporation, İngiltere,
1.5 ml. ependorf steril tüpler	Axygen Genuine
Pipet uçlar (sarı ve mavi)	Finntip
Otomatik mikropipet	Gilson ve Ependorf, Almanya
Manyetik karıştırıcı	Barnstead Thermolyne, Amerika
pH metre	Mettler Toledo
Cam malzemeler	

Çizelge 3.2. Kimyasal maddeler

Adı	**Marka**
Chromosome Medium B	Biochrome
Low melting agarose (LMA)	Applichem, Sigma
Normal melting agarose (NMA)	Biotechnology Grade
Cytochalasin B	Sigma
Formaldehit	Merck
Depex	Serva
Etil alkol-absolut	Merck
Metil alkol	Merck
HCl	Merck
EDTA Na_2	Merck
Biocoll	Biochrome
Glasial asetik asit	Merck
NaCl	Merck
KCl	Merck
Ethidium bromide	Applichem
NaOH	Sigma
BrdU	Sigma
Giemsa	Merck
Colchicine	Sigma
PBS, Ca^{+2} Mg^{+2} free	Sigma
Tris	Merck
Triton X-100	Sigma
DMSO	Merck
Trypan Blue	Biochrom AG
KH_2PO_4	Sigma
$C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$	Sigma
$HNa_2O_4P(12\ H_2O)$	Sigma

Çizelge 3.2. (Devam) Kimyasal maddeler

Adı	Marka
RPMI1640 Besi Yeri	PAA Laboratories gmbH
Nitrik Asit [HNO3]	Merck
Fetal Bovine Serum	Biochrome

Araştırmada hastalara ait kan örnekleri, Talasemi major (TM) tanısı ile AÜTF Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı tarafından izlenmekte olan hastalardan alınmıştır. Kontrol örnekleri ise, çocuk kliniği ve diğer kliniklere kontrol amacı ile başvuran, sigara içmeyen, kronik bir hastalığı ve hematolojik hastalığı olmayan bireylerden temin edilmiştir. Hastalar düzenli olarak üç haftada bir, kan transfüzyonu için hastaneye geldiklerinde, bir defaya mahsus olmak üzere, transfüzyon öncesi 2,5 ml kan örneği alınmıştır.

Çalışma, Haziran 2009 – Haziran 2011 tarihleri arasında, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Kliniğinde takip edilen 51 talasemi majorlü hasta ve 30 sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 81 olguda gerçekleştirilmiştir. Cinsiyetlere göre dağılımlara bakıldığında; hasta grubunda 33 erkek ve 18 kadın, kontrol grubunda ise 15 erkek ve 15 kadın değerlendirmeye alınmıştır.

Hasta grupları yaşlarına, kullandıkları demir atıcı ilaçlara ve ferritin değerine göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır.

- Grup I: 0 – 10 yaş Talasemi majorlu; 22 hasta
  0 – 10 yaş sağlıklı; 10 kontrol

- Grup II: 10< – ≤ 20 yaş; Talasemi majorlu; 17 hasta
  10 – ≤ 20 yaş sağlıklı; 10 kontrol

- Grup III: 20 yaş üstü Talasemi majorlu; 13 hasta
  20 yaş üstü sağlıklı; 10 kontrol

- Kullandıkları demir bağlayıcı ilaca göre

  Desferroksamin (Desferal, DFO) kullanan; 15 hasta

  Deferasiroks (Defarosiroks) kullanan; 20 hasta

  Desferroksamin +Deferiprone kullananlar; 13 hasta

  Sağlıklı; 30 kontrol

- Ferritin düzeylerine göre

  2000 ng/ml' nin altında; 15 hasta

  2000 ng/ml' nin üstünde; 16 hasta

- Yaş, cinsiyet, ferritin düzeyleri arasındaki ilişkiye göre 51 hasta değerlendirmeye alınmıştır.

Bu çalışma; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurulunun 05.06.2009 tarih, 12989 sayılı kararı ve izni ile yürütülmüştür.

3.2. Metod

3.2.1. *In vitro* kromozomal anormallik (KA) ve kardeş kromatid değişimi (KKD testleri

Demir bağlayıcı ilaç tedavisi gören hastalardan ve sağlıklı kontrollerden alınan 1/10 heparinize periferik kanın 200 µl'si besi ortamına (Chromosome Medium B) ekilmiştir. Bu ortama, daha önceden sartorius membran filtre ile steril edilerek hazırlanan BrdU [5-Bromo-2-deoksiuridin: Bromodeoksiüridin] solüsyonundan her tüpe 10 µg/ml olacak şekilde ilave edilerek 37ºC'deki inkübatörde 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin bitiminden 2 saat önce kültürün 70. saatinde her tüpe kolkisin (0.06µg/ml) solüsyonundan eklenmiştir. İnkübasyon süresinin bitiminde tüpler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip üstte kalan sıvı (süpernatant) atılmıştır. Sonra bu tüplere, 0.075 M KCI (Potasyum klorür) hipotonik solüsyonundan vorteks üzerinde ilave edilmiştir. Tüpler 30 dakika 37ºC'de bekletilmiştir. Daha sonra tüpler 10 dk. 1200 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant

atılmış ve 3:1 metanol: asetik asitten oluşan soğuk fiksatif ilave edilmiştir. + 4 ºC'de 45 dk. fiksatif ile muamele edilen hücreler 10dk. 1200 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem iki kez daha tekrarlanmıştır. Son fiksatif işleminin sonunda tüpün dibinde kalan hücre topluluğu (0,5 -0,7 ml) homojen hale getirilerek preparatlar hazırlanmıştır.

Preparatların hazırlanması

Cam pipete 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekilmiştir. Daha önceden temizlenmiş ve -20 ºC'de saklanmış lamların üzerine 25 cm yükseklikten farklı alanlara 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 4-5 damla) hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Preparatların boyanması

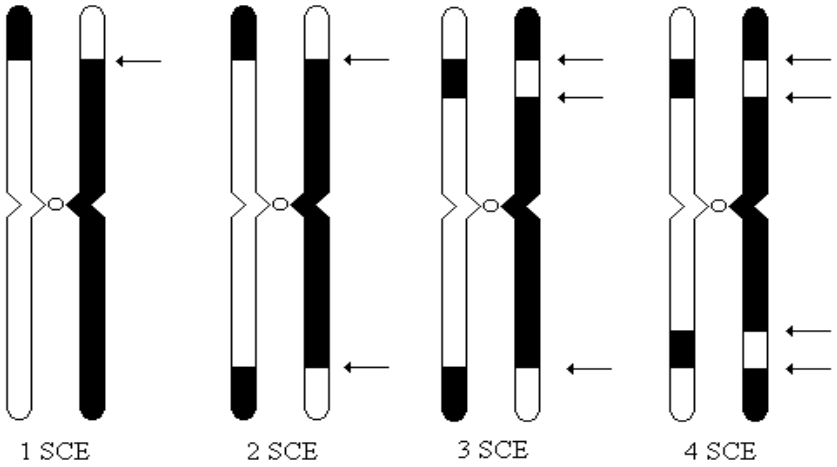
Preparatlar kuruduktan sonra KA testi için Sorensen tamponu ile hazırlanan %5'lik Giemsada boyanmıştır. Preparatlar DPX ile daimi hale getirilerek mikroskobik incelemeye alınmıştır.

KKD sayımı için bir kromozoma ait kardeş kromotidlerin farklı boyanmasını sağlamak amacıyla Speit ve Haupter'in [1985] geliştirdikleri metot modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu metoda göre bir gün boyunca kurutulan preparatlar düz bir tepsiye konarak üzeri ince bir tabaka halinde ışınlama solüsyonu (Sorensen tamponu, pH=6,8) ile kapatılmıştır. Bu preparatlar, 15 cm yükseklikten, 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen UV lambası ile ışınlanmıştır. Işınlama sona erdikten sonra preparatlar 60 ºC sıcaklıktaki 1xSSC (Sodyum klorür + Tri-Sodyum sitrat) solüsyonunda 1 saat inkübe edilmiş ve sonrasında preparatlar Sorenson tamponu ile hazırlanan %5'lik Giemsa ile 20–25 dakika boyanmıştır.

Mikroskobik inceleme

Preparatlar Nikon Eclipse E200 marka binoküler ışık mikroskobunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (10x100 büyütmede). Her bir donörden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış kromozomlara sahip toplam 100 hücre kromozomal anormalliği (KA) saptamak amacıyla incelenmiştir. Bu hücreler içinde gözlediğimiz kromozom yapı ve sayı anormallikleri Uluslararası İnsan Sitogenetik Adlandırma Sistemine (ISCN= International System for Human Cytogenetic Nomenclatur) uygun olarak değerlendirilmiş ve adlandırılmıştır. İncelenen bu 100 hücre içinde hücre başına düşen yapısal kromozom anormalliklerinin (yapısal KA/hücre) sayısı ile anormallik içeren hücrelerin yüzdesi bulunmuştur. Bu çalışmada gap'lar anormallik olarak değerlendirilmemiştir. Kromozom kırığı, kromatid kırığı, fragmentler kromozom tipi anormallikler olarak değerlendirilmiştir. Mitotik indeks için her donöre ait preparatlardan toplam 1000 hücre incelenmiş ve bunlar arasındaki metafaz evresinde olan hücreler saptanarak kaydedilmiştir. 1000 hücre içerisinde metafazların oranı yüzde cinsinden hesaplanarak mitotik indeks saptanmıştır.

Kardeş kromatid değişimi sayısının belirlenmesinde, her bir bireye ait preparatta, kromozomları iyi dağılmış ve ikinci mitoz bölünme geçiren 25'er hücre incelenmiştir (Resim 3.1). KKD sayısı bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla belirlenmiştir [Topaktaş ve Speit, 1990]. Ortadan bir parça değişimi olmuş ise bu iki KKD olarak, uçtan parça değişimi olmuş ise bu da bir KKD olarak sayılmıştır. Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekir. Bu durumdaki kromozomlarda KKD yoktur.



Şekil 3. 1. Birli, ikili, üçlü ve dörtlü kardeş kromatid değişimleri

Replikasyon indeksini hesaplamak için tesadüfî seçilmiş 100 hücre incelenmiştir ve birinci, ikinci ve üçüncü metafaz devresindeki hücreler sayılmıştır. Replikasyon indeksi hesaplaması için şu formül kullanılmıştır:

[(1xM1)+(2xM2)+(3xM3)] / N

N= Gözlenen hücre sayısı]
M1: 1. Mitozdaki hücre sayısı
M2: 2. Mitozdaki hücre sayısı
M3: 3. Mitozdaki hücre sayısı

3.2.2. Mikronükleus testi

Mikronükleus sayısını saptamak için Fenech [2000] ve Kirsch-Volders ve arkadaşları [2003] tarafından geliştirilen metod modifiye edilerek kullanılmıştır. Mikronükleus çalışmasında, lenfosit kültürlerinin hazırlanmasında 1/10 oranında heparinize edilmiş 200 µl kan, 2,5 ml'lik besi ortamına (Chromosome Medium B) ekilmiştir. Kültür tüpleri 37ºC'deki etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyonun 44. saatinde sitokenezini durdurmak için kültüre 7 µl sitokalasin B (5,2 µg/mL) ilave edilmiştir.

İnkübasyon süresinin bitiminde tüpler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Tüpün dibinde kalan ve hücreleri ihtiva eden 0,5-0,7 ml'lik kısmı vorteks yardımıyla iyice karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Sonra bu tüplere, 4 ºC'de bekletilen hipotonik solüsyondan 0,075 M KCl ilave edilmiş ve tüpler 4 ºC'de 5 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Tüplere 3: 1 metanol: asetik asitten oluşan soğuk fiksatif ilave edilmiş ve buzdolabında 10 dakika bekletilmiştir. Fiksatifle yıkama işlemi üç kez tekrarlanmıştır. Üçüncü fiksatife sitoplâzmaların korunması amacıyla % 1'lik formaldehit ilave edilmiştir.

Son fiksatif işleminin sonunda tüpün dibinde kalan 0,5-0,7 ml'lik çökelti pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Cam pipete çekilen bu süspansiyon, daha önceden temizlenmiş ve % 70'lik etil alkolde buzdolabında bekletilen nemli lamlar üzerine 10- 15 cm yükseklikten farklı alanlara damlatılmıştır. Hazırlanan bu preparatlar 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmışlardır.

Preparatların boyanması

Preparatlar kuruduktan sonra Sorensen tamponu ile hazırlanmış % 5'lik Giemsa ile (pH=6,8) 15-20 dakika boyanmıştır. Kuruyan preparatlar depex ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir.

Mikroskobik inceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar Nikon Eclipse E200 marka bioküler ışık mikroskobunda 40'lık objektif ile incelenmiştir (10x40 büyütmede). Bu incelemeler sırasında her bir donörden hazırlanan preparatlardan 1000 tane iki-nukleuslu (binükleer) hücre incelenmiş, bu iki nukleuslu hücreler içerisinden mikronukleuslu olanlar saptanmıştır. Ayrıca aynı donörden hazırlanan preparatlardan 500 tane hücre sayılmış, bu hücreler arasından bir, iki, üç ve dört nukleuslu olanların sayıları saptanmıştır (Resim 3.2). Bu orandan yola çıkarak Nükleer Bölünme İndeksi (NBI), (Nuclear Division Index, NDI) hesaplanmıştır [Fenech, 2000].

Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

NDI=[(1xN1)+(2xN2)+(3xN3)+(4xN4)] / n

N1: 1 nukleuslu hücre sayısı *N3*: 3 nukleuslu hücre sayısı

N2: 2 nukleuslu hücre sayısı *N4*: 4 nukleuslu hücre sayısı

n: Toplam hücre sayısı

3.2.3. Comet analizi

Comet yöntemi Sing ve arkadaşlarının (1988) metoduna göre bazı değişikliklerle gerçekleştirilmiştir. 100'er µl kan ile 1'er ml PBS (Fosfat Buffer Solution) Ependorf tüpte süspanse edilip, 10 dak. buz içerisinde bekletilmiştir. Süre sonunda 100'er µl lenfosit ayırıcı solüsyonu ilave edilmiştir. 1060 rpm de 3 dakika santrifüj edilmiş ve santrifüj sonrasında oluşan, lenfositlerin olduğu tabakadan 100 µl pipet yardımıyla alınmıştır. Çalışma yapılıncaya kadar örnekler – 80 ºC'de saklanmıştır [Hininger ve ark., 2004; Chuang ve Hu, 2004]. Yeterli örnek sayısına ulaşınca örnekler 37 ºC'de eritilerek 1:1 oranında PBS ile karıştırılarak 5 dk. 3000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmıştır. LMA (Low Melting Agar) ile lenfositler karıştırılmış ve lam üzerine yayılmıştır. Kapatılan lamlar 20-25 dakika buzdolabında bekletilmiş ve süre sonunda lam üzerindeki lameller kaldırılarak, içerisinde lysing solüsyonu bulunan şale içerisine yerleştirilmiştir. Buzdolabında en az 1 saat bekletilmiştir. Şaleden çıkarılan lamlar elektroforez tankında bulunan tampon içersine konulup burada 20 dakika bekletildikten sonra 20 dakika 25 V 300 mA'de DNA kırıklarını görünür hale getirmek için elektroforetik yürütme işlemi uygulanmıştır. Elektroforez sonrasında lamlar nötralizasyon tamponunda 5 dakika bekletilmiştir. Her bir lama EtBr damlatılarak boyama yapılmıştır. Flöresan mikroskopta her bir örnek için 100 hücre ölçümü "Comet Assay IV", Perceptive Instruments Ltd. UK analiz sistemi kullanılarak yapılmıştır. Test sonuçları kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu olarak belirlenmiş ve elde edilen veriler kontrol grubu ile istatistikî olarak karşılaştırılmıştır.

3.2.4. İstatistiksel analiz

Analizler için SPSS 15,0 ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nca geliştirilen Clustered Data paket programı kullanılmıştır. Normal dağılıma uymayan veriler ortalama, standart hata, medyan, minimum-maksimum tanımlayıcıları ile verilmiştir. İki grup arasındaki farklılık için Mann-Whitney U ve ikiden fazla grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testleri kullanılmıştır. Ayrıca replikasyon indeksi ve nükleer bölünme indeksi z testi ile analiz edilmiştir. Parametreler arası iliskiler ise Spearman's korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir. Sonuçlar % 95'lik güven aralığında, anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir [Conover, 1980].

4. BULGULAR

4.1. Kromozomal Anormallik Sonuçları

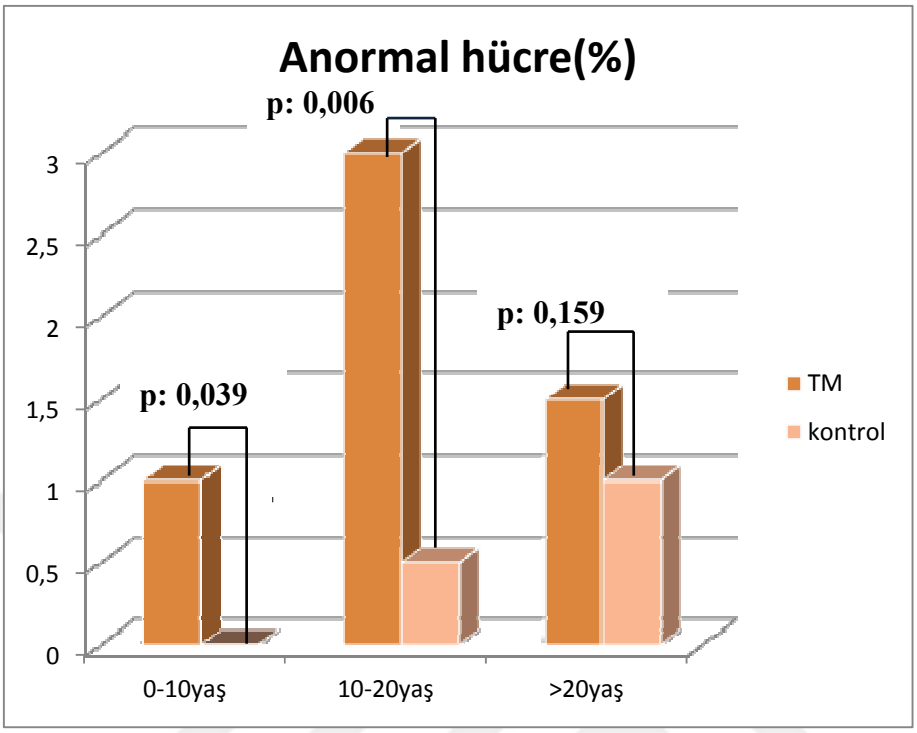
TM'lü hastaların lenfosit kültürlerinde üç tip komozomal anormallik gözlenmiştir. Bunlar; kromatit kırığı, kromozom kırığı ve fragmenttir (Resim 4.1). Grup 1 ve Grup 2 hastaların KA/hücre ve anormal hücre değerleri, kontrol grubundan anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (sırasıyla p: 0,039 ve 0,006). Grup 3 hastaların kromozomal anormallik düzeyleri kontrole göre artmış görünmesine rağmen istatistiksel anlam ifade etmemektedir (p: 0,159, Çizelge 4.1, Şekil 4.1).

Çizelge 4.1. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre kromozomal anormallik frekanslarının karşılaştırılması

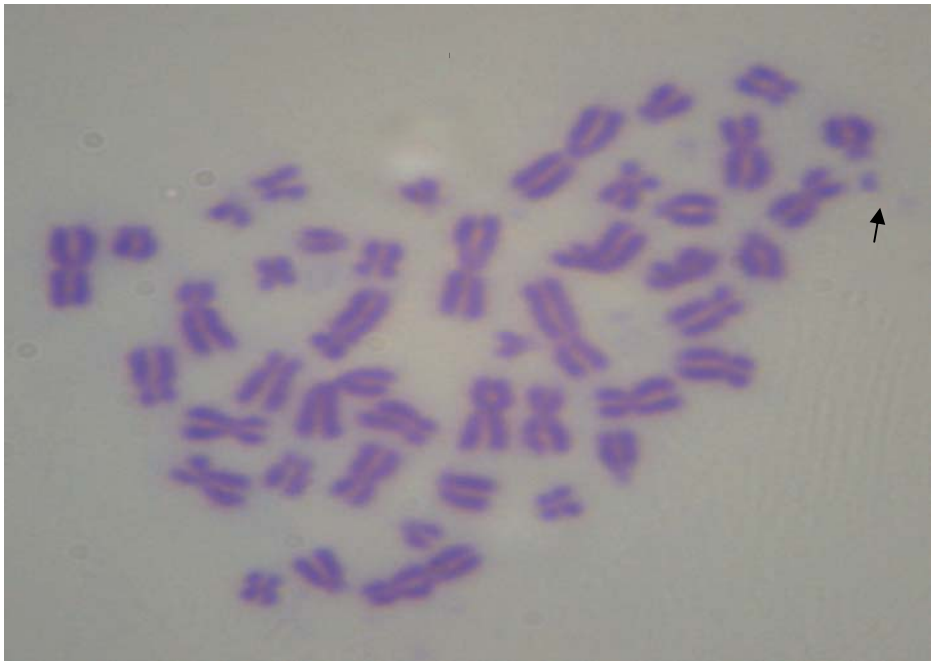
Grup		**Anormallikler**			**KA/Hücre ±SH**	**Anormal Hücre ± SH (%)**	**Medyan**	**Min-mak**	**P+**
		ktk	**kzk**	**f**					
I (0-10 yaş)	**T. major n=22**	**32**	**-**	**5**	0,017±0,004	1,73±0,36	1,00	0 - 5	**0,039**
	Kontrol n=10	**3**	**-**	**2**	0,013±0,002	1,34±0,22	0,00	0 -2	
II (10-20 yaş)	**T. major n=16**	**37**	**1**	**7**	0,027±0,00	2,71±0,45	3,00	0 - 6	**0,006**
	Kontrol n=10	**7**	**-**	**-**	0,007±0,003	0,70±0,26	0,50	0 - 2	
III (>20 yaş)	T. major n=12	17	3	4	0,020±0,006	2,00±0,59	1,50	0 - 7	0,159
	Kontrol n=10	7	-	1	0,008±0,003	0,80±0,25	1,00	0 - 2	

+Mann Whitney U testi

***Ktk**: kromatit kırığı; **kzk**: kromozom kırığı; **f:** fragment; **KA/Hücre**: hücre başına düşen anormallik sayısı;**Anormal hücre (%):** 100 hücrede anormallik gözlenen hücre sayısı; **SH**: standart hata; **Min- mak**: Gözlenen en az kromozomal anormallik sayısı- en yüksek kromozomal anormallik sayısı*

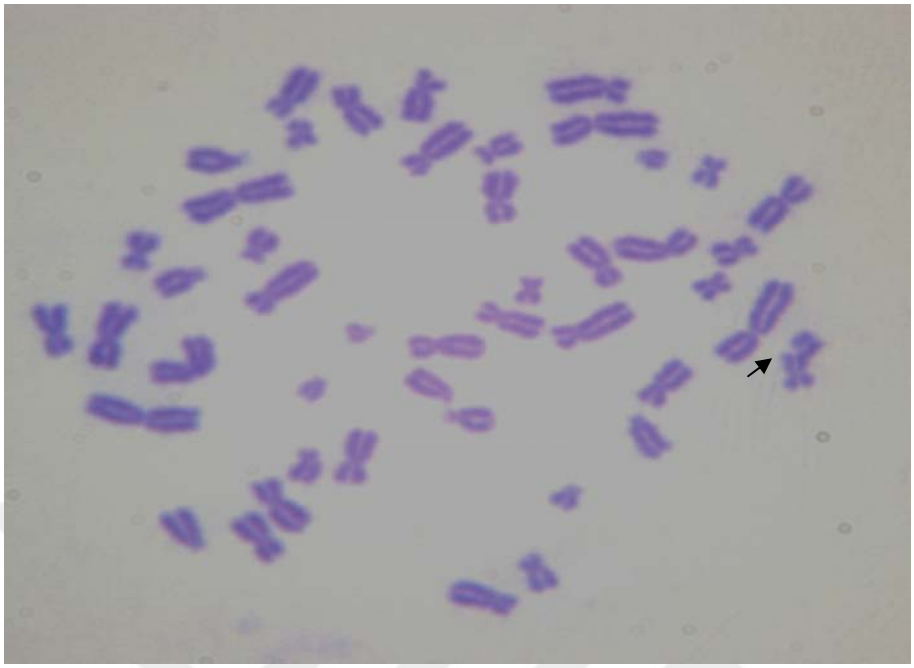


Şekil 4.1. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre anormal hücre (%) medyan değerlerinin dağılım grafiği

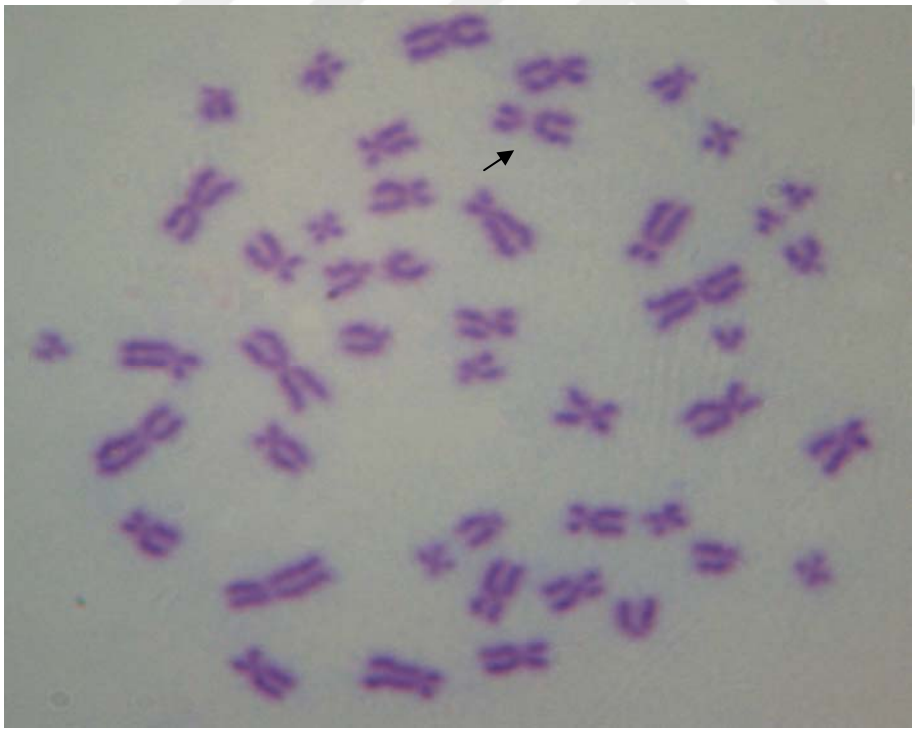


a

Resim 4.1.TM'lü hastalarda gözlenen kromozomal anormallikler
a)Fragment b) Kromatit kırığı c) Kromozom kırığı



b



c

Resim 4.1.(Devam) TM'lü hastalarda gözlenen kromozomal anormallikler
a) Fragment b) Kromatit kırığı c) Kromozom kırığı

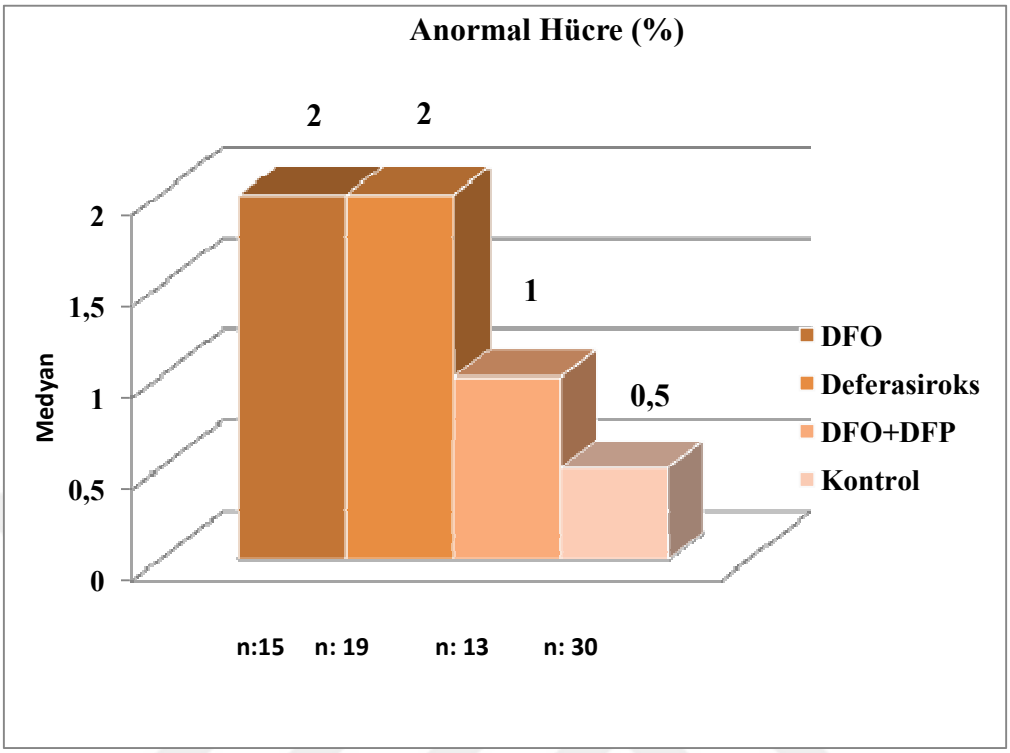
İlaca bağlı kromozomal anormalliği değerlendirmek için, DFO kullanan 15 olgu, Deferasirox kullanan 19 olgu, DFO+DFP kombine kullanan 13 olgu ile 30 sağlıklı birey değerlendirmeye alınmıştır (Çizelge 4.2, Şekil 4.2). DFO ve Defarosiroks kullanan hastaların KA değerleri arasında istatistiksel olarak fark yok iken (0,730), DFO tedavisi alan grubun KA değeri, DFO+DFP kombine tedavi alan gruptan ve kontrolden yüksek bulunmuştur (sırasıyla p: 0,057 ve 0,001). Defarosiroks tedavisi alan grubun KA değeri, DFO+DFP kombine tedavi alan gruptan yüksek bulunmasına rağmen istatistiksel fark bulunmamıştır (p:0,093). Ancak Defarosiroks kullanan hastaların KA değeri, kontrol grubundan istatistiksel anlamda yüksek bulunmuştur. (p<0,001). DFO+DFP kombine tedavi alan grubun kromozomal anormallikleri kontrole göre artmış, ancak bu durum istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p: 0,171).

Çizelge 4.2. Hasta ve kontrol gruplarında kromozomal anormallik frekanslarının demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre karşılaştırılması

Grup	Ferritin	Anormallikler			KA/Hücre ±SH	Anormal Hücre ±SH(%)	Medyan	Min-mak	P
		ktk	kzk	f					
DFO kullanan n=15	**1562±861**	**32**	**1**	**5**	0,03±0,005	2,53±0,48	2,00	0 – 6	**0,730[a]**
Defarosiroks kullanan n=19	**1407±931**	**35**	**-**	**8**	0,02±0,004	2,32±0,40	2,00	0 -5	**0,057 [b]** **0,001 [c]**
DFO+DFP kullanan n=13	**3273±2322**	**14**	**3**	**2**	0,02±0,006	1,62±0,59	1,00	0 -7	**0,093 [d]** **0,001 [e]**
Kontrol n=30	**-**	**17**	**-**	**3**	0,08±0,001	0,67±0,14	0,50	0 – 2	**0,171 [f]**

Mann Whitney U testi, Kruskal Wallis Testi
***a**: DFO / Defarosiroks**; b**: DFO / DFO+DFP; **c**: DFO / Kontrol; **d**: Defarosiroks / DFO+DFP;**e**: Defarosiroks / Kontrol; **f**: DFO+DFP / Kontrol*

***Ktk**: kromatit kırığı; **kzk**: kromozom kırığı; **f:** fragment; **KA/Hücre**: hücre başına düşen anormallik sayısı;**Anormal hücre (%):** 100 hücrede anormallik gözlenen hücre sayısı; **SH**: standart hata; **Min- mak**: Gözlenen en az kromozomal anormallik sayısı- en yüksek kromozomal anormallik sayısı*



Şekil 4.2. Hasta ve kontrol gruplarında anormal hücre (%) medyan değerlerinin demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre dağılım grafiği

Çizelge 4.3. Hasta gruplarında kromozomal anormallik frekanslarının hasta gruplarında ferritin düzeylerine ve cinsiyete göre karşılaştırılması

Grup	Anormallikler			KA/Hücre ±SH	Anormal Hücre±SH(%)	Medyan	Min-mak	P
	ktk	kzk	F					
Ferritin düzeyi<2000 ng/ml n=34	**55**	**1**	**9**	0,020±0,003	2,00±0,28	2,00	0 – 5	
Ferritin düzeyi>2000 ng/ml n=16	**30**	**3**	**6**	0,024±0,006	2,44±0,58	1,50	0 -7	**0,727** [a]
Erkek n: 32	**42**	**-**	**10**	0,017±0,003	1,69±0,27	1,00	0 -6	
Kadın n: 18	**43**	**4**	**5**	0,029±0,005	2,94±0,51	3,00	0 – 7	**0,043** [b]

Mann Whitney U testit
***a:** Ferritin düzeyi<2000ng/ml / Ferritin düzeyi>2000ng/ml; **b**: E/K;*

***ktk:** kromatit kırığı;**kzk**: kromozom kırığı; **F**: fragment; **Anormal hücre (%)**: 100 hücredeki anormallik gözlenen hücre sayısı; **SH**: standart hata; **Min- mak**: Gözlenen en az kromozomal anormallik sayısı- en yüksek kromozomal anormallik sayısı*

Ferritin düzeylerine göre sınıflandırılan her iki hasta grubunda da KA düzeyleri açısından anlamlı bir fark belirlenmemiştir (p: 0,727). Cinsiyet dağılımına göre bakıldığında kadınlarda kromozomal anormallik değeri daha yüksektir (p: 0,043, Çizelge 4. 3).

Ferritin ve yaş ile kromozomal anormallik arasında pozitif yönde ilişki var iken, istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır (sırasıyla p: 0,868, 0,387; r: 0,024, 0,125, Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Hasta gruplarında kromozomal anormallik (KA) frekansları ile ferritin düzeyleri ve yaş arasındaki ilişki

Grup	P	R
Yaş	0,387	0,125
Ferritin	0,868	0,024

Spearman korelasyon testi
İstatistilsel anlamlılık için p<0.01 kabul edildi.

4.2. Hücre Proliferasyonu Göstergesi: Mitotik İndeks Sonuçları

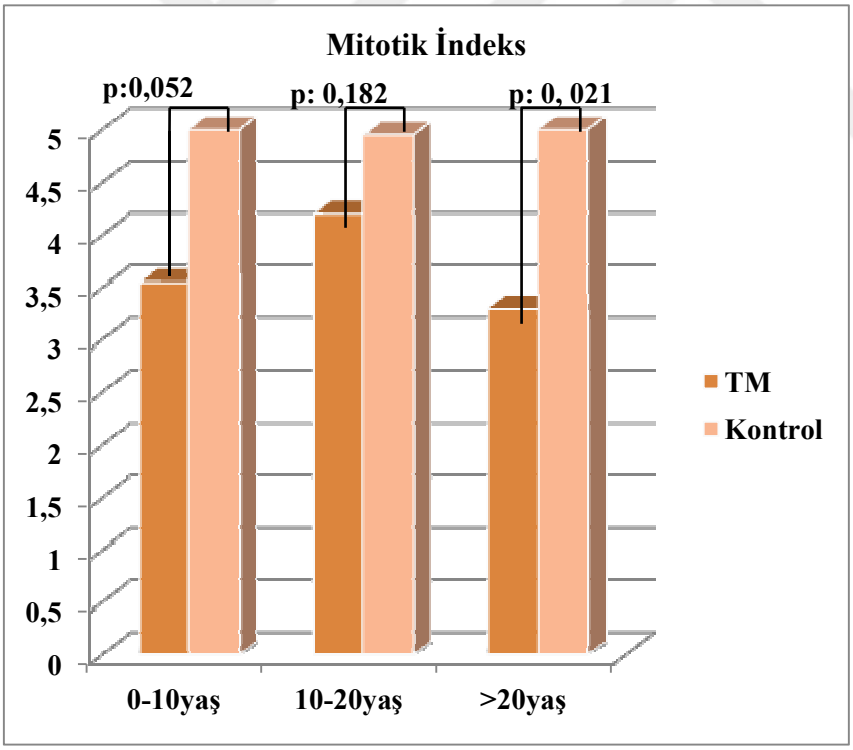
Grup 1 ve Grup 2'deki hastaların mitotik indeks düzeyleri kontrol grubuna göre daha düşük bulunmasına rağmen, mitotik indeksteki bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (sırasıyla p: 0,052 ve 0,182) (Çizelge 4.5). Grup 3'deki hasta grubunun mitotik indeks düzeylerinin kontrolden düşük ve anlamlı olduğu belirlenmiştir (p: 0,021).

Çizelge 4.5. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre mitotik indeks (Mİ) frekanslarının karşılaştırılması

Grup		Mİ ± SH	Medyan	Minimum-maksimum	P
I (0-10 yaş)	T. major n=22	3,98 ± 0,35	3,55	2,2 – 9,4	0,052
	Kontrol n=10	4,80 ± 0,38	5,00	2,8 – 6,3	
II (10-20 yaş)	T. major n=16	3,90 ± 0,41	4,20	1,3 – 6,4	0,182
	Kontrol n=10	4,79 ± 0,49	4,95	2,6 – 7,5	
III (>20 yaş)	T. major n=12	3,55 ± 0,37	3,30	2 – 6	0,021
	Kontrol n=10	5,04 ± 0,49	5,00	3 – 8	

Mann Whitney U testi

Mİ: *mitotik indeks;* ***SH****: standart hata*



Şekil 4.3. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre mitotik indeks medyan değerlerinin dağılım grafiği

DFO kullanan hasta grubunda Mİ medyan değeri 3,20 Defarosiroks kullanan hastalarda 4,00, DFO+DFP kombine tedavi alan olgularda 3,80 ve kontrol grubunda

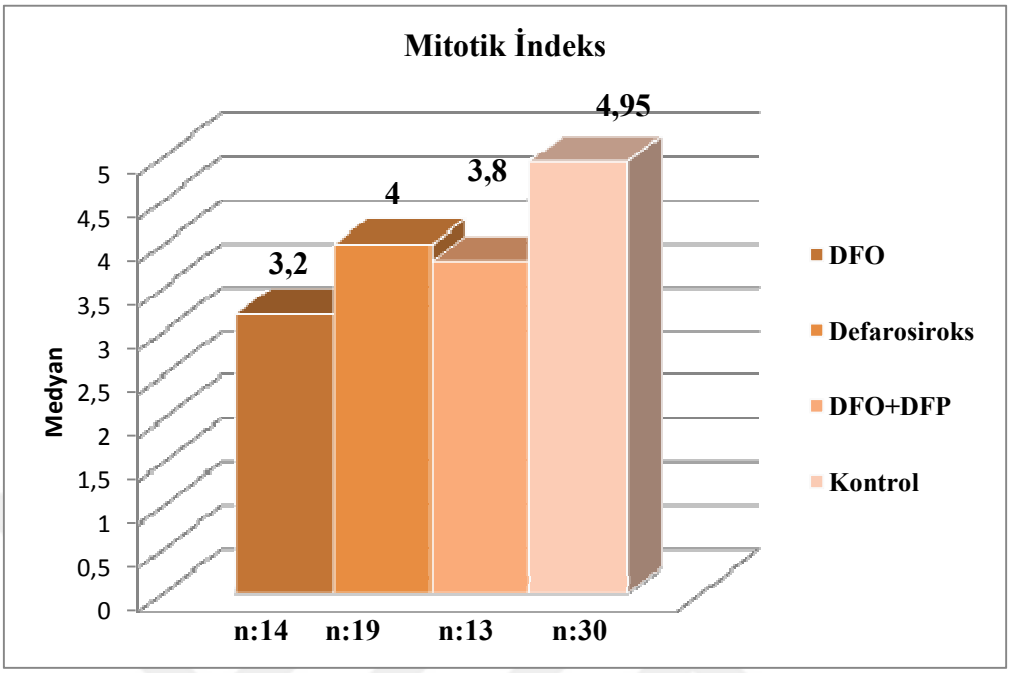
4,95 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.6, Şekil 4.4). DFO kullanan olgularda mitotik indeks düzeyi, Defarosiroks kullananlara göre düşük bulunmasına rağmen istatistiksel olarak anlamsızdır (p: 0,356). DFO tedavisi alan grup ile DFO+DFP kombine ilaç tedavisi alan iki grup arasında anlamlı fark gözlenmemiştir (p: 0,222). DFO tedavisi alan grubun mitotik indeksi kontrol grubundan anlamlı düzeyde düşüktür (p: 0,004). Defarosiroks kullanan olguların mitotik indeksleri medyanları ile DFO+DFP kombine tedavi kullanan grubun mitotik indeksi arasında fark gözlenmemiştir (p: 0,685). Defarosiroks kullanan grubun mitotik indeks değerleri kontrol grubunun Mİ değerlerinden anlamlı oranda düşüktür (p: 0,037). DFO+DFP kombine tedavi alan grup ile kontrol grubun mitotik indeksleri açısından anlamlı fark gözlenmemiştir (p: 0,156)

Çizelge 4.6. Hasta ve kontrol gruplarında mitotik indeks (Mİ) frekanslarının demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre karşılaştırılması

Grup	Ferritin	Mİ ± SH	Medyan	Minimum-maksimum	P+
DFO kullanan n=14	1575 ± 822	3,52 ± 0,35	3,20	1,60 – 5,40	
Defarosiroks kullanan n=19	1407 ± 931	3,92 ± 0,29	4,00	1,30 – 6,00	**0,356**[a] **0,222**[b] **0,004**[c]
DFO+DFP kullanan n=13	3075 ± 2420	4,42 ± 0,60	3,80	2,00 – 9,40	**0,685**[d] **0,037**[e]
Kontrol n=30		4,88 ± 0,25	4,95	2,60 – 7,50	**0,156**[f]

+Mann Whitney U testi, Kruskal Wallis testi
***a**: DFO / Defarosiroks**; b:** DFO / DFO+DFP; **c**: DFO / Kontrol;*
***d:** Defarosiroks / DFO+DFP**; e**: Defarosiroks / Kontrol; **f**: DFO+DFP / Kontrol*

***Mİ**: mitotik indeks ;**SH**: standart hata*



Şekil 4.4. Hasta ve kontrol gruplarında mitotik indeks (Mİ) medyan değerlerinin demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre dağılım grafiği

Hasta gruplarında, ferritin düzeyinin ve cinsiyetin mitotik indekse etkileri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde (Çizelge 4.7); her iki faktör için de iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırasıyla p: 0,471 ve 0,189).

Hastaların Mİ değerleri ile yaş (p: 0,889, r: 0.020) ve ferritin değerleri (p: 0,702, r:-0,055) arasında anlamlı bir ilişki belirlenmemiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.7. Hasta gruplarında mitotik indeks (Mİ) frekanslarının ferritin düzeylerine ve cinsiyete göre karşılaştırılması

Grup	Mİ ± SH	Medyan	Min-maks	P
Ferritin düzeyi<2000ng/ml n=35	3,94±0,27	3,60	1,30 – 9,40	**0,471**
Ferritin düzeyi>2000ng/ml n=15	3,65±0,38	3,00	1,60 – 6,30	
Erkek n: 32	3,70±0,28	3,30	1,30 – 9,40	**0,189**
Kadın n: 18	4,14±0,35	3,85	1,60 – 6,30	

Mann Whitney U testit
***a:** Ferritin düzeyi<2000ng/ml / Ferritin düzeyi>2000ng/ml; **b**: E/K;*
***Mİ**: mitotik indeks **SH:** standart hata*

Çizelge 4.8. Hasta gruplarında mitotik indeks (Mİ) frekansı ile ferritin düzeyleri ve yaş arasındaki ilişki

Mİ	P	R
Yaş	0,889	0,020
Ferritin	0,702	-0,055

Spearman Korelasyon testi
İstatistilsel anlamlılık için p<0.05 kabul edildi.

4.3. Kardeş Kromatit değişimi Testi Sonuçları

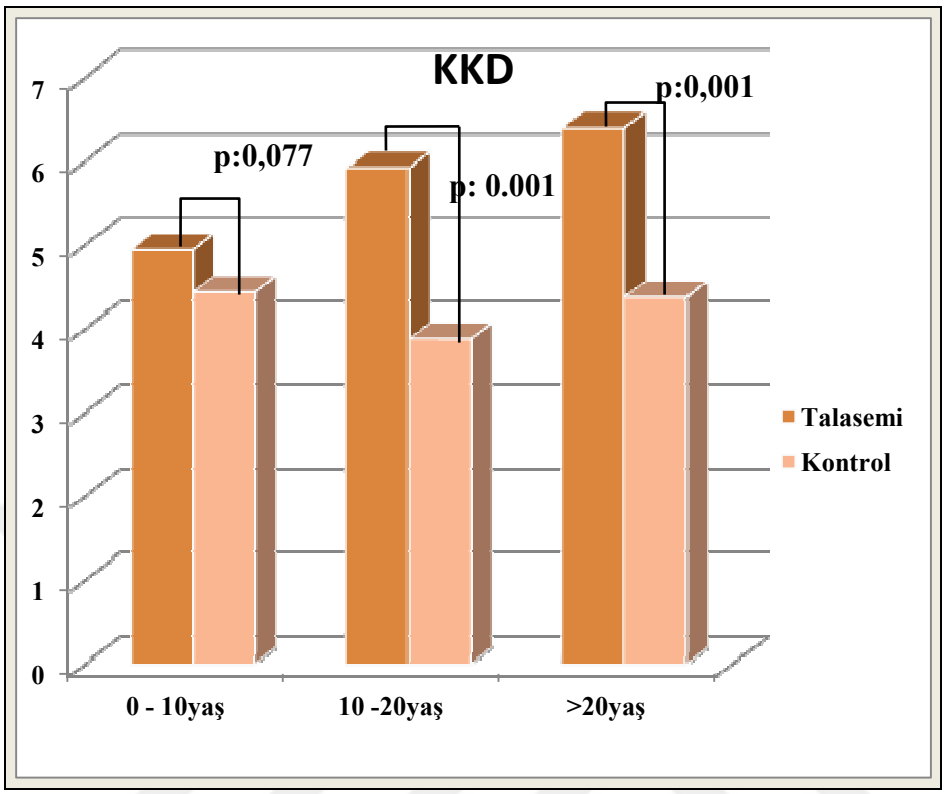
Yaşlarına göre sınıflandırılan hasta ve kontrol gruplarının kardeş kromatit değişimi ortalamaları; medyan, minimum ve maksimum değerleri Çizelge 4.9'de verilmiştir. Grup 1'de, KKD oranları bakımından hasta ve kontrol grubu arasında fark bulunmazken (p: 0.077), Grup 2 ve Grup 3'de hasta grubunun KKD oranları , kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksektir.

Çizelge 4.9. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre kardeş kromatit değişimi (KKD) frekanslarının karşılaştırılması

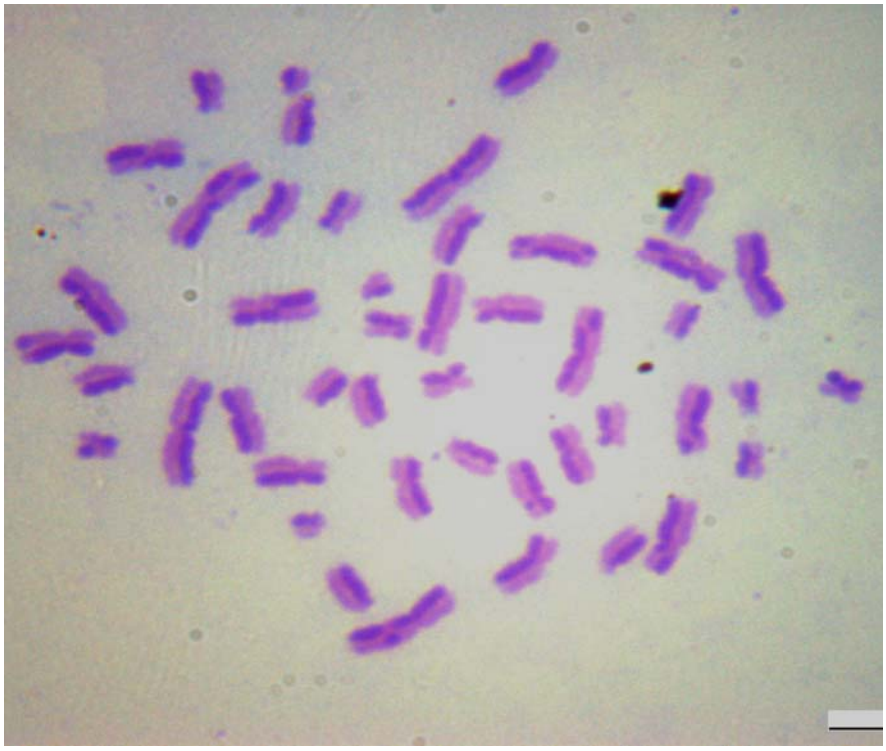
Grup		KKD/Hücre ± SH	Medyan	Minimum-maksimum	P
I (0-10 yaş)	**T. major n=22**	4,86 ± 0,22	4,94	3,08 - 6,84	**0,077**
	Kontrol n=10	4,10 ± 0,32	4,44	2,52 - 5,36	
II (10-20 yaş)	**T. major n=16**	6,09 ± 0,36	5,92	4,00 – 10,00	**0,001**
	Kontrol n=10	4,01 ± 0,19	3,88	3,00 – 5,00	
III (>20 yaş)	**T. major n=12**	6,52 ± 0,49	6,40	4,68 – 9,88	**0,001**
	Kontrol n=10	4,32 ± 0,28	4,38	2,92 – 5,48	

Mann Whitney U testi

***KKD/Hücre**: Hücre başına düşen kardeş kromatit değişimii; **SH**: standart hata*



Şekil 4.5. Hasta ve kontrol gruplarının yaş göre kardeş kromatit değişimi (KKD) frekanslarının medyan değerlerinin dağılım grafiği



Resim 4.2. TM'lü hasta lenfositlerinde gözlenen kardeş kromatit değişimii

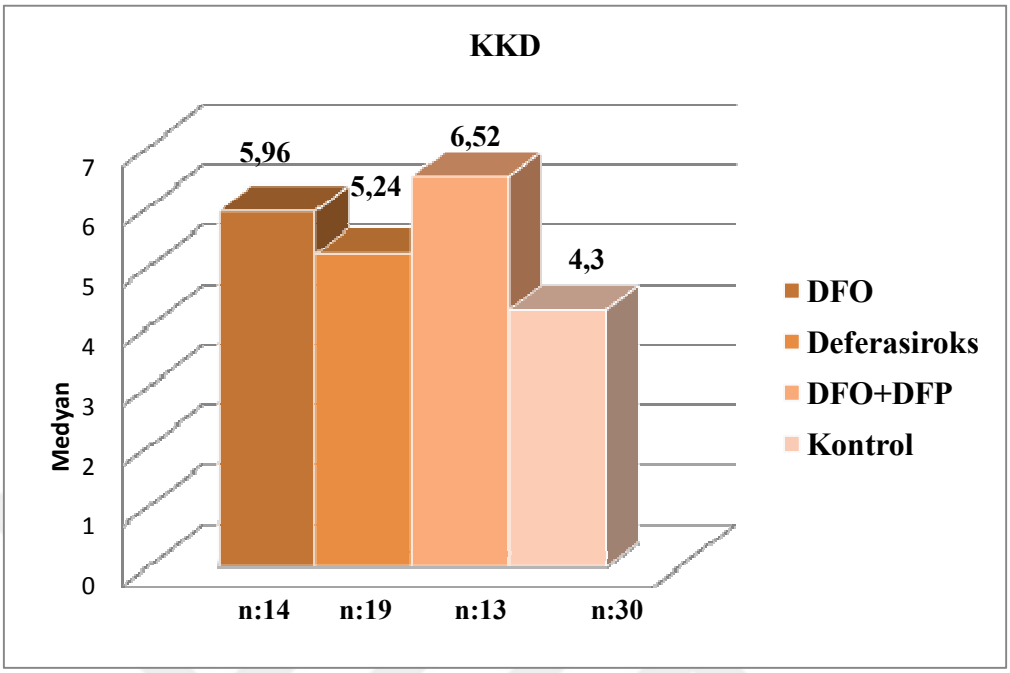
Demir bağlayıcı ilaçlara göre sınıflandırılan 46 olgu ve 30 sağlıklı bireyin KKD ortalamaları; medyan, minimum ve maksimum değerleri Çizelge 4.10 ve Şekil 4.6'de verilmiştir. DFO kullanan 14 olgu, Defarosiroks kullanan 19 olgu ve DFO+DFP kombine tedavi alan 13 olgu ile 30 kontrol değerlendirmeye alınmıştır. DFO tedavisi alan grubun KKD oranı, Defarosiroks tedavisi alanlara göre anlamlı olarak yüksektir (p: 0,022). DFO kullanan hastalar ile DFO+DFP birlikte kullanan grubun KKD oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (p: 0,944). Defarosiroks kullanan grubun KKD oranı, DFO+DFP birlikte kullanan gruba göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (p: 0,030). DFO, Defarosiroks ve DFO+DFP kombine tedavi alan her bir grubun KKD oranlarının kontrole göre anlamlı oranda yüksek olduğu gözlenmiştir (p<0,001).

Çizelge 4.10. Hasta ve kontrol gruplarında kardeş kromatit değişimi (KKD) frekanslarının demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre karşılaştırılması

Grup	Ferritin	KKD/Hücre ± SH	Medyan	Min- maks	P
DFO kullanan n=14	1575±822	6,31 ± 0,50	5,96	3,84 – 10,24	**0,022**[a]
Defarosiroks kullanan n=19	1407±931	5,06 ± 0,22	5,24	3,08 – 6,60	**0,944** [b] **0,001** [c]
DFO+DFP kullanan n=13	3075±2420	6,19 ± 0,40	6,52	4,68 – 9,56	**0,030** [d] **0,001** [e]
Kontrol n=30		4,14 ± 0,15	4,30	2,52 – 5,48	**0,001** [f]

Mann Whitney U testi, Kruskal Wallis testi
***a**: DFO / Defarosiroks; **b**: DFO / DFO+DFP; **c**: DF/ Kontrol;**d**:Defarosiroks/ DFO+DFP*
***e**: Defarosiroks / Kontrol; **f**: DFO+DFP / Kontrol*

***KKD/Hücre:** Hücre başına düşen kardeş kromatit değişimii; **SH**: standart hata*



Şekil 4.6. Hasta ve kontrol gruplarında kardeş kromatit değişimi (KKD) medyan değerlerinin demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre dağılım grafiği

Ferritin düzeylerine göre sınıflandırılan grupların KKD oranları karşılaştırıldığında, ferritin değeri 2000 ng/ml'den büyük olan talasemili grubun KKD oranı istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksektir (p: 0,038,). KKD' leri değerlendirilen toplam 50 talasemili olgunun 32' si erkek ve 18'i kadındır. İki grup cinsiyet dağılımı açısından karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark gözlenmemiştir (p: 0,379, Çizelge 4. 11).

Çizelge 4.11. Hasta gruplarında kardeş kromatit değişimii (KKD) frekanslarının ferritin düzeylerine ve cinsiyete göre karşılaştırılması

Grup	KKD/Hücre ± SH	Medyan	Minimum-maksimum	P
Ferritin düzeyi<2000ng/ml n=35	5,46 ± 0,28	5,24	3,08 – 10,24	**0,038[a]**
Ferritin düzeyi>2000ng/ml n=15	6,09 ± 0,27	6,52	4,24 – 7,48	
Erkek n: 32	5,48 ± 0,23	5,26	3,08 – 9,56	**0,379 [b]**
Kadın n: 18	5,96 ± 0,43	5,72	3,36 – 10,24	

Mann Whitney U testit
***a:** Ferritin düzeyi<2000ng/ml / Ferritin düzeyi>2000ng/ml; **b:** E/K*
***KKD/Hücre**: Hücre başına düşen kardeş kromatit değişimii; **SH**: standart hata*

Hasta grubunda KKD düzeyleri, yaş ve ferritin düzeyleri ile karşılaştırılmış; KKD oranı ile yaş arasında pozitif korelasyon ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur (p<0,001, r: 0,545). KKD ile ferritin arasında ise pozitif yönde ilişki görülmesine rağmen, bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p: 0,118, r: 0,220; Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Hasta gruplarında kardeş kromatit değişimi (KKD) frekansı ile ferritin düzeyleri ve yaş arasındaki ilişki

Grup	P	R
Yaş	0,001	0,545
Ferritin	0,118	0,224

Spearman korelasyon testi
İstatistilsel anlamlılık için p<0.05 kabul edildi.

Yaşlarına göre sınıflandırılan hasta ve kontrol gruplarında Rİ değerleri karşılaştırıldığında, anlamlı fark elde edilmemiştir (sırasıyla p: 0,922, 0,458 ve 0,905) (Çizelge 4.13). Demir bağlayıcı ilaç kullanan hasta gruplarının Rİ düzeyleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Çizelge 4. 14).

Çizelge 4.13. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre M1, M2, M3 ve Rİ frekanslarının karşılaştırılması

Grup		M1	M2	M3	RI ± SH	P
I (0-10 yaş)	**T. major n=22**	296	893	1011	2,32 ± 0,08	**0,922**
	Kontrol n=10	104	255	612	2,53 ± 0,08	
II (10-20 yaş)	**T. major n=16**	267	552	781	2,32 ± 0,09	**0,458**
	Kontrol n=10	143	266	591	2,45 ± 0,09	
III (>20 yaş)	**T. major n=12**	262	476	446	2,15 ± 0,09	**0,905**
	Kontrol n=10	166	344	496	2,32 ± 0,09	

z testi

***M1**:Birinci mitoz geçiren hücre metafazı;**M2**: İkinci mitoz geçiren hücre metafazı;*
***M3**: Üçüncü mitoz geçiren hücre metafazı; **Rİ:** Replikasyon indeksi; **SH**: standart hata*

Çizelge 4.14. Hasta ve kontrol gruplarında demir bağlayıcı ilaç kullanımına ve ferritin düzeylerine göre M1, M2, M3 ve Rİ frekanslarının karşılaştırılması

Grup	M1	M2	M3	Rİ ± SH	P
DFO kullanan n=14	215	432	553	2,26± 0,08	**0,936[a]** **0,923[b]** **0,954[c]** **0,936[d]** **0,967[e]** **0,955[f]**
Defarosiroks kullanan n=19	249	719	935	2,35±0,07	
DFO+DFP kullanan n=13	252	479	569	2,24±0,07	
Kontrol n=30	416	872	1712	2,44±0,06	
Ferritin düzeyi<2000ng/ml n=35	543	1417	1540	2,44±0,06	**0,966[g]**
Ferritin düzeyi>2000ng/ml n=14	257	463	664	2,29±0,06	

Mann Whitney U testi, Kruskal Wallis testi
***a**: DFO/Defarosiroks; **b**: DFO / DFO+DFP; **c**: DFO /Kontrol; **d**:Defarosiroks/DFO+DFP **e:** Defarosiroks / Kontrol; **f:** DFO+DFP / Kontrol; **g**: Ferritin düzeyi<2000ng/ml / Ferritin düzeyi>2000ng/ml;*

***M1**:Birinci mitoz geçiren hücre metafazı; **M2**: İkinci mitoz geçiren hücre metafazı; **M3**: Üçüncü mitoz geçiren hücre metafazı; **Rİ**: Replikasyon indeksi; **SH**: standart hata*

4.4. Mikronükleus Sonuçları

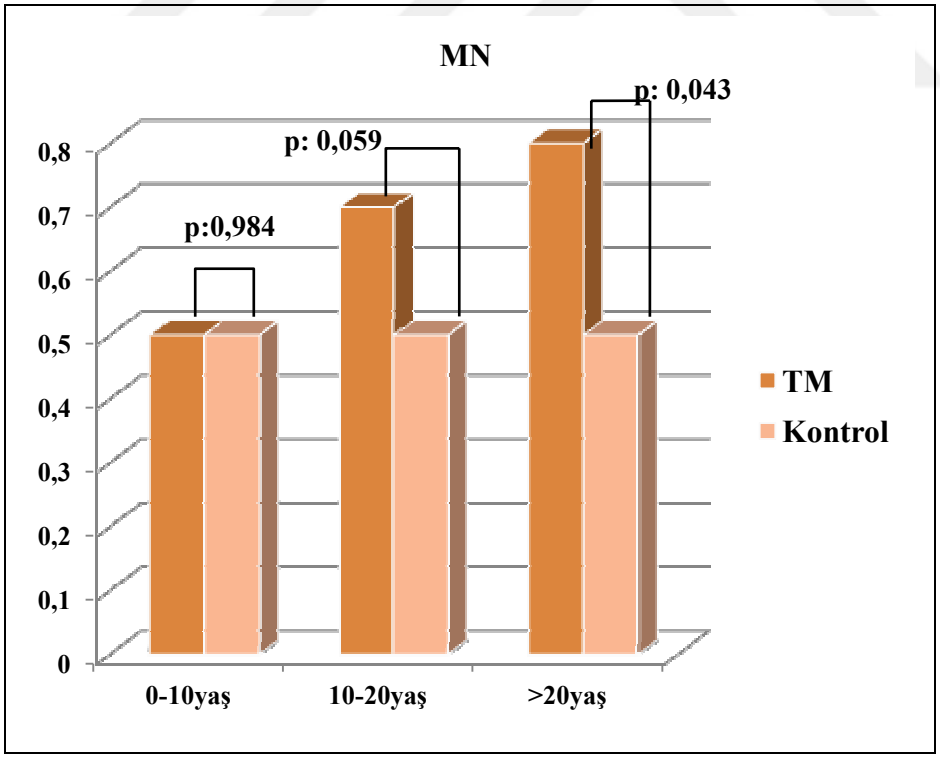
Hasta ve kontrol gruplarının MN değerlerinin ortalamaları, medyan, minimum ve maksimum değerleri dağılımı Çizelge 4.15'de verilmiştir. Grup 1'deki MN değerleri incelendiğinde; hasta ile kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunmamıştır (p: 0,984). Grup 2'de MN frekansı kontrole göre daha yüksek bulunmasına rağmen, bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir (p: 0,059). Grup 3'de MN frekansı kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (p: 0,043) (Resim 4. 3) (Şekil 4. 7).

Çizelge 4.15. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre mikronükleus (MN) frekanslarının karşılaştırılması

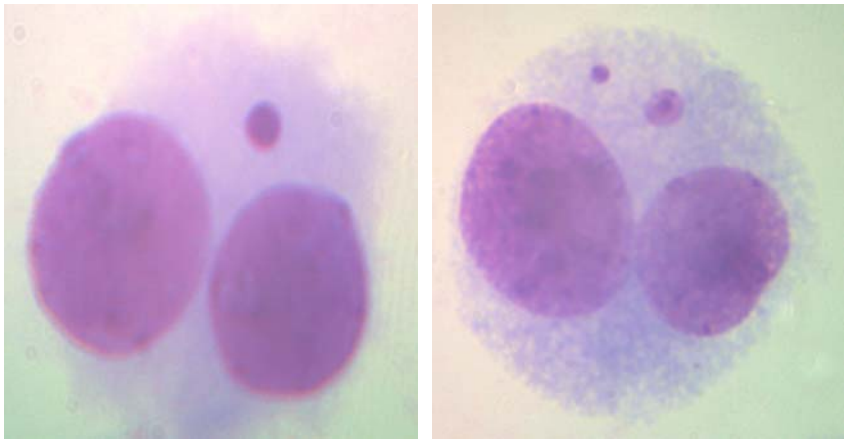
Grup		MN±SH (%)	Medyan	Minimum-maksimum	P
I (0-10 yaş)	**T. major n=22**	0,58 ± 0,07	0,50	0,10 – 1,40	**0,984**
	Kontrol n=10	0,56 -± 0,08	0,50	0,2 0– 1,00	
II (10-20 yaş)	**T. major n=17**	1,02 ± 0,21	0,70	0,20 – 3,20	**0,059**
	Kontrol n=10	0,53 ± 0,05	0,50	0,30 – 0,80	
III (>20 yaş)	**T. major n=12**	1,23 ± 0,27	0,80	0,40 – 3,40	**0,043**
	Kontrol n=10	0,56 ± 0,09	0,50	0,20 – 1,10	

Mann Whitney U testi

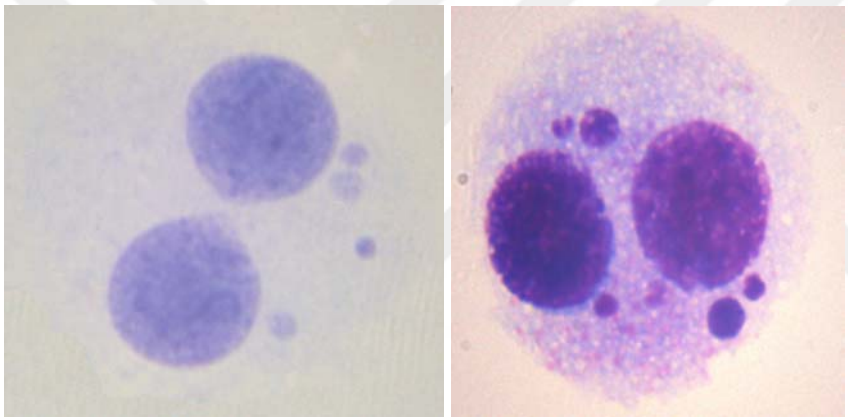
***MN**: Mikronükleus; **SH:** Standart hata*



Şekil 4.7. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre mikronükleus medyan değerlerinin dağılım grafiği



a b



c d

Resim 4.3.İnsan lenfositlerindeki mikronükleüslu binükleat hücreler

a) Bir mikronükleuslu binükleat hücre
b) İki mikronükleuslu binükleat hücre
c) Dört mikronükleuslu binükleat hücre
d) Beş mikronükleuslu binükleat hücre

Demir bağlayıcı ilaç kullanan hastaların MN frekansları Çizelge 4.16'da gösterilmiştir. DFO kullanan hastaların MN değeri, Defarosiroks kullanan gruptan düşük olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamsızdır (p: 0,297). DFO ile DFO+DFP tedavisi alan iki grup arasında MN değerleri bakımından anlamlı fark vardır ($p<0,005$); kombine ilaç kullanan grubun MN değeri daha yüksek bulunmuştur. DFO kullanan hastalar ile kontrolün MN değerleri arasında fark gözlenmemiştir (p: 0,935). MN değeri, Defarosiroks kullanan grupta DFO+DFP kullanan gruba göre düşük iken (p: 0,040), kontrol ile aralarında anlamlı bir fark

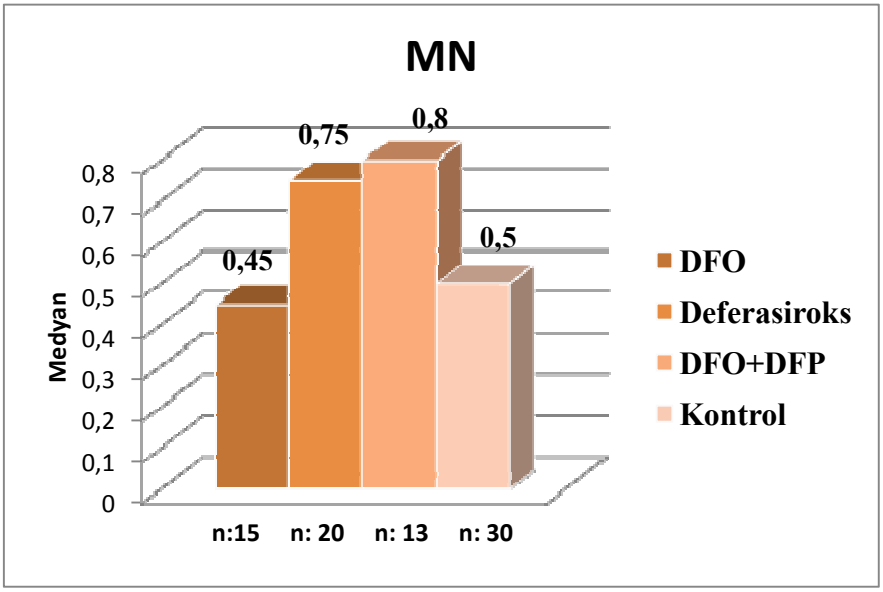
gözlenmemiştir (p: 0,176). DFO+DFP kombine tedavisi alan gruptaki MN değeri kontrole göre yüksek bulunmuştur (p<0,001) (Şekil 4.18).

Çizelge 4.16. Hasta ve kontrol gruplarında mikronükleus (MN) frekanslarının demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre karşılaştırılması

Grup	Ferritin	MN ± SH	Medyan	Minimum-maksimum	P
DFO kullanan n=15	**1562±861**	0,86± 0,26	0,50	0,1 – 3,4	**0,297[a]**
Defarosiroks kullanan n=20	**1344±558**	0,71 ± 0,09	0,75	0,2 – 1,8	**0,005 [b]** **0,935[c]**
DFO+DFP kullanan n=13	**3273±2322**	1,24 ± 0,23	0,80	0,6 – 3,2	**0,040[d]** **0,176 [e]**
Kontrol n=30		0,55 ± 0,04	0,50	0,2 – 1,1	**0,001 [f]**

Mann Whitney U testi, Kruskal Wallis testi
***a**: DFO / Defarosiroks; **b**: DFO / DFO+DFP; **c**: DFO / Kontrol **d**: Defarosiroks / DFO+DFP; **e**: Defarosiroks / Kontrol; **f**: DFO+DFP / Kontrol;*

***MN**: Mikronükleus **SH**: Standart hata*



Şekil 4.8. Hasta ve kontrol gruplarında MN medyan değerlerinin demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre dağılım grafiği

Hem ferritin hem de cinsiyet açısından değerlendirilen MN frekansında anlamlı fark gözlenmemiştir (sırasıyla p: 0,421, 0,593) (Çizelge 4. 17).

Çizelge 4.17. Hasta gruplarında mikronükleus (MN) frekanslarının ferritin düzeylerine ve cinsiyete göre karşılaştırılması

Grup	MN ± SH	Medyan	Minimum-maksimum	P
Ferritin düzeyi<2000ng/ml n=35	0,81 ± 0,11	0,70	0,20 – 3,40	**0,421**[a]
Ferritin düzeyi>2000ng/ml n=16	1,08 ± 0,23	0,75	0,10 – 3,20	
Erkek n: 33	0,86± 0,13	0,70	0,10 – 3,20	**0,593** [b]
Kadın n: 18	0,96 ± 0,19	0,70	0,20 – 3,40	

Mann Whitney U testi
***a**: Ferritin düzeyi<2000ng/ml / Ferritin düzeyi>2000ng/ml; **b**: E/K*

***MN**: Mikronükleus;**SH**: Standart hata*

Hastalardaki MN frekansı ile yaş arasında pozitif korelasyon ve istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur (p:0,002, r: 0,415). Ferritin düzeyleri ile MN frekansı arasında pozitif korelasyon olmasına rağmen istatistiksel anlamlı fark gözlenmemiştir. (p: 0,529, r: 090) (Çizelge 4. 18).

Çizelge 4.18. Hasta gruplarında mikronükleus (MN) frekansı ile ferritin düzeyleri ve yaş arasındaki ilişki

MN	P	R
Yaş	0,002	0,415
Ferritin	0,529	0,090

Spearman Korelasyon testi
İstatistilsel anlamlılık için p<0.05 kabul edildi.

Hasta ve kontrol gruplarının nükleer bölünme indeksi (NBİ) değerleri de hesaplanmıştır. Hasta grubunda NBİ değeri kontrole göre düşük bulunmasına rağmen bu farklılık anlamlılığa yansımamıştır (Çizelge 4. 19).

Çizelge 4.19. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre N1, N2, N3 ve NBİ frekanslarının karşılaştırılması

Grup		N1	N2	N3	N4	BN'lerdeki *mikronükleus sayısı* 1	2	3	4	NBI ± SH	P
I (0-10 yaş)	**T. major n=22**	5388	4107	876	629	108	4	1	3	1,65±0,12	**0,448**
	Kontrol n=10	2117	1874	550	459	56	-	1	-	1,78±0,19	
II (10-20 yaş)	**T. major n=17**	4095	3208	709	488	144	9	2	2	1,66±0,14	**0,451**
	Kontrol n=10	2098	1773	592	537	50	-	-	1	1,81±0,19	
III (>20 yaş)	**T. major n=12**	3288	2081	452	229	109	15	2	1	1,80±0,17	**0,455**
	Kontrol n=10	1990	2116	515	537	54	1	-	-	1,78±0,19	

z testi

***N1**: 1 nukleuslu hücre sayısı; **N2**: 2 nukleuslu hücre sayısı; **N3**: 3 nukleuslu hücre sayısı*
***N4**: 4 nukleuslu hücre sayısı; **BN**: Sitokinez engelenmiş iki çekirdekli hücre*
***NBI**: Nükleer bölünme indeksi; **SH**: Standart hata*

Kullanılan ilaçlara ve ferritin düzeylerine göre yapılan değerlendirmede NBİ açısından bir fark görülmemiştir (Çizelge 4. 20).

Çizelge 4.20. Hasta ve kontrol gruplarında demir bağlayıcı ilaç kullanımına ve ferritin düzeylerine göre N1, N2, N3 ve NBİ frekanslarının karşılaştırılması

Grup	N1	N2	N3	N4	BN'lerdeki *mikronükleus sayısı* 1	2	3	4	NBI ± SH	P
DFO kullanan n=15	3808	2880	517	295	112	9	2	-	1,59±0,15	**0,442[a]** **0,448[b]** **0,438[c]** **0,444[d]** **0,433[e]** **0,440[f]**
Defarosiroks kullanan n=20	4730	3725	915	630	123	2	1	3	1,68±0,13	
DFO+DFP kullanan n=13	3358	2216	541	385	111	16	2	3	1,62±0,16	
Kontrol n=30	6205	5763	1657	1375	160	1	1	1	1,79±0,11	
Ferritin düzeyi <2000 ng/ml n=35	8737	6525	1365	890	228	17	3	3	1,63±0,10	**0,433**
Ferritin düzeyi >2000ng/ml n=16	3985	2871	677	467	133	11	3	2	1,64±0,14	

z testi
***a**: DFO / Defarosirok; **b**: DFO / DFO+DFP; **c**: DFO / Kontrol; **d**: Defarosiroks / DFO+DFP; **e**: Defarosiroks / Kontrol;**f**: DFO+DFP / Kontrol*

***N1**: 1 nukleuslu hücre sayısı; **N2**: 2 nukleuslu hücre sayısı;**N3**: 3 nukleuslu hücre sayısı;**N4**: 4 nukleuslu hücre sayısı; **BN**: Sitokinezi engellenmiş iki çekirdekli hücre;**NBI**: Nükleer bölünme indeksi; **SH**: Standart hata*

4.5. Comet Sonuçları (Primer DNA Hasarı)

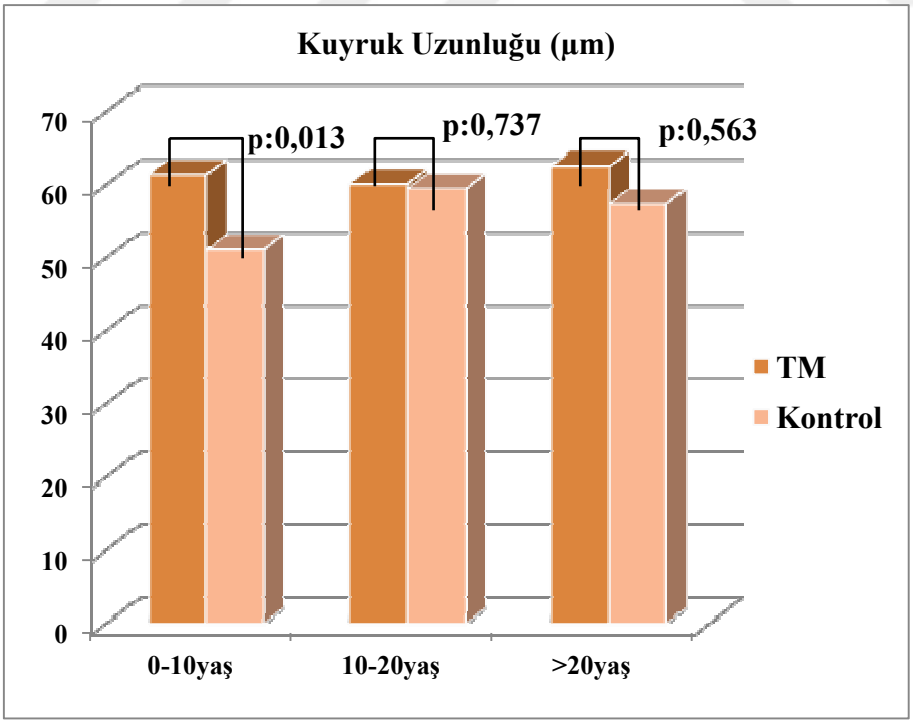
Hasta ve kontrol gruplarının yaşlara göre DNA hasarı Çizelge 4. 21'de verilmiş ve Resim 4.4 de gösterilmiştir. Grup 1 hastalarda comet kuyruk uzunluğu değeri kontrolden anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p: 0,013). Grup 2 ve Grup 3 hastaların, comet kuyruk uzunluğu değerleri aynı yaş grubu kontrol ile karşılaştırıldığında yüksek olduğu gözlenmiş, ancak anlamlı bulunmamıştır (sırasıyla p: 0,737 ve 0,563) (Şekil 4.9).

Çizelge 4.21. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre comet kuyruk uzunluğunun (KU) karşılaştırılması

Grup		Kuyruk uzunluğu(KU) (µm)			
		KU±SH	Medyan	Min – mak.	P
I (0-10 yaş)	T. major n=22	61,77±1,79	61,41	48,91-78,77	0,013
	Kontrol n=10	53,92±2,65	51,17	45,74–73,53	
II (10-20 yaş)	T. major n=17	60,95±2,12	60,12	48,87- 78,63	0,737
	Kontrol n=10	62,92±2,91	59,46	46,79–76,40	
III (>20 yaş)	T. major n=12	63,27±3,,09	62,56	47,5 - 78,70	0,563
	Kontrol n=10	59,83±2,65	57,30	50,6 – 77,20	

Mann Whitney U testi

***KU**: Comet kuyruk uzunluğu; **SH**: standart hata*



Şekil 4.9. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre comet kuyruk uzunluğu medyan değerlerinin dağılım grafiği

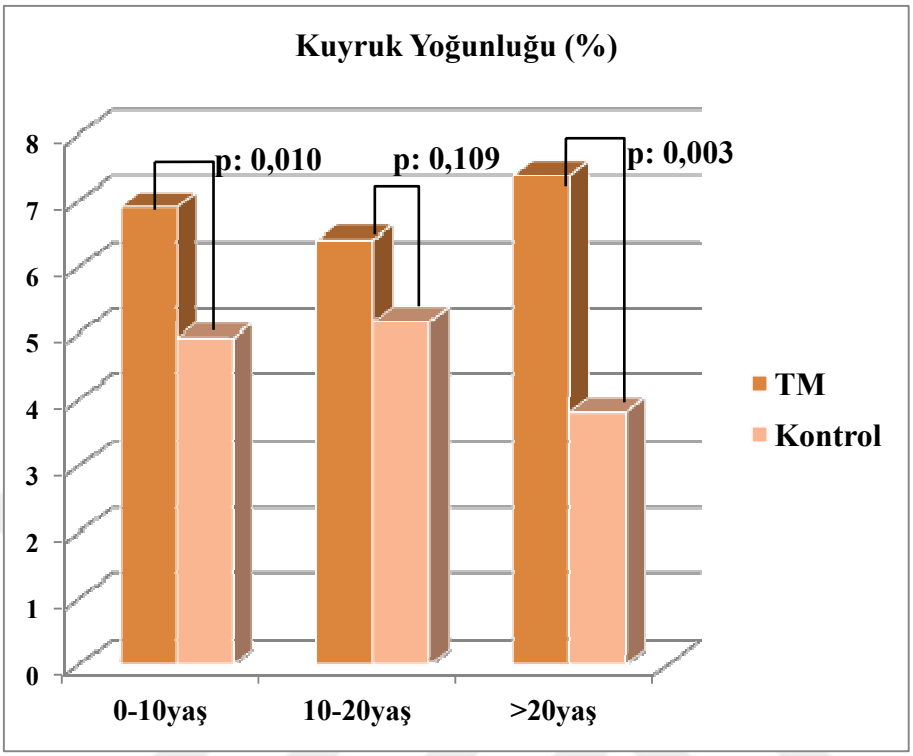
Grup1 hastalarda comet kuyruk yoğunluğu kontrolden anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p: 0,010). Grup 2 hastalarda comet kuyruk yoğunluğu kontrole göre yüksek olmasına karşın istatistiksel fark gözlenmemiştir (p:0,109). Grup 3 hastalarda kuyruk yoğunluğu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur (p: 0,003) (Çizelge 4. 22, Şekil 4.10).

Çizelge 4.22. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre comet kuyruk yoğunluğu (KY) karşılaştırılması

Grup		**Kuyruk yoğunluğu(KY) (%)**			
		KY±SH	**Medyan**	**Min – mak.**	**P**
I (0-10 yaş)	**T. major n=21**	7,96±0,66	6,91	4 – 14	**0,010**
	Kontrol n=10	4,41±0,79	4,93	1 – 80	
II (10-20 yaş)	**T. major n=16**	7,22±0,78	6,41	3 – 12	**0,109**
	Kontrol n=10	4,95±0,62	5,17	2 – 80	
III (>20 yaş)	**T. major n=13**	8,12±1,20	7,37	3 -20	**0,003**
	Kontrol n=10	3,92±0,37	3,81	3 – 70	

+Mann Whitney U testi

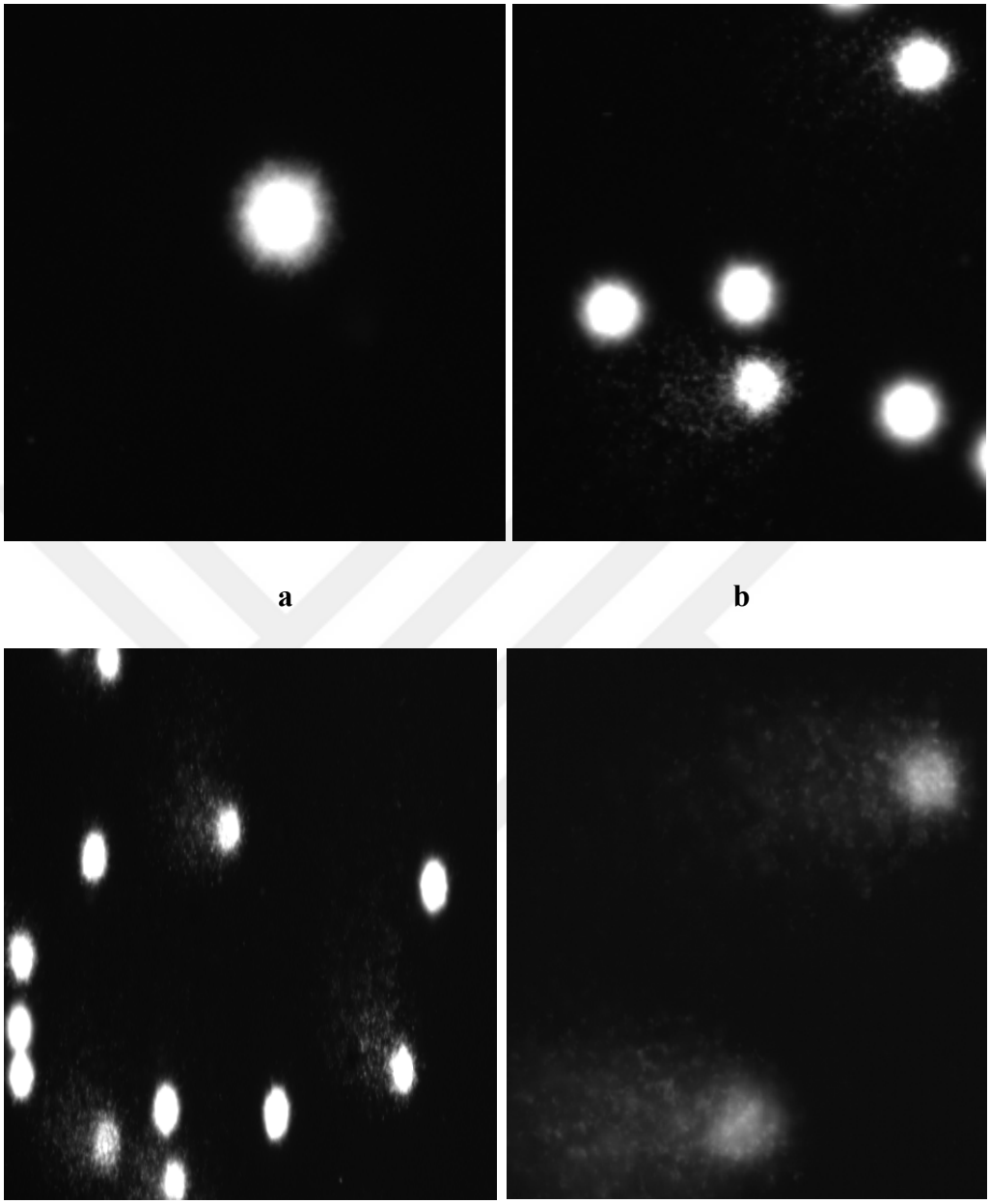
***KY**: Comet kuyruk yoğunluğu; **SH**: standart hata*



Şekil 4.10. Hasta ve kontrol gruplarının yaşlarına göre comet kuyruk yoğunluğu medyan değerlerinin dağılım grafiği

Talasemili hastalardaki DNA hasarının, demir atıcı ilaçlara göre değerlendirilmesi Çizelge 4. 23-24'de verilmiştir. Primer DNA hasarı, 15 DFO, 19 Defarosiroks, 13 DFO+DFP kombine tedavi kullanan olgular ile 30 kontrolde çalışılmıştır.

DFO kullananlarda comet kuyruk uzunluğu değerlendirildiğinde; Defarosiroks, DFO+DFP kombine tedavi kullanan gruplar ve kontrole göre anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırasıyla p: 0,427, 0,511 ve 0,114). Defarosiroks tedavisi alan grup ile DFO-DFP kombine tedavi alan grup ve kontrol grubu karşılaştırılmasında istatistiksel anlamlı fark gözlenmemiştir (sırasıyla p: 0.143 ve 0,438). DFO+DFP ikili tedavi alan grubun kuyruk uzunluğu, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksektir (p: 0,023) (Şekil 4. 11).



a **b**

c d

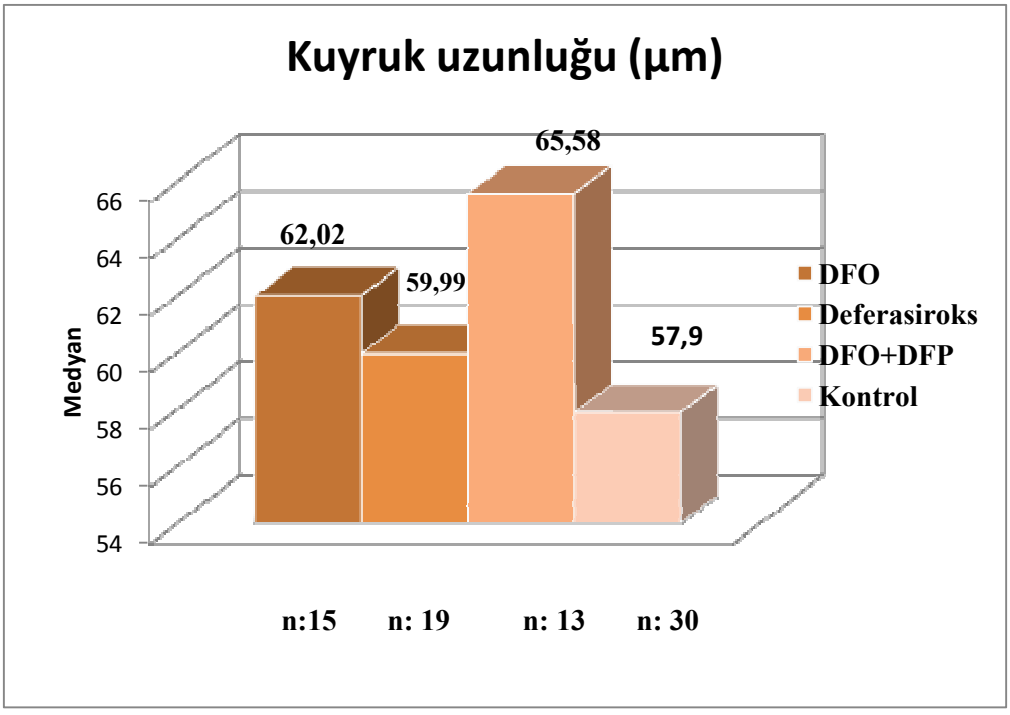
Resim 4.4. DNA hasarlarının comet testi ile görünümü
a. Hasarsız DNA b Az hasarlı DNA
c. Orta hasarlı DNA d. Çok hasarlı

Çizelge 4.23. Hasta ve kontrol gruplarında comet kuyruk uzunluğunun (KU) demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre karşılaştırılması

Grup	Ferritin	Kuyruk uzunluğu (KU) (µm)			
		KU±SH	Medyan	Min – mak.	P
DFO kullanan n=15	1562 ± 861	62,46 ± 1,79	62,02	51,79 - 73,83	**0,427[a]**
Defarosiroks kullanan n=19	1344 ± 558	60,31 ± 2,05	59,99	48,87-78,77	**0,511 [b]** **0,114 [c]**
DFO-DFP kullanan n=13	3075 ± 2419	66,10 ± 2,99	65,58	47,51 - 78,69	**0,143 [d]**
Kontrol n=30	-	58,89 ± 1,68	57,90	45,74 - 77,19	**0,438 [e]** **0,023 [f]**

Mann Whitney U testi, Kruskal Wallis testi
***a**: DFO / Defarosiroks; **b**: DFO / DFO+DFP; **c**: DFO / Kontrol;*
***d**: Defarosiroks/ DFO+DFP; **e**: Defarosiroks / Kontrol; **f**: DFO+DFP / Kontrol*

***KU**: Comet kuyruk uzunluğu; **KY**: Comet kuyruk yoğunluğu; **SH**: standart hata*



Şekil 4.11. Hasta ve kontrol gruplarında comet kuyruk uzunluğu medyan değerlerinin demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre dağılım grafiği

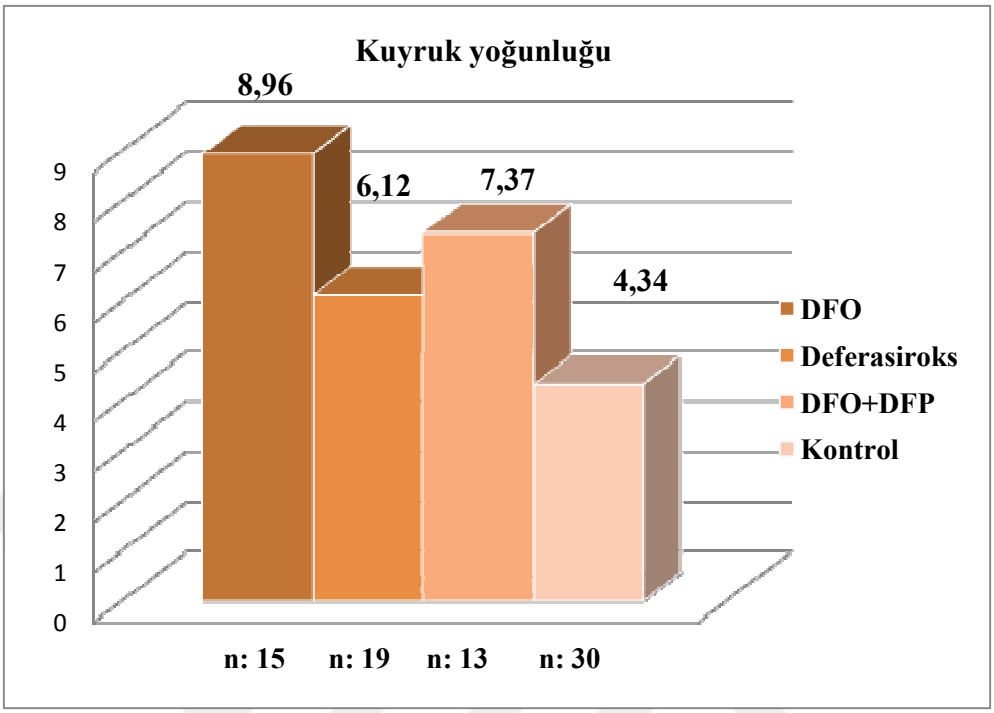
Comet kuyruk yoğunluğu açısından değerlendirildiğinde, DFO kullanan grup ile Defarosiroks ve DFO+DFP kombine tedavi alan gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır (sırasıyla p: 0,421, 0,849). DFO kullanan hastaların kuyruk yoğunluğu kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur (p<0,001). Defarosiroks kullanan ve DFO+DFP ikili tedavi alan hastalar arasında comet kuyruk yoğunluğu değeri karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark bulunmamıştır (p: 0.323). Defarosiroks kullanan grupta da, DFO+DFP kullanan grupta da kuyruk yoğunluğu, kontrol grubundan yüksek bulunmuştur (p< 0,001,) (Şekil 4. 12).

Çizelge 4.24. Hasta ve kontrol gruplarında comet kuyruk yoğunluğunun (KY) demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre karşılaştırılması

Grup	**Ferritin**	**Kuyruk yoğunluğu (KY) (%)**			
		KY±SH	Medyan	Min – mak.	P
DFO kullanan n=15	1562 ± 861	8,24 ± 0,90	8,96	3 - 14	**0,421** [a]
Defarosiroks kullanan n=19	1344 ± 558	7,11 ± 0,71	6,12	3 - 12	**0,849** [b] **0,001** [c]
DFO+DFP kullanan n=13	3075 ± 2419	8,70 ± 1,20	7,37	3 - 20	**0,323** [d]
Kontrol n=30	**-**	4,40 ± 0,35	4,34	1- 80	**0,001** [e] **0,001** [f]

Mann Whitney U testi, Kruskal Wallis testi
***a**: DFO / Defarosiroks; **b**: DFO / DFO+DFP; **c**: DFO / Kontrol;**d**: Defarosiroks/ DFO+DFP; **e**: Defarosiroks / Kontrol; **f**: DFO+DFP / Kontrol*

***KU**: Comet kuyruk uzunluğu; **KY**: Comet kuyruk yoğunluğu; **SH**: standart hata;*



Şekil 4.12. Hasta ve kontrol gruplarında comet kuyruk yoğunluğu medyan değerlerinin demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre dağılım grafiği

Ferritin değerine ve cinsiyete göre gruplandırılan hastalardaki kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu değerleri Çizelge 4. 25' de gösterilmiştir. Ferritin düzeyi 2000 ng/ml üzerindeki grupta kuyruk uzunluğu (µm) artmış olmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamsızdır (p: 0,072). Kuyruk yoğunluğu açısından her iki ferritin grubu arasında önemli bir fark gözlenmemiştir (p: 0,733).

Erkeklerde kuyruk uzunluğu, kadınlara göre yüksek olmasına rağmen, istatistiksel olarak anlamlı değildir (p: 0,061). Ayrıca her iki cinsiyetteki hastaların kuyruk yoğunluğu (%) arasında da fark gözlenmemiştir (p: 0,749).

Çizelge 4.25. Hasta gruplarında comet kuyruk uzunluğu ve yoğunluğunun ferritin düzeylerine ve cinsiyete göre karşılaştırılması

Grup	**Kuyruk uzunluğu (KU) (µm)**				**Kuyruk yoğunluğu (KY) (%)**			
Ferritin (ng/ml)	KU±SH	Medyan	Min – mak.	P	KY±SH	Medyan	Min – mak.	P
<2000ng/ml n=33	60,06±1,47	59,49	47,50-79,90	**0,072**	7,58±0,54	6,91	3-14	**0,733**
>2000ng/ml n=16	65,43±2,39	64,03	52,00-78,70		7,23±0,64	6,97	4-12	
Erkek n: 33	63,52±1,63	62,56	47,50-79,90	**0,061**	7,42±0,55	6,80	3-14	**0,749**
Kadın n: 16	58,30±1,90	56,94	48,9-78,7		7,56	7,26	4-12	

Mann Whitney U testi
***a**: Ferritin düzeyi<2000ng/ml / Ferritin düzeyi>2000ng/ml **b**: E/K*

***KU**: Comet kuyruk uzunluğu; **KY**: Comet kuyruk yoğunluğu; **SH**: standart hata*

Çizelge 4.26. Hasta gruplarında comet kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu ile ferritin düzeyi ve yaş arasındaki ilişki

Korelasyon	**Kuyruk Uzunluğu (µm)**		**Kuyruk yoğunluğu (%)**	
	P	**R**	**P**	**R**
Yaş	0,957	-0,008	0,679	-0,061
Ferritin	0,332	0,141	0,899	-0,019

Spearman korelasyon testi
İstatistilsel anlamlılık için p<0.01 kabul edildi.

Hasta gruplarının kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu ile yaş arasında negatif yönde zayıf bir ilişki varken, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (sırasıyla p: 0,957 ve 0,679; r: -0,008 ve -0,061). Hastaların kuyruk uzunluğu ile ferritin değeri arasında pozitif yönde, orta düzeyde bir ilişki vardır, ancak anlamlı değildir (p: 0,332; r: 0.141). Kuyruk yoğunluğu ile ferritin arasında negatif yönde zayıf bir ilişki olduğundan, istatistiksel düzeyde anlamlı değildir (p: 0,899; r: -0,019) (Çizelge 4. 26).

Bu çalışmada gerçekleştirilen tüm genotoksisite testleri yaş gruplarına, kullanılan ilaçlara, ferritin ve cinsiyet ilişkisine göre Çizelge 4.27-30'da özetlenerek verilmiştir.

Çizelge 4.27. Hasta gruplarında elde edilen tüm genotoksisite test sonuçlarının yaşlarına göre özet karşılaştırılması

Hasta	Ferritin ng/ml	KA	Mİ	KKD	MN	DNA Hasarı	
						KU	KY
0-10yaş	1379±693	↑	AD	AD	AD	↑	↑↑
0-20yaş	1793±882	↑↑	AD	↑↑	AD	AD	AD
>20yaş	3040±2647	AD	↓	↑↑	↑	AD	↑

AD: *Kontrole göre anlamlı değil*
↑*: Kontrole göre p< 0,05 düzeyinde anlamlı*
↓*: Kontrole göre p< 0,05 düzeyinde anlamlı*
↑↑*: Kontrole göre p< 0,001 düzeyinde anlamlı*

Çizelge 4.28. Hasta gruplarında elde edilen tüm genotoksisite test sonuçlarının demir bağlayıcı ilaç kullanımına göre özet karşılaştırılması

Hasta	Ferritin ng/ml	KA	Mİ	KKD	MN	DNA Hasarı	
						KU	KY
DFO	1575±822	↑↑ K	K ↓↓	↑↑ K ↑ Deferasiroks	AD	AD	↑ K
Deferasiroks	1407±931	↑↑ K	K ↓↓	↑↑ K	AD	AD	↑ K
DFO+DFP	3075±2420	AD	AD	↑↑ K ↑ Deferasiroks	↑↑ K, DFO ↑ Deferasiroks	↑ K	↑ K

K: *Kontrol* ***AD:*** *Kontrole göre anlamlı değil*
↑*: p< 0,05 düzeyinde anlamlı*
↓↓*: p<0,001 düzeyinde anlamlı*
↑↑*: p< 0,001 düzeyinde anlamlı*

Çizelge 4.29. Hasta gruplarında elde edilen tüm genotoksisite test sonuçlarının ferritin düzeylerine ve cinsiyete göre özet karşılaştırılması

Grup	KA	Mİ	KKD	MN	DNA Hasarı	
					KU	KY
Fer/Fe <2000ng/ml/>2000ng/ml	**AD**	**AD**	**↑**	**AD**	**AD**	**AD**
Cinsiyet	**↑ K**	**AD**	**AD**	**AD**	**AD**	**AD**

K: *Kadın* ***AD:*** *Anlamlı değil* ↑*: p< 0,05 düzeyinde anlamlı*

Çizelge 4.30. Hasta gruplarında elde edilen tüm genotoksisite test sonuçlarının ferritin düzeyi ve yaş arasındaki ilişki

Grup	KA	Mİ	KKD	MN	DNA Hasarı	
					KU	KY
Yaş	**AD**	**AD**	**↑**	**↑**	**AD**	**AD**
Ferritin	**AD**	**AD**	**AD**	**AD**	**AD**	**AD**

AD: *Anlamlı değil* ↑*: p< 0,05 düzeyinde anlamlı ilişki*

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Beta talasemi majorlu hastalarda temel tedavi düzenli kan transfüzyonudur. Kan transfüzyonlarıyla hastaların yaşam süreleri artmakla beraber, organlarda demir birikimi olmaktadır. İnsan vücudu transfüzyonlardan kaynaklanan aşırı demir yükünü gidermek için fizyolojik mekanizmaya sahip değildir. Tekrarlanan transfüzyonlarla biriken demir yükünün azaltılması ve aşırı demir birikimine bağlı organ hasarını önlemek amacıyla demir bağlayıcı ilaçlar kullanılmaktadır [Aydınok, 2007].

Demir bağlayıcı ilaçlar her ne kadar biriken demiri uzaklaştırsa da son yıllarda yapılan çalışmalar bu ilaçların genotoksik etkilerinin olabileceğini gösterir yöndedir. Bu amaçla, araştırmamızda 51 talasemik hastada Kromozomal Anormallik (KA), Kardeş Kromatit değişimii (KKD), Mikronükleus (MN) ve Comet testleri ile yapısal kromozom değişimleri ve primer DNA hasarı saptanmaya çalışılmıştır. Elde edilen değişikliklerin, yaş, cinsiyet ve demir yükü ile ilişkisi araştırılmıştır.

Kromozomal anormallikler, DNA'ya zarar veren çeşitli ajanlar tarafından oluşmaktadır. TM'lü hastalarda üç tip komozomal anormallik gözlenmiştir. Bunlar; kromatit kırığı, kromozom kırığı ve fragmenttir. Kromatit kırıkları DNA'da meydana gelen çift zincir kırıkları sonucunda oluşan ve tek bir kromatitte gözlenen kırıklardır. Kromozom kırıkları, kromozomun her iki kolunda gözlenen tamir edilmemiş çift zincir kırıklarıdır [Savage, 1993]. Fragment, kromozom ya da kromatitlerde meydana gelen basit kırıklar sonucu oluşur ve belirgin sentromeri yoktur [Anwar ve ark., 1994; Wolf, 1998]. 0 - 20 yaş arası hastaların kromozomal anormallik frekansı kontrol grubundan yüksek bulunmuştur. 20 yaşından büyük hastaların kromozomal anormallik düzeyleri kontrole göre artmış görünmesine rağmen istatistiksel anlam ifade etmemektedir. Diğer taraftan TM'lü olgularda mitotik indeks sağlıklı bireylere göre düşük bulunmuştur. Ancak Mİ'teki bu düşüş yalnızca 20 yaşından büyük hastalarda istatistiksel anlamlılık göstermektedir. 20 yaş üstü hastalarda hücre bölünmesinin azalması nedeniyle KA oranında artış gözlenememiş olabilir. İnsan embriyo hücreleri yaklaşık 60-80 kez bölünebilmektedir. Yaşam süresi uzun canlıların hücrelerinin bölünme sayısı da oldukça yüksektir [Hayflick, 1991]. Bu

durum göstermektedir ki, hastalarda yaş ile beraber diğer faktörler de mitotik indeksi düşürmektedir.

Còtė ve Papadakou-Lagoyanni, 1979 yılında, kromozomal anormalliği değerlendirmek için, talasemi majorlu 6 olgu, talasemi taşıyıcısı 3 olgu ve sağlıklı 8 bireyin periferal kan lenfosit kültürlerinde kromozomal anormallikleri incelemişlerdir. Talasemi majorlu olgulardaki kromozomal anormalliğin kontrolden yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Kromozomal anormallik olarak gap, kromozom kırığı, kromatit kırığı ve kromatit değişimii gözlenmiştir. Talasemi taşıyıcısı bireylerde ise kromozomal anormallik sayısı kontrol grubuna göre bir miktar artış göstermesine rağmen, istatistiksel olarak anlamlı değildir [Còtė ve Papadakou-Lagoyannı, 1979].

Talasemi majorlü hastalarda kullanılan ilaç ile kromozomal anormallik ilişkisini ortaya koymak amacıyla hastalar kullandıkları ilaca göre de gruplandırılmıştır. DFO ve Deferasiroks kullanan hastalarda sonuçlar birbirine paralellik göstermektedir. Her iki ilaç da mitotik indeksi düşürmüş ve kromozomal anormalliği arttırmıştır. En az kromozomal anormallik DFO_DFP kombinasyonu kullanan hastalarda ortaya çıkmıştır. DFO tek başına kullanıldığında hücre bölünmesini inhibe etmekte ve kromozomal anormallik oranını artırmaktadır. DFP ile kombine olarak kullanıldığında ise bu olumsuz etkilerinin azalmış olduğu gözlenmiştir.

Demir bağlayıcı ilaçlar antiproliferatif özelliğinden dolayı kanser tedavisinde de kullanılmaktadır. Bu ilaçlar kaposi sarkoma hücrelerinin Gı fazını etkileyerek antiproliferatif etki göstermektedir. Apopitotik süreci siklin Dı ve p34 siklin kinaz 4' ün ekspresyonunu azaltarak yapmaktadır. Eğer ortama demir takviyesi yapılırsa apopitozun engellendiği gösterilmiştir [Simonart ve ark., 2000]. DFO, HL-60 hücrelerindeki p38 MAP kinazı aktive ederek hücreleri apoptoza götürür [Kim ve ark., 2002]. DFP, HL-60 ve oral skuamöz hücreli karsinoma hücrelerinde kaspaz 3, 8 ve 9'un aktivitesini artırarak hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. Ortama FeCI3 ilave edildiğinde sitotoksik etki azalmaktadır [Yasumotu ve ark., 2004]. DFO ve DFP'nin sitotoksik ajan oldukları ve çoğalmakta olan hücreleri S fazında

durdukları bilinmektedir. *In vitro* bir çalışmada DFO ve DFP'nin neden olduğu apopitozu değerlendirmek amacıyla lenfosit ve HL-60 hücreleri 24 ve 48 saat süreyle kültüre alınmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra, lenfosit kültüründe; DFO'lu grupta % 57, DFP'li grupta ise % 54 oranında hücre ölümü tespit edilmiştir. HL-60 hücrelerinde de DFO % 50 ve DFP % 40 oranında apopitoza neden olmuştur. Ancak her iki ilacında 48 saatlik inkübasyonda ve periferde dinlenen hücrelerde apopitoza neden olmadığı gösterilmiştir [Hileti ve ark., 1995].

Bir çalışmada hastalar DFO kullanan, kullanmayan ve sağlıklı kontrol grubu olarak ayrılmış ve serum c-myc (proonkogen, nükleer transkripsiyon faktörü) düzeyleri çalışılmıştır. Aynı çalışmada HL-60 hücrelerine DFO eklenerek 24 ve 36 saatlik kültürleri yapılmış ve c-myc düzeylerinin düştüğü ve hücrelerin apopitoza gittiği gösterilmiştir [Kyriakou ve ark., 1998]. *In vitro* bir başka çalışmada da DFO, ribonükleotid redüktazın (RR) inhibisyonuna neden olduğu belirlenmiştir. RR'nin iki alt biriminden biri ferrik klorür içerir. DFO RR'nin demir içeren aktif merkezine bağlanır ve ribonükleotid redüktazın DNA sentezinde ribonükleotidleri deoksiribonükletidlere indirgemesini engellemiş olur. Böylece DNA sentezini engelleyerek programlı hücre ölümüne veya kromozom kırıklarına neden olur. Eğer ortama ferrik klorür konulursa DFO'ya bağlı hasar önlenmiş olur [Nyholm ve ark, 1993]. Bir başka çalışmada; L5178Y fare lenfoma hücrelerinde demir bağlayıcı maddelerin genotoksisitesi karşılaştırılmış ve desferroksaminin oldukça toksik olduğu gösterilmiştir [Whittaker ve ark., 2001].

Marshall ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada demir bağlayıcı ilaçların oluşturacağı kromozomal aberasyonları değerlendirmek amacıyla 10 TM'lü hasta incelenmeye alınmıştır. Bunlardan 5'i DFO tedavisi ve diğer 5'i de DFP tedavisi kullanacak şekilde iki gruba ayrılmıştır. Hastalar 25 gün arayla kan transfüzyonu almışlardır. Bu iki gruptan 3. transfüzyonu takip eden 7. ve 20. günlerdeki kültür lenfositlerinde kromozom aberasyonları incelenmiştir. Birinci gruptaki (DFO kullanan) kromozom aberasyonları, ikinci gruba (DFP kullanan) göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur [Marshall ve ark., 2003].

Demir bağlayıcı ilaçların kromozomal anormalliklere etkisi yönünden bu çalışmada elde edilen sonuçlar, literatür sonuçları ile örtüşmektedir. Ancak Deferasiroks yeni bir ilaç olduğundan, bu ilacın diğer demir bağlayıcı ilaçlarla mukayeseli bir çalışması literatürde yoktur. Bu çalışmada deferasiroks kullanan grupta KA oranı yüksek çıkmıştır. Bu ilacın KA oluşumu üzerine etkisi DFO ile benzer orandadır. Aynı zamanda bu ilacı kullanan grupta mitotik indeks de düşüktür.

Bu araştırmada, ferritin düzeyi 2000 ng/ml üzerindeki grubun kromozomal anormallik frekansı artmış olmasına rağmen bu artış anlamlı değildir. Ayrıca talasemili olgularda ferritin ve yaş ile kromozomal anormallik arasında pozitif yönde ilişki görülmesine rağmen, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Literatüre baktığımızda talasemili olgularda demir birikiminin yaş ile çok da ilişkili olmadığı anlaşılmıştır. Önemli olan düzenli ve uygun şelasyon tedavisinin alınmasıdır [Aydınok, 2010].

Talasemili hastalarda yaşamı tehdit eden faktörlerden en önemlisi sürekli kan transfüzyonları sonucu biriken demir yüküdür. Ferritin, vücut demir miktarını indirekt gösteren bir moleküldür. Ferritin, vücut demirinin az bir kısmını yansıtsa bile demir şelasyonu takibinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ferritin, enfeksiyon ve hepatik hastalıklardan kolayca etkilenmektedir. Karaciğerdeki demir konsantrasyonu, demir yükünü değerlendirme açısından en doğru sonucu vermektedir. Ancak biyopsi yolu ile yapılan bu yöntem, enfeksiyon riski ve hasta açısından travmatik olması nedeniyle tercih edilmemektedir. TM'lü olgularda demir yükü, serbest radikal üretimi ve oksidatif hasardan sorumludur. *In vitro* bir çalışmada, fare germ hücre kültüründe, ferritinin 3, 8, 27, 55, 138–2760 µg/ml konsantrasyonlarının kromozomlarda oluşturacağı hasara bakılmıştır. Araştırma sonucunda ferritinin 15–170 µg/ml konstrasyonlarda klastojenik olduğu ve bunun üzerindeki konstrasyonların sitotoksik olduğu belirlenmiştir. Askorbik asit, EDTA, NTA ve salisilât gibi kimyasal maddelerin ilavesi ile toksik etkinin azalmadığı gözlenmiştir. İlginç olan ise, antioksidan olarak bilinen katalaz ve süperoksit dismutazın bile, yüksek ferritinin oluşturduğu kromozomal aberasyonlarını engelleyici bir etkisinin olmadığıdır. Ancak bu antioksidanların, 33 µg/ml'den düşük

ferritin konsantrasyonlarında koruyucu oldukları gösterilmiştir [Whitting ve ark., 1981]. Talasemili olgularda ve sağlıklı bireylerde yüksek ferritin düzeyinin nötrofillere etkisi, jel –filtrasyon kromotografi yöntemi ile incelenmiş ve ferritini yüksek olan TM'lü olguların nötrofil fonksiyonunun kontrole göre bozulduğu gözlenmiştir. Ancak ortama demir bağlayıcı ilaç konulduğunda bu toksik etkinin kalktığı gözlenmiştir [Cantinieaux ve ark., 1999]. Yüksek enerjili demir iyonlarına maruz kalan insan lenfositlerinde ve TK6 lenfoblast hücrelerinde kromozom ve kromatit kırıklarında artış olduğu gözlenmiştir [Evans ve ark., 2003; George ve ark., 2009]. Lima ve arkadaşları, insan lenfositlerinde FeSO4 7H2O tarafından oluşan kromozomal anormalliği belirlemek için, lenfosit kültürlerine FeSO4 7H2O'ın 1,25; 2,5; 5 µg/ml konsantrasyonlarındaki dozlarını hücre siklusunun Gı, Gı/S, S ve G_2 fazlarına denk gelecek şekilde uygulamışlardır. Bütün dozların hücre döngüsünün her evresinde sitotoksik etki gösterdiği ve mitotik indeksi düşürdüğü gözlenmiş olup, doza bağlı olarak Gı, Gı/S, S evrelerinde kromozom kırığı, kromatit kırığı ve gap sayısında artış olduğu belirlenmiştir. Ayrıca FeSO4 7H2O'ın Gı evresinde tübulin sentezini inhibe ederek poliploidiye neden olduğu görülmüştür. Ancak FeSO4 7H2O'ın bütün dozlarının G_2 fazındaki lenfositlerde gözlenen kromozomal anormallik sayıları negatif kontrole benzer bulunmuştur. Bu sonuçlar ile bu kimyasalın Gı- S aralığında kromozomal anormalliğe neden olduğu gösterilmiştir [Lima ve ark., 2008].

Bu araştırmada cinsiyet dağılımında talasemik kadınlarda kromozomal anormallik değeri daha yüksek bulunmuştur. Bu konuda, 1995 yılında İtalya'da 10 laboratuvarı kapsayan çok merkezli sitogenetik bir çalışmada, 6676 sağlıklı birey değerlendirmeye alınmıştır. Tarama sonucunda, her iki cinsiyette de kromozomal anormallik açısından fark görülmemiştir [Bonassi ve ark., 1995].

Kromozom hasarlarını inceleme metotları içinde, çok kullanılan testlerden biri de kardeş kromatit değişimii testidir. KKD testi ile fiziksel ve kimyasal ajanların mutajenik potansiyelleri saptanabilmektedir. Mutajen ve karsinojenlerin kromozom kırığına yol açmayacak düzeydeki toksik etkisi, KKD oranında önemli artışa neden olmaktadır. Bu çalışmada, yaş gruplarına göre KKD sayısı, 0- 10 yaş grubu dışındaki

talasemili hastalarda önemli derecede artmıştır. Còtė ve arkadaşları 1982'deki çalışmalarında, talasemili hastalarda KKD frekansının artmış olduğunu göstermişlerdir. Silva ve arkadaşları [1992], talasemili hastalarda KKD frekansını anlamlı oranda yüksek bulmuşlardır.

Bu çalışmada, KKD oranındaki değişim üç farklı ilaç kullanımı bakımından da incelenmiştir. Her üç ilacın kullanımı da KKD oranını kontrole göre artırmıştır. İlaç grupları birbiriyle karşılaştırıldığında; DFO ve DFO+DFP kombine tedavi alan grupların KKD değeri, Deferasiroks tedavisi alan gruptan yüksek bulunmuştur. DFO kullanan ile DFO+DFP kombine şelasyon alan grubun KKD oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Demir bağlayıcı ilaçlardaki en düşük KKD frekansı, Deferasiroks ile tedavi edilen grupta gözlenmiştir.

Liu ve arkadaşları, myleran tedavisi alan iki talasemili hastanın tedavi öncesi ve sonrası KKD değerlerini incelemişlerdir. Ancak tedavi öncesi ve sonrası KKD'de anlamlı bir fark tespit edememişlerdir [Liu ve ark. 1990]. Bir yıl sonra bir başka çalışmada, günde 0,2 mg/kg myleran olacak şekilde tedaviye başlanan 5 beta talasemi majorlu hastada, tedavi başlangıcından 40–50 gün sonra beklenen Hb, HbF ve RBC düzeylerine ulaşılmıştır. Ancak DNA hasarını gösteren KKD değerinde de dramatik bir artış gözlenmiştir [Liang, 1991].

Ferritin düzeylerine göre grupların KKD değerleri karşılaştırıldığında, ferritin değeri 2000 ng/ml'den büyük olan talasemili grubun KKD değeri anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. Hasta grubunun KKD düzeyleri ile hastaların yaş, ferritin düzeyleri karşılaştırılmış; KKD oranı ile yaş arasında pozitif korelasyon ve istatistiksel anlamlı bir ilişki olduğu gözlenmiştir. KKD ile ferritin düzeyleri arasında pozitif yönde ilişki görülmesine rağmen, anlamlı bulunmamıştır. Demir bileşiklerinin Suriye Hamsteri Ovaryum hücrelerinde KKD değişimini artırdığı ve baz tautomerlerine neden olduğu gösterilmiştir [Heidelberger 1983].

Gruplar cinsiyet dağılımı açısından karşılaştırıldığında anlamlı fark gözlenmemiştir. KKD oranının kadınlarda yüksek olduğunu gösteren çalışmalar vardır [Bukvic ve

ark., 2001; Kirsch-Volders ve ark., 2010]. Ancak Bonassi ve arkadaşları [1995] İtalya'da yaptıkları bir çalışmada KKD değerini her iki cinsiyette benzer bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda da KKD sonuçları Bonassi ve arkadaşlarının çalışmasına benzer çıkmıştır.

Mikronükleus (MN), asentrik kromozom ve kromatid kırıklarından veya bir ya da birkaç kromozom ve kromatidin anafazda geri kalmasından oluşan, esas nükleusun dışında rastlanan küçük nükleuslardır [Kirsch-Volders ve ark., 2011]. MN oluşumuna neden olabilen kromozom kaybı ya da kromozomların ayrılamaması (non-disjunction) kanser ve yaşlanmada gözlenen önemli olaylardan biridir. Bu durum, muhtemelen iğ iplikçiklerinde ve sentromerde bozulma ya da metafazdan önce kromozom yapısının yoğunlaşması sonucu oluşmaktadır [Dellarco ve ark., 1985]. Böylece, MN testi ile hem klastojenik hem de anöjenik etkiler belirlenebilmektedir [Parry ve Kirsch-Volders, 2010]. Ayrıca, Fenech ve arkadaşları [1999] uluslararası işbirliği ile yaptıkları bir araştırmada MN ile kanser arasındaki ilişkiyi açıkça göstermişlerdir. Son yıllarda MN testi yaygın olarak kanser takip ve önleme programlarında biyobelirteç olarak kullanılmaktadır [Bonassi ve ark., 2007].

Bu çalışmada MN frekansı, 20 yaşından büyük hastalarda kontrole göre yüksek bulunmuştur. Hastalardaki demir yükü ve yaş artışı ile beraber genetik hasarın da arttığı MN testi ile gösterilmiştir.

2005 yılında yapılan bir çalışmada, talasemi hastalarının retikülositlerinde MN frekansı, kontrol grubundan yüksek bulunmuştur. MN frekansının yüksekliği organlarda biriken demirin genotoksik etkisinin olduğunu göstermiştir [Offer ve ark., 2005]. Bir başka çalışmada, hidroksiüre tedavisi alan 35 orak hücre anemili hastaların lenfositlerinde MN frekansının sağlıklı kontrole göre yüksek olduğu bulunmuştur. MN frekansının, doz ve süre ile doğru orantılı artığı gösterilmiştir. Ancak nükleoplazmik köprüler ve nükleer tomurcukların sayısında kontrole göre farklılık gözlenmemiştir [Maluf ve ark., 2009]. Başka bir çalışmada orak hücre anemili hastalarda, hidroksiürenin genotoksisitesini değerlendirmek amacıyla immuno manyetik seperasyon tekniği ile retikülositlerdeki MN frekansı incelenmiş

ve MN frekansının tedavi süresi uzadıkça arttığı gözlenmiştir. Retikülositlerdeki MN frekansının yüksekliği, hidroksiürenin kemik iliğine genotoksik etkisi olduğunu göstermektedir [Flanagan ve ark., 2010].

TM'lü hastalarda demir bağlayıcı ilaçların MN frekansına olan etkisini karşılaştırdığımızda, yalnızca DFO+DFP kombine ilaç kullanan hastalarda MN değeri yüksek bulunmuştur. Aksine bu kombinasyonu kullanan hastalarda KA oranında artış gözlenmemiştir. DFP kromozomal anormallik oranını düşürürken MN oluşumunu artırıcı etki gösteriyor olabilir. DFP'nin özellikle iğ ipliklerini inhibe edici özelliği olabileceği düşünülmektedir.

Mikronükleus testi sonuçlarına göre; ferritin değeri 2000 ng/ml'den büyük olan hasta grubunun MN frekansında diğer gruba göre bir miktar artış gözlenmesine rağmen, bu artışın anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Ferritin düzeyleri ile MN frekansı arasında pozitif korelasyon olmasına rağmen istatistiksel anlamlılık gözlenmemiştir.

Bonassi ve arkadaşları, mikronükleus frekansının yaş ile beraber her iki cinsiyette de arttığını, ancak kadınlarda erkeklere oranla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Kadınlarda MN frekansının özellikle 44-54 yaş arasında yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu dönemin menopoz dönemi olması nedeniyle hormonların etkisinin MN frekansındaki artışa neden olduğu düşünülmektedir. Aynı araştırmacıların çok merkezli bir başka çalışmalarında da kadınlarda MN frekansı yüksek bulunmuştur [Bonassi ve ark., 1995, 2001; Bukvic ve ark., 2001]. Büyük çoğunluğunu yirmi yaş altındaki hastaların oluşturduğu çalışmamızda; her iki cinsiyette MN frekansı açısından bir farklılık saptanmamıştır. Hastalardaki MN frekansı ile yaş arasında pozitif korelasyon ve istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur. Bu çalışmada MN frekansının 20 yaş üstü grupta yüksek çıkmış olması da bunu desteklemektedir.

Araştırmamızda olası DNA hasarı Comet yöntemi ile incelenmiştir. DNA hasarı kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu olarak değerlendirmeye alınmıştır. Kuyruk uzunluğu yalnızca 0–10 yaş hasta grubunda anlamlı oranda artmıştır. Kuyruk yoğunluğu ise 0-10 ve 20 yaş üzeri hasta grubunda yüksek bulunmuştur. DNA

hasarının, demir bağlayıcı ilaç kullanan gruplarda herhangi bir farklılık göstermediği belirlenmiştir. Tüm ilaç gruplarında hastalardaki DNA hasarı kontrole göre yüksek bulunmuştur. Ayrıca TM'lü olgularımızda DNA hasarı ile ferritin düzeyi arasında pozitif yönde, yaş ile negatif yönde zayıf bir ilişki saptanmıştır.

Ferritin düzeyi 2000 ng/ml üzerindeki grupta kuyruk uzunluğu (μm) değeri artmış ancak bu artış anlamlı bulunmamıştır. DNA hasarı ile cinsiyet arasında da bir ilişki saptanmamıştır. Lima ve arkadaşları FeSO4 7H2O'ın neden olduğu genotoksik hasarı alkali comet testi ile araştırmışlardır. 1,25; 2,5; 5 μg/ml'lik dozları ile Go lenfositlerini muamele etmişlerdir. DNA hasarının negatif kontrole yakın olduğunu bulmuşlardır. Bu sonuç göstermektedir ki Go fazında (dinlenmekte) olan hücrelere FeSO4 7H2O etki yapmamaktadır [Lima ve ark., 2008]. Dixit ve Arun, DNA hasarını, sağlıklı populasyonda comet yöntemi ile incelemişler; cinsiyet dağılımı açısından karşılaştırdıklarında istatistiksel anlamlı fark gözleyememişler; ancak kentte oturan erkeklerde daha fazla DNA hasarı tespit etmişlerdir [Dixit ve Arun, 2011].

Aşırı demir yüklü olgularda, transferrinin demir taşıma kapasitesi dolmakta ve transferrine bağlı olmayan demir (serbest demir) oluşmaktadır. Serbest demirin dokulara girişi, transferrin demirinden daha hızlıdır ve çok kolaylıkla elektron kazanabilir veya kaybedebilir. DNA negatif yüklü fosfat grupları içerdiğinden, Fe^{+2} $^{+3}$ katyonları rahatlıkla DNA'ya bağlanabilmektedir. DNA'ya bağlı demir iyonları ile H_2O_2'in reaksiyonundan oluşan OH^- radikalleri DNA'da hasar oluşturur [Dunkel ve ark., 1999; Berg ve ark., 2001; Aydınok, 2007]. Bir çalışmada, H_2O_2'nin mutajenik etkileri comet yöntemiyle araştırılmıştır. *In vitro* koşullarda H_2O_2'nin 25μl ve 50 μl dozları insan karaciğer karsinoma hücrelerine 5, 30, 40, 60 dk ve 24 saat süre ile uygulanmıştır. Bu maddenin, 5-60 dk inkübasyonlarında, DNA hasarının arttığı gözlenmiştir. 24 saatlik uygulamada ise DNA hasarı gözlenmemiştir. Bu durum, DNA tamir mekanizmalarının ve antioksidan enzimlerin bu sürede devreye girdiğini göstermektedir [Ghazalla ve ark., 2010]. Ayrıca demir, genotoksik hasardan başka hücrelerde deformasyonlara da neden olmaktadır [Hartwig ve Schlepegrell, 1995]. *In vitro* bir başka çalışmada LLC-PK1 hücre kültüründe, Antimisin A tarafından

indüklenen DNA hasarı ve apopitozun, DFO varlığında engellendiği gösterilmiştir. Reaktif oksijen molekülleri, endonükleaz aktivitesini artırarak DNA hasarına neden olmaktadır. Özellikle hipoksiye maruz kalan hücreler bu yolla apopitoza gitmektedirler [Hagar ve ark.,1996].

Bir çalışmada fare karaciğer hücrelerine 100µM Fe-NTA'nın muamelesi ile oluşan DNA hasarının myricetin varlığında azaldığı gösterilmiştir. Myricetin DNA ekzisyon-onarım enzim aktivasyonunu artırarak hasarı önlemektedir [Abalea ve ark., 1999]. Literatürde mutajenik bazı ilaçların (doxorubicin) genotoksik etkilerinin demir varlığında daha da artığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [Kostoryz ve Yourtee, 2001]. Farelerde yapılan bir çalışmada 33,2 mg/ kg demir 7 gün boyunca gavaj yoluyla verilmiş ve uygulama süresi ile doğru orantılı olarak karaciğerdeki demir miktarını arttırdığı ve alkali comet testi ile de DNA hasarının arttığı gösterilmiştir [Pra ve ark., 2008].

Çin Hamsteri V79 memeli hücrelerinde yapılan çalışmada, hücreler 250 ve 500 µM Fe-NTA konsantrasyonları ile 24 ve 48 saatlik sürelerde muamele edilerek oksidatif stresle DNA kırıkları oluşturulmuş ve oluşan DNA hasarı, süre ve dozla beraber doğru orantılı artmıştır. Bu DNA hasarı, 8-OHdG artışı ile de doğrulanmıştır. 8-OHdG, hücresel oksidatif stres ve bir DNA onarım ürünü olarak önemli bir biyobelirteçtir [Azqueta ve ark., 2009].

Bir başka comet çalışmasında da Fe-NTAnın 500 – 1000 µM, FeSO4'ın 250-1000 µM, hemoglobin 10 µM, miyoglobin 250 µM dozlarının insan periferal lenfositlerinde genotoksik olduğu, ancak 10 - 1000 µM dozlarının sitotoksik olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca bu deneyde DNA hasarı ve onarımının ilk bir saat içinde gerçekleştiği gösterilmiştir [Park ve Park, 2011].

Son yıllarda talasemi hastalarında demir yükünün ve demir bağlayıcı ilaçların olası genotoksik etkileri, comet yöntemi ile araştırılmıştır. Anderson ve arkadaşları, talasemi ve orak hücre anemisi birlikteliği olan ve şelasyon tedavisi almayan bir hasta ve sağlıklı bir kişide $FeCl_2$, $FeCl_3$, $FeSO_4$, hemosiderin, DFO ve DFP

maddelerinin DNA hasarı üzerindeki etkilerini, alkali comet yöntemi ile incelemişlerdir. $FeCl_3$ ve hemosiderin lenfositlerde hasar oluşturmamıştır. $FeCl_2$, $FeSO_4$ bileşikleri ise DNA hasarına neden olmuştur ve bu hasar şelatör (DFO ve DFP) varlığında azalmıştır. Aynı çalışmada ferritinin, DNA hasarına hemosiderinden daha fazla neden olduğu gösterilmiştir. Hemosiderinin yapısında fazla α FeOOH bulunmakta ve DNA' da hasara neden olmamaktadır [Anderson ve ark., 2000]. Aynı araştırmacılar *in vitro* çalışmada, mutajen ve karsinojen etkisi olan 3 amino- 1 methyl – 5H pyrido (4.3-b) indole (Trp-p-2) maddesinin etkisine aynı hasta ve kontrol lenfositlerinde bakmışlar; bu maddenin hasta DNA'sında kontrole göre iki kat daha fazla hasara neden olduğunu saptamışlardır. Ortama antioksidan olan quercitin ve kaepferel eklendiğinde, düşük dozların DNA hasarını azaltmadığı ancak yüksek dozların DNA hasarını önlediği gözlenmiştir. Bu antioksidanlar hasta lenfositlerinde kontrole göre fazla etkili olmamıştır [Anderson ve ark., 2001a-b].

Bir başka *in vitro* çalışmada, mutajen özelliği olan IQ (2-amino-3-metilimidazol [4,5-f] kinolin) ve PHIP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazol [4,5-b] piridin) heterosiklik aromatik aminlerin talasemik lenfositlerde kontrol lenfositlerine göre daha fazla DNA hasarına neden olduğu belirtilmiştir [Ruf ve ark., 2003a- b].

Byeong ve arkadaşları demir bağlayıcı ilaç olan DFO'nun genotoksik etkisini MN ve Comet testleri ile incelemişler; insan lenfositlerinde DFO'nun, p53'ü aktive ederek mitokondrial hasar ile apopitoza neden olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada kaspaz 3 aktivitesi ve mitokondri membranı incelenerek apopitoz desteklenmiştir [Byeon ve ark., 2007].

Bu çalışmada elde edilen sonuçları özetleyecek olursak;

- Bu çalışmada literatürle uyumlu olarak talasemi hasta lenfositlerinde genotoksik hasarın sağlıklı bireylere göre artmış olduğu gözlenmiştir.

- Yaşlara göre kromozomal anormallik frekansı değerlendirildiğinde, 0-20 yaş aralığındaki hastalarda kontrole göre anlamlı artış saptanmıtır. DFO ve

Deferasiroks tedavisi kullanan hastalarda kromozomal anormallik frekansı artmıştır. Ancak DFO+DFP kombine şelasyon tedavisi alan grubun yaş ve ferritin değerlerinin yüksekliğine rağmen, kromozomal anormallik frekansları kontrole göre bir farklılık göstermemiştir.

- TM'lü olgularda, yaş ile doğru orantılı olarak mitotik indeksin düştüğü ve bu azalışın sağlıklı bireylerden daha fazla olduğu saptanmıştır. En düşük mitotik indeks DFO kullanan hasta grubunda gözlenmiştir.

- TM'lü hastalarda 10 yaşında sonra KKD frekansının arttığı gözlenmiştir. En yüksek KKD değeri, DFO ve DFO+DFP kombine tedavi alan gruplarda bulunmuştur. Dolayısıyla en az KKD oluşumunun gözlendiği grup Deferasiroks kullanan hastalardır.

- Bu çalışmanın sonucunda TM'lü hastalarda 20 yaşından sonra MN frekansının artmış olduğu saptanmıştır. DFO+DFP kombine tedavi alan olgularda MN frekansı yüksek, DFO ve Deferasiroks tedavisi alanlarda ise MN frekansı düşük bulunmuştur.

- TM'lü hastaların replikasyon indeksi (RI) ve nükleer bölünme indeksi (NBI) değerleri kontrole göre düşük bulunmuştur ancak anlam yaratacak düzeyde değildir.
- TM'lü olgularda primer DNA hasarı 0-10 yaş ve 20 yaş üzeri hastalarda yüksek bulunmuştur. Bulunan sonuçlar göstermektedir ki; 0-10 yaş hasta grubunda, 3 yaş sonrası şelasyona başlanması ve artan demir yükünün şelatörlerle azaltılamamış olması, DNA hasarının artış nedeni olabilir. Bu gruptaki 21 hastanın 8'i dört yaşından küçüktür. Ayrıca yaş ile DNA hasarı arasındaki negatif ilişkinin varlığı bu savımızı güçlendirmektedir. DFO, DFO+DFP ve Deferasiroks tedavisi alan hastalardaki DNA hasarı kontrole göre yüksek bulunmuştur. DNA hasarının demir bağlayıcı ilaç kullanan gruplarda herhangi bir farklılık göstermediği belirlenmiştir. Grup 3'deki hastaların DNA hasarını şu şekilde açıklayabiliriz: Bu

gruptaki 13 hastanın 8'i DFO+DFP tedavisi kullanmakta ve aynı zamanda da demir yükü en yüksek olan hastalardır. Talasemili hastalarda oksidatif stresin yarattığı DNA hasarını sonuçlarmız desteklemektedir.

DFO'lu hasta grubunda MN frekansının anlamsız olması ve mitotik indeksin düşüşü, DFO'nun p53 proteinini aktive ederek apopitoza neden olduğunu göstermektedir. DFO+DFP kombine kullanan hastalarda, düşük kromozomal anormallik frekansı ve artmış MN frekansının gözlenmesi; DFP'nin kromozomda yapısal bozukluğa neden olmaması ancak bütün kromozom kaybına ve dolayısıyla iğ ipliği oluşumunda inhibisyona yol açmasından kaynaklanıyor olabilir. Deferasiroks ise orta düzeyde kromozomal anormalliğe, kromozom kayıplarına ve apopitoza neden olmaktadır.

Sonuç olarak; talasemi majörlü hastalarda yaşın artması ile paralel artan kan transfüzyon sayıları organlarda demir artışına neden olmaktadır. Bunun sonucunda oksidatif strese bağlı genotoksik hasar artmış olabilir. DFO ve Deferasiroks kullanan hastaların tüm genotoksisite testi sonuçları birbiriyle paraleldir. Her iki ilacı kullananlarda da mitotik indeks düşük, KA ve Comet kuyruk yoğunluğu yüksektir. DFO+DFP kullananlarda ise KKD, MN ve DNA hasarı (comet kuyruk uzunluğu ve kuyruk yoğunluğu) yüksektir. İlaçlar birbiri ile kıyaslandığında en az kromozomal anormallik DFO_DFP kullananlarda ortaya çıkmıştır. En az kardeş kromatid değişimi Deferasiroks kullananlarda ve en az mikronükleus oluşumu ise DFO kullanan hastalarda gözlenmiştir. İlaçların hiç biri için tam olarak genotoksik değildir demek mümkün olamamaktadır. Ancak özellikle kombine tedavi alanlarda KA oranında artış saptanmamış olması karsinogenezle bağlantılı olamadığını göstermesi bakımından önemlidir. Bu kombinasyonu kullananlarda MN freakansının artış göstermesi, bu hastaların çoğunun 20 yaş üstü grupta olamasından kaynaklanıyor olabilir. Çalışmada elde ettiğimiz sonuçların, klinik yönlendirme ve demir bağlayıcı ilaç tedavi protokollerinin belirlenmesinde faydalı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abalea, V., Cillard, J., Dubos, M.P., Sergent, O., Cillard, P., and Morel, I., "Repair of iron-induced DNA oxidation by the flavonoid myricetin in primary rat hepatocytecultures", ***Free Radical Biol. Me.***, 26: 1457-1466 (1999).

Akar, N., Çavdar, A.O., Dessi, E., Loi, A., Pirastu, M., and Cao, A., "β-thassemia mutations in the Turkısh population, ***J. Med. Genet.,*** 24: 378-379 (1987).

Aksoy,M., Lekin, E.M., Maurant, A.E., Lehmann, H., "Blood groups, hemoglobins, and thalassemia in Southern Turkey and Eti Turks", ***Brit. Med. .J***, 2: 937 (1958).

Aksoy, H., Yılmaz, S., Çelik, M., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., "Genotoxicity study in lymphocytes of offset printing workers", ***J. Appl. Toxicol.,*** 26: 10-15 (2006).

Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norpha, 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.,*** 463 (2): 72-111 (2000).

Anderson, D., Yu, T.W., McGregor, D.B.," Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure", ***Mutagenesis,*** 13: 539-555 (1998).

Anderson, D., Yardley-Jones, A., Hambly, R.J., Vives-Bauza, C., Smykatz-Kloss, V., Chua-Anusorn, W., et al., "Effects of iron salts and haemosiderin from a thalassaemia patient on oxygen radical damage as measured in the comet assay", ***Teratog. Carcinog. Mutagen.,*** 20: 11-26 (2000a).

Anderson, D., Yardley-Jones, A., Vives-Bauza, C., Chua Anusorn, W., Cole, C., Webb, J., "Effect of ıron salts, haemosderins and chelating agents on the lymphocytes of a thalassaemia patient without chelation therapy as measured in the comet assay", ***Teratog. Carcinog. Mutagen.,*** 20: 251-264 (2000b).

Anderson, D., Dhawan, A., Yardley-Jones, A., Ioannides, C., Webb, J., " Effect of antioxidant flavonoids and a food mutagen on lymphocytes of a thalassemia patient without chelation therapy in the comet assay", ***Teratog. Carcinog. Mutagen.,*** 21:165-174 (2001).

Anderson, L.J., Wonke, N., Prescott, E., et al." Improved myocardial iron levels and ventricular function with oral deferipronee treated patients with subctaneous desforrioxamine in thalassemia", ***Lancet***, 360: 516-520 (2002).

Anwar, W.A., Salama, S.I., Serafy, M.M., Hemida, S.A., Hafez, A.S., "Chromosomal aberrations and micronucleus frequncy in nurses occupationally exposed to cytotoxic drugs", ***Mutagenesis,*** 4: 315-317 (1994).

Arcasoy, A., "Thalasemiada tedavi",.Ankara ***Thalasemia Derneği Yayını****, A.Ü. Rektörlük Basımevi, (1994).*

Aydınok Y. "Talasemide demir yükü ve şelasyon, talasemi ve hemoglobinopatiler tanı ve tedavi ", Talasemi ve hemoglobinopatiler, Çeviri editörleri, Canatan, D., Aydınok, Y., ***Antalya Retma Matbaa Ltd,*** 159-173 (2007).

Aydınok, Y., "Deferasiroxs Etkinlik ve Güvenliği" ***50. Uluslararası Talasemi Yazokulu*** , Antalya, (Nisan 2008).

Aydınok, Y., "Talasemide Şelasyon",***Türkiye Klinikleri J. Hem. On.c,*** 3 (1): 76-79 (2010).

Azqueta, A., Lorenzo, Y., Collins, A.R., "In vitro comet assay for DNA repair a warning concerning application to cultured cells", ***Mutagenesis,*** 24(4): 379-381 (2009).

Balla, G., Vercellotti, G.M., Eaton, J.W., Jacob, H.S., "Iron loading of endothelial cells augments oxidant damage", ***J. Lab. Clin. Med.***, 116 (4): 546-554 (1990).

Berg, D., Gerlach, M., Youdim, M.B., Double, K.L., Zecca, L., Riederer, P., et al., "Brain iron pathways and their relevanceto Parkinson's disease", ***J. Neurochem.***, 79: 225-236 (2001).

Bilenoğlu, O., Tadmouri, G.O., Başak, A.N., "The molecular basis of β-thassemia in Turkey", ***2nd Internatonal Thalassemia summerschoo on thalassemia***,Notrh Cyprus, 2-23 (2002).

Bolognesi, C., "Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies", ***Mutat. Res.,*** 543(3): 251-272 (2003).

Bonassi, S., Bolognesi, C., Abbondandolo, A., Barale, R., Bigatti, P., Camurri, L., Dalpra, L., Ferrari, M.D., Forni, A., Lando, C., Padovani, P., Pasquini, R., Stella, M., Puntoni, R., "Influence of sex on cytogenetic end points: evidence from a large human sample and review of the literature", ***Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.,*** 4: 671-679 (1995).

Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, L.R., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich L., Mirkova, E., Mosesso, P., Müller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtssova, I., Vral, A., Zijno, A., " HUman MicroNuleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the freqency of micronuclei", ***Environ. Mol. Mutagen.***, 37 (1): 31-45 (2001).

Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagma, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M.R., Zijno, A., Norppa, H., Fenech, M., " An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans", ***Carcinogenesis***, 28: 625-631 (2007).

Borgna-Pignatti, C., Cappellini, M.D., De Stefano, P., " Survival and complications in thalassemia", ***Ann. N. Y. Acad. Sci***., 1054: 40-47 (2005).

Britton, R.S.L., "Iron toxicity and chelation therapy", ***Int. J. Hemato.l***, 76: 219-228 (2002).

Bukvic, N., Gentile, M., Susca, F., Fanelli M., Serio, G., Buonadonna, L., Capurso, A., Guanti, G., " Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging: a study including 16 centenerians", ***Mutat. Res.,*** 498(1-2): 159-167.

Byeong M. K., Jun, Y., Choi, Y., Jee K., Hae, D.W., Hai W. C., "Desferroxamine (DFX) has genotoxic effect on cultured human lymphocytes and induces the p53-medited damage respons",***Toxicology***, 229: 226 – 235 (2007).

Canatan D. "Talasemi trasfüzyonunda prensipler", Talasemi ve hemoglobinopatiler tanı ve tedavi, .Çeviri editörleri, Canatan, D., Aydınok, Y., ***Antalya Retma Matbaa Ltd.,***: 29-107 (2007).

Canatan, D., "Talasemi ve Hemoglobinopatilerin dünyada ve Türkiye'de durumu", ***Türkiye Klinikleri J. Hem. Onc.***, 3(1): 1-4 (2010).

Cantinieaux, B., Janssens, A., Boelaert, J.R., Lejeune, M., Vermylen, C., Kerrels V, Cornu, G., Winand,J., Fondu, P., " Ferritin-asociated iron induces neutrophil dysfunction in hemosiderosis ", ***J. Lab. Clin. Med.***, 133 (4): 353-361 (1999.

Cappellini, M.D., Cohen, A., Piga, A., Bejaoui, M., Perrotta, S., Agaoglu, L., Aydinok, Y., Kattamis, A., Kilinc, Y., Porter, J., Capra, M., Galanello, R., Fattoum, S., Drelichman, G., Magnano, C., Verissimo, M., Athanassiou-Metaxa, M., Giardina, P., Kourakli-Symeonidis, A., Janka-Schaub, ., Coates, T., Vermylen, C., Olivieri, N, Thuret, I., Opitz, H., Ressayre-Djaffer, C., Marks, ., Alberti, D., "A Phase 3 study of deferasirox (ICL670), a once-daily oral chelator, in patients with beta thalassemia", ***Blood***, 107: 3455-3462 (2006).

Cappellini, M.D., " Long-term efficacy and safety of deferasirox", ***Blood Rev.,*** 22 (2): 535-541 (2008).

Chuang, C.H., Hu, M. L., " Use of whole blood directly for single-cell gel electrophoresis (comet) asssay in vivo and white blood cells for in vitro assay", ***Mutat. Re.s***, 564:75-82 (2004).

Clark, B.E., Thein, S.L., "Molecular diagnosis of haemoglobin disorders",***Clin. Lab. Hae.***, 26: 159-176 (2004).

Conover, W.J., (1980), "Multiple comparison. tests",*Practical Nonparametric Statistics*, 2nd ed.,: **John Wiley & Sons, Inc.**, NewYork, 5(2): 229-239 (1980).

Cote G.B., Sarri, C., Papadakou-Lagoyanni, S., Mengreli, C., Karagiorga-Lagana, M., Pantelakis, S., "Increased rate of sister chromatid exchanges in beta-thalassaemia", ***Blut*.,** 44 (6): 349-353 (1982).

Cote, G.B., Papadakou-Lagoyanni, S.," β- thalassaemia: increased chromosomal anomalies in lymphocyte cultures", ***J. Med. Genet.***, 16: 52-55(1979).

Çakmak, G., "Trafik Polisi ve taksi sürücüleri hava kirliliği maruziyetine yönelik idrarda 1- hidroksipiren değerlerinin, periferal lanfositlerde kromozomal aberasyon ve MÇ sıklığının araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, ***Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, 28-107 (2000).

Çavdar, A.O., Arcasoy, A., "The incidence of beta-thalassemia and abnormal hemoglobins in Turkey"***, Acta. Hematol.***, 45:313-318 (1971).

Çelik, M., Dönbak, L., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D, Aksoy, H., Yılmaz, S., " Cytogenetic damage in workers from a coal-fired power plant", ***Mutat. Res.,*** 627:158-163 (2006).

Çelik, M., "Dinocap fungusitinin *Allium cepa L*. Kök ucu hücreleri ve insan periferal lenfositlerinde sitogenetik etkileri", Doktora Tezi, ***Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*** Ankara, 1-102 (2003).

David, M.W., Thompson, L.R., "Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange", ***Mutat. Res.,*** 616: 11-23 (2007).

Del CastelloB.E., " Talasemide ve orak hücre hastalığında kök hücre nakli", ***Türkiye Klinikleri J. Hem. On.c,*** 3 (1): 102-111 (2010).

Dellarco, V.L., Mavournın, K.H., Tice, R.R., "Aneuploidy and health risk assessment: current status and future directions", ***Environ. Mutage.***, 7: 405-424 (1985).

Dixit, A.K., Arun, N., "Assesment of basal DNA damage in normal and Health young individuals by comet assay", ***J. Biosci. Tech.,*** 2 (2): 247-257 (2011).

Drakopolou, E., Papanikolaou, E., Anagnov, P., "The Ongoing challenge of hematopoietic stem cell-based gene therapy for *β*-Thalassemia", ***Stem Cells International,*** (2011)

Dunkel, V.C., San, R.H., Seifried H.E., Whittaker, P., " Genotoxicity of iron compounds in *Salmonella typhimuriu*m and L5178Y Mouse lymphoma cells", ***Environ. Mo. Mutagen*.,** 33 (1): 28-41 (1999).

Ekici, A., "Talasemi major tanısı ile takip edilen hastalarda oral demir şelatör tedavisi olarak kullanılan ICL670 ile desferioksamin- deferiprone kombine tedavisinin karşılaştırılması" Tıpta Uzmanlık Tezi, ***Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları,*** Kayseri, 40-51(2008).

Evans, H.H., Horng,M.F., Ricanati, M., Diaz-Insua,M., Jordan, R., and Schwartz, J.L., "Induction of genomic instability in TK6 human lymphoblasts exposed to 137Cs gamma radiation: comparison to the induction by exposure to accelerated 56Fe particles", ***Radiat. Res.***; 59: 737-747(2003).

Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, Errol., Bonassi, S., " The HUman MicroNucleus Project-an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans", ***Mutat. Res.*,** 428: 271-283 (1999).

Fenech M**.,** "The in vitro micronucleus technique", ***Mutat. Re.s*,** 455 (1-2): 81-95 (2000).

Fenech, F., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E., "HUMN Project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block miçronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures", ***Mutat. Re.s***, 534: 65-75 (2003).

Fenech, F., "Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a cytome assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death", ***Mutat. Res.***, 600 (1-2): 58-66 (2006).

Flanagan, J.M., Howard T.A., Mortier, N., Avlasevich, S.L., Smeltzer, M.P., Wu, S., Dertinger, S.D., " Ware, R.E., "Assesment of genotoxicity associated with hydroxyurea therapy in children with sickle cell anemia", ***Mutat. Res.*,** 698: 38-42 (2010).

George, K.A., Hada, M., Jackson, L.J., Elliott, T., Kawata, T., Pluth, J.M., et al., "Dose response of gamma rays and iron nuclei for induction of chromosomal aberrations in normal and repair-deficient cell lines", ***Radiat. Res.***, 171: 752-763 (2009).

Ghazalla, M.B., Mutch, Elaine., Aburawi, S., Williams, F.M., "Genotoxic effect induced by hydrogen peroxide in human hepatoma cells using comet assay", ***Libyan J. Med.,*** 5: 1-6 (2010).

Gümrük, F., "Hemoglobinopatilerin Tanı ve Tedavisinde Yenilikler" ***9. Mezuniyet Sonrası Kursu,*** Antalya, (Kasım 2006).

Güven, Ş**.,** "Talasemi majorda demir şelasyon sağaltımı", ***Bakırköy Tıp Dergisi,*** 3: 125-129 (2007).

Hagar, H., Ueda, N., Shah, S.V. " Role of reactive oxygen metabolites in DNA damage and cell death in chemical hypoxic injury to LLC-PK1 cells***", Am. . Physiol.,*** 271(1-2) : 209-215 (1996).

Hagmar, L., Bonassi, S., Stromberg, U., Brogger, A., Knudsen, L.E., Norppa, H., Reuterwall, C., "Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European study group on cytogenetic biomarkers and health (ESCH)", ***Cancer Res.,*** 58 (18): 4117-4121 (1998).

Hagmar, L., Strönder, U., Tinnerberg, H., Mikocz, Z., " The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis", ***Int. J. Hyg. Environ. Health,*** 202 :43-47 (2001).

Hartwig, A., Schlepegrell, R., " Induction of oxidative DNA damage by ferric iron in mammalian cells", ***Carcinogenesis***, 16 (12): 3009-3013 (1995).

Hayflick, L"Aging under glass", ***Mutat. Res.,*** 256: 69-80 (1991).

Heddle, J.A., Fenech, M., Hayashi, M., Macgregor, J.T. " Reflections on the development of micronucleus assays", ***Mutagenesis***, 26 (1):3-10 (2011).

Heidelberger, C., Freeman, A.E., Pienta, R.J., Sivak, A., Bertram, J.S., Casto, B.C., et al. "Cell transformation by chemical agents – a review and analysis of the literature. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program***", Mutat. Res****.,* 114: 283-385 (1983).

Hileti, D., Panayiotidis, P., Hoffbrand, A.V., "Iron chelators induce apoptosis in proliferating cells", ***Br. J. Haematol.,*** 89 (1): 181-187 (1995).

Hininger, I., Namy, A:C:; Sauvaigo, S., Osman, M., Faure, H., Cadet, J., Favier, A., Roussel, A.M., " Assesment of DNA damage by comet assay on frozen total blood: method and evaluation in smokers and non-smokers", ***Mutat. Res.,*** 558: 75-80 (2004).

Hoffman, H., Högel, J., Speit, G., "The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta analysis", ***Mutagenesis,*** 20(6):455-466 (2005).

Internet 1: Canatan, D., "Talaseminin önlenebilmesi" Talasemi Federasyonu Genel Merkezi 8 Mayıs Dünya Talasemi Günü Açıklaması, (2009) www.talasemi.org.

Internet 2: "Deferoxamine, Deferipronee, Deferasirox" http://en.wikipedia.org/wiki/

Jacobson-Kram, D., Albertini, R.J., Branda, F.R., Falta, M.T., Iype, P.T., Kolodner, K., Liou, S.H., McDiarmid, M.A., Morris, M., Nicklas, J.A., O'neill, J.P., Poirier,

M.C., Putman, D., Strickland, P.T., Williams, J.R., Xiao, S., " Measurement of chromosomal aberrations, sister chromatid exchange, HPRT mutations, and DNA adducts in peripheral lymphocytes of human populations at increased risk for cancer", ***Environ. Health. Perspect.***, 101 (3): 121-125 (1993).

Kim, B.S., Yoon, K.H., Oh, H.M., Choi, E.Y., Kim, S.W., Han, W.C., Kim, E.A., Choi, S.C., Kim, T.H., Yun, K.J., Kim, E.C., Lyou, J.H., Nah, Y.H., Chung, H.T., Cha, Y.N., Jun, C.D., "Involvement of p38 MAP kinase during iron chelator-mediated apoptotic cell death***", Cell Immunol.,*** 220 (2): 96-106 (2002).

Kirkland, D., "Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the in vitro micronucleus test (MNvit): summary of results in the collaborative trial", ***Mutat. Res,*** 702: 139-147 (2010).

Kirsch, V.M., Sofuni, T., Aardemac, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishıdate, J.R.M., Kırchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A., "Report from the in vitro micronucleus assay working", ***Mutat. Res***, 540: 153-163 (2003).

Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Herceg, Z., Hirvonen, A., Möller, L., Phillips, D.H., "Gender-related differences in response to mutagens and carcinogens", ***Mutagenesis***, 25: 213-221 (2010).

Kostoryz, E.L. and Yourtee, D.M., "Oxidative mutagenesis of doxorubicin–Fe(III) complex", ***Mutat. Res*** ; 490: 131-139 (2001).

Krishnaja, A.P., Sharma, N.K., " Heterogeneity of chromosome damage in beta-thalassaemia trits. An evaluation of spontaneous and gamma-ray-induced micronuclei and chromosome aberrations in lymphocytes in vitro after G0 and G2 phase irradiation", ***Int. J. Radiat .Biol.,*** 66 (1): 29-39 (1994).

Krishnaja, A.P., Sharma, N.K., " Heterogeneity in chemical mutagen-induced chromosome damage after G2 phase exposure to bleomycin, ara-c and gentian violet in cultured lymphocytes of β-thalassaemia traits", ***Mutat. Re.s***, 331(1): 143-148 (1995)

Kirsch-Volders, M., Gina, P., Elhajouji, A., Lukamowicz, M., Gonzalez, L., Loock, K.V., Decordier, I., "The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance", ***Arch. Toxicol***, 85 (8): 873-899 (2011).

Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S.P., Jha, A.N:, "Comet assay measurement: a perspective", ***Cell Biol Toxicol***, 25: 53-64 (2009).

Kwaitkowski J.L., "Real-world use of iron chelators", ***Hematology Am..Soc. Hematolo. Educ. Program,*** 451-458 (2011).

Kyriakou D., Eliopoulos A. G,. Papadakis A, Alexandrakis M., Eliopoulos G. D:, "Decreased expression of c-myc oncoprotein by peripheral blood mononuclear cells in thalassaemia patients receiving desferrioxamine", ***Eu.r J. Haematol.,*** 60: 21-27 (1998).

Landi, S., Frenzilli, G., Milillo, P.C., Cocchi, L., Sbrana, I., Scapoli, C., Barale, R., " Spontaneous sister chromatid exchange and chromosome aberration frequency in humans: the familial effect", ***Mutat. Res.***, 444 (2): 337-345.

Latt, S.A., Schreck, R.R., Loveday, K.S., Dougherty, C.P., Shuler, C.F., "Sister chromatid exchange", ***Hum. Genet.,*** 267-331 (1980).

Liang, Z., " Further study on the treatment of severe beta-thalassemia with myleran", ***Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue B****ao*, 13 (2): 133-136 (1991).

Lima, P.D., Cardosa, P.C., Khayat, A.S., Bahia, M.O., Burbona, R.R., "Evaluation of the mutagenic activity of hydroxyurea on the G1-S-G2 phases of the cell cycle: an in vitro study", ***Genet. and Mol. Res.,*** 2: 328-333 (2003).

Lima, P.D., Vasconcellos, M.C., Montenegro, R.A., Sombra, C.M., Bahia, M.O., Costa-Lotufo, L.V., et al., "Genotoxic and cytotoxic effects of iron sulfate in cultured human lymphocytes treated in different phases of cell cycle", ***Toxicol. In Vitro***, 22: 723-729 (2008).

Liu, D.P., Liang, C., Ao, A., Jia, P., Chen, S., Wang, R., Liu, L., Jin, H., Zha, D., Huang, Y, "Treatment of severe β-thalassemia (patients) with myleran", ***Am. J. Hematology,*** 33: 50-51 (1990).

Mace, M.L. Jr., Daskal, Y., Wray, W., "Scanning electron microscopy of chromosome aberrations", ***Mutat. Res.,*** 52 (2): 199–206 (1978).

Maluf, S., Pra, D., Friedrisch, J.R., Bittar, C., Lima da Silva, M.A., Henriques, A.J., siila, L., " Length of treatment and dose adeterminants of mutagenicity in sickle cell disease patients treated with hydroxyurea", ***Environ. Toxicol. Pharmacol.,*** 27: 26-29 (2009).

Mamur, S., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., "Does potassium sorbate induce genotoxic or mutagenic effects in lymphocytes?", ***Toxicology In Vitro***, 24: 790–794 (2010).

Marshall, R., Tricta, F., Galanello, R., Leoni, G., Kirkland, D., Minto, S., Spino, M., "Chromosomal aberration frequencies in patients with thalassaemia major undergoing therapy with deferipronee and deferoxamine in a comparative crossover study", ***Mutagenesis,*** 18: 457-463 (2003) .

McArt, D.G., McKerr, G., Saetzler, K., Howard, C. V., Downes, S., Wasson, G.R., "Comet sensitivity in assessing DNA damage and repair in different cell cycle stages", ***Mutagenesis,*** 25(2): 299-303 (2010***).***

Mcgann, T.P., Howard, T:A., Flanagan, M.J., Lahti, J.M., Ware, R.E., " Chromosome damage and repair in children with sickle cell anaemia and long-term hydroxycarbamide exposure", ***Br. J. Haematol.***, 154: 134-140 (2011).

Mello, F.A.C.," Meneghini, R., In vivo formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen perxide is mediated by the Haber-Weiss reaction", ***Biochim. Biophys. Act***a, 781 (1-2): 56-63 (1984).

Modell, C.B., Beck, J., Long-term desferrioksamine therapy in thalassaemia", ***Ann. N.Y. Acad. Sci.,*** 232: 201-210 (1974).

Modell, C.B., Khan, M., Darlison, M., "Survival and complications in thalassemia major in the UK: data from the UK thalassaemia register", ***Lancet***, 355: 2051-2052 (2000).

Natarajan, A.T., "Chromosome aberrations: past, present and future", ***Mutat. Res.,*** 504 (1-2): 3-16 (2002).

Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I.L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffeta, P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Sram, R.J., Knudsen, L. E., Barale, R., Fucic, A., " Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk", ***Mutat. Res,*** 600: 37-45 (2006).

Nyholm, S., Mann, G.J: Johansson, A.G:, Bergeron, R.J., Graslund, A., Thelander, L., " Role of ribonucleotide reductase in inhibition of mammalian cell growth by potent iron chelators", ***J. Biol. Chem.,*** 268(35): 26200-26205 (1993).

Offer, T., Bhagat, A., Lal, A., Atanma, W., Singer, S.T., Vichinsky, P.E., Kuypers, F.A., Ames, N.B., " Measuring chromosome breaks in patients with thalassemia ", ***Annals New York Academy of Scıences***, 1054: 439-444 (2005).

Orkin, S.H., Nathan, D.G., Heamatology of Infancy and Childhood, 5th. Edition, ***W.B. Saunders Company Press,*** Phildelphia, 811-886 (1998).

Ostling, O., Johanson, K.J., "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells", ***Biochem. Bioph. Res. Co.***, 123 (1): 291-298 (1984).

Özkınay, F., "Talasemilerin moleküler tanı yöntemleri", ***Türkiye Klinikleri J. Hem. Onc.,*** 3(1): 35-40 (2010).

Park, J.H., Park, E., " Influence of iron-overload on DNA damage and its repair in human leukocytes in vitro", ***Mutat. Res.,*** 718: 56-61 (2011).

Parry, J.M., Kirsch-Volders, M., "Special issue on in vitro MN trial", ***Mutat. Res.***, 702: 132-134 (2010).

Perry, P.E., Wolff, S., "New giemsa method for the differential staining of sister chromatids", ***Nature***, 251 (5471): 156-158 (1974).

Perry, P., Evans, H.J., "Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange", ***Nature***, 258 (5531): 121-125 (1975).

Piga, A., Gaglioti, C., Fogliacco, E., Tricta, F., "Comparative effects of deferipronee and deferoxamine on survival and cardiac disease in patients with thalassemia major: a retrospective analysis" ***Haematologica,*** 88:489-496 (2003)

Pra, D, Franke SI, Giulian R, Yoneama ML, Dias JF, Erdtmann B, et al., "Genotoxicity and mutagenicity of iron and copper in mice", ***Biometals,*** 21: 289-297 (2008).

Ridolfi, F., "Talasemi ve hemoglobinopatilerde genetik danışma, Talasemi ve hemoglobinopatiler tanı ve tedavi", Çeviri editörleri, Canatan, D., Aydınok, Y., ***Antalya Retma Matbaa Ltd.,*** 67-72 (2007)

Poli, P., Buschini, A., Restivo, M., Ficarelli, A., Casson, F., Ferrero, I., Rossi, C., "Comet assay application in environmental monitoring: DNA damage in human leukocytes and plant cells in comparison with bakterial and yeast tests", ***Mutagenesis***, 14 (6): 547-555 (1999).

Ruf A. A., Jerwood,D., Webb J., Anderson D., "Sensitivity of different thalassaemia genotypes to food mutagens in the comet assay", ***Teratog. Carcinog. Mutagen.,*** 2: 83-91 (2003a).

Ruf A. A., Webb J., Anderson D., "Modulation by flavonoids of the effects of a food mutagen in different thalassemia genotypes in the Comet assay", ***Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis Supplement,*** 2: 93-102 (2003b).

Sangün, Ö., Dündar, B., "Talasemide endokrin komplikasyonlar ve yönetimi", ***Türkiye Klinikleri J. Hem. Onc.,*** 3 (1): 85-95 (2010).

Savage, J.R.K., "Update on target theory as applied to chromosomal aberrations", ***Env. Mol . Mutagen.,*** 22 (4): 198-207 (1993).

Shalev, O., Repka, T., Goldfarb, A., Grinberg, L., Abrahamov, A., Olivier, N.F., Rachmilewitz, E.A., Hebbel, R.P., " Deferipronee (L1) chelates pathologic iron deposits from membranes of ınтact thalassemic and sickle red blood cells both in vitro and in vivo", ***Blood,*** 86 (5): 2008-2013 (1995).

Silva, A.E., Manzato, A:J., Varella-Garcia, M., " Sister-chromatid exchanges inbeta-thalassaemic patients under conditions of in vivo and in vitro depletion of folic acid", ***Mutat. Res.,*** 282 (3): 231-217 (1992).

Simonart, T., Degraef, C., Andrei, G., Mosselmans, R., Hermans, P., Van Vooren, J.P., Noel, J.C., Boelaert, J.R., Snoeck, R., Heenen, M.," Iron chelators inhibit the growth and induce the apoptosis of kaposi sarcoma cells and of their putative endothelial precursors", ***J. Invest. Dermatol.,*** 115: 893-900 (2000).

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., "A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells", ***Exp. Cell Res.,*** 175: 184-191 (1988).

Singh N.P., Danner, D.B., Tice, R.R., Brant, L., Schneider, E.L., " DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes", ***Mutat. Res.***, 237 (3-4): 123-130 (1990).

Speit, G., Haupter, S., "On the mechanism of differential Giemsa staining of Bromodeoxyuridine substitute chromosomes. II. Differences between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns", ***Hum. Genet.,*** 70: 126–129 (1985).

Söker, M., " Beta talasemili çocuklarda oksidan-antioksidan sistem ve lenfosit DNA hasarı", Yan Dal Uzmanlık Tezi, ***Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Hematologji Bilim Dalı***, Şanlıurfa, 54-65 (2008).

Sönmezoğlu, M., "Talasemide enfeksiyonlar ve yönetimi", ***Türkiye Klinikleri J. Hem. Onc.,*** 3 (1): 96-101 (2010).

Stankiewicz, J.M. and Brass, S.D.,"Role of iron in neurotoxicity: a cause for concern in the elderly***?", Curr. Opinion Clin. Nutr. Metabolic Care***, 12: 22-29 (2009).

Şahin, G. T., "Talasemi major tanısı ile takip edilen hastalarda oral demir şelatörü olarak kullanılan Deferasiroks ile Desferroksamin'in etki ve yan etkilerinin karşılaştırılması", Uzmanlık Tezi, ***İstanbul Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi,*** İstanbul, 58-69 (2011).

Terradas, M., Martin, M., Tusell, L., Genesca, A., " Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell ?", ", ***Mutat. Res.***, 705: 60-67 (2010).

Thomas, E.D., Buckner, C.D., Sanders, J.e., Papayannopoulou, T., Borgna-Pignatti, C., De Stefano, P., et al., "Marrow transplantation for thalassaemia", ***Lancet***, 2: 227-229 (1982).

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., "Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing", ***Environ. Mol. Mutagen.***, 35 (3): 206–221 (2000).

Topaktaş, M., Speit, G., "Sister chromatid exchange (SCE) testinin mutajenite ve kanserojenitenin belirlenmesinde kullanılması", ***Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi,*** 5 (1,2,3): 73-84 (1990).

Tucker, J.D., Preston, R.J., "Chromosome aberations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchange and cancer risk assesment", ***Mutat. Res.***, 365 (1-3): 147-159 (1996).

Uysal, Z., Cin, Ş., Arcasoy, A, Akar, N., " Interferon treatment of hepatitis B and C in β-thalassemia", ***Pediatr. Hematol. Oncol.,***12: 87-89 (1995).

Uysal, Z., "Thalasemiada tedavi*",*.Ankara ***Thalasemia Derneği Yayını****, A.Ü. Rektörlük Basımevi, 25- 33 (1994).*

Ünal, Ş., "Beta talasemi Kliniği ve Tanısı", ***Türkiye Klinikleri .J Hem. On.c,*** 3 (1): 14-17 (2010).

Valverde , M., Rojas, E., "Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay", ***Mutat. Res.,*** 681 (1): 93-109 (2009).

Vangent, D.C., Hoeijmakers J.H., ve Kanaar, R., " Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection", ***Nat. Rev. Genet.,*** 2: 196-206 (2001).

Vergin, C., "Anormal Hemoglobinler", ***Türkiye Klinikleri J. Hem. Onc.,*** 3 (1): 23-30 (2010).

Whittaker, P., Seifried, H.E., San, R.H, Clarke, J.J, Dunkel, V.C., " Genotoxicity of iron chelators in L5178Y Mouse lymphoma cells" ***Environ. Mol. Mutagen.***, 38(4): 347-356 (2001).

Whiting, R.F., Wei, L., Stich, F.H., "Chromosome-damaging activity of ferritin and ıts relation to chelation and reduction of iron", ***Cancer Res.,*** 41: 1628-1636 (1981).

Wilsom III, D.M., Thompson, L. H., " Molecular mechanisms of sister- chromatid exchange ", ***Mutat Res***., 616: 11-23 (2007).

Wolf, S., "Chromosomes in the assesmant of the effects of low levels of genotoxic agents" ***Hum. Exp. Toxicol.***, 17: 625-632 (1998).

Yaprak, I., "Beta Talasemi Tanı Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar", ***SSK Tepecik Hastanesi Dergisi,*** 1356-58 (2004).

Yasumoto, E., Nakano, K., Nakayachi, T., Morshed, S.R., Hashimoto, K., Kikuchi, H., Nishikawa, H., Kawase, M., Sakagami, H.,"Cytotoxic activity of deferipronee, maltol and related hydroxyketones against human tumor cell lines", ***Anticancer Res.***, 24: 755-762 (2004).

Yılmaz, S., "Bazı gıda katkı maddelerinin genotoksik etkileri", Doktora Tezi, ***Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, 36-98 (2008).

Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H., "Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes", ***Mutat. Res.,*** 604 (1-2): 53-59 (2006).

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı adı:	GÖKÇE Hafize
Uyruğu:	T. C
Doğum tarihi ve yeri:	Aralık 1969, Şavşat
Medeni hali:	Bekar
email:	hafizegokce@yahoo.com

Eğitim:

Derece	**Eğitim Birimi**	**Mezuniyet tarihi**
Yüksek Lisans	GÜ / Fen Bilimleri Enstitüsü	2000
Lisans	GÜ/ Biyoloji Bölümü	1996
Lise	AÜ Sağlık Bilimleri Kol	1988

İş Deneyimi

Yıl	**Yer**	**Görev**
1996 - 2011	Ankara Üniversitesi	Biyolog

Yabancı Dil

İngilizce

SCI TARAFINDAN TARANAN BİLİMSEL DERGİLERDE YAPILAN YAYINLAR

1. Akar, N., Suskan, E., Gökçe, H., "Factor V 1691 G – A mutation and high factor VIII levels in a patient with intracardiac thrombosis", **European Journal of Pediatrics**, 159: 941-941 (2000).

2. Atalay, S., Akar, N., Tutar, H.E., Gökçe, H., Uçar, T., "Is high levels of factor VIII a possible risk factor for intracardiac Thrombosis?", **International Journal of Cardiology**, 81: 289- 290 (2001).

3. Akar, N., Duman, T., Gökçe, H., High factor antigen levels are not associated with factor FVIII gene polymorphism, **Turkish Journal of Haematology,** 19 (3): 399-400 (2002).

4. Akar, N., Gökçe, H., "High levels of f VIII and f IX ın a pediatrİc patient with retinal artery occlusion ", **Pediatric Hematology and Oncology,** 19(8): 593-595 (2002).

5. Akar, N., Gökçe, H., " Red blood cell indexes in patients in patients with hereditary spherocytosis and beta-thalassemia combination**"** **Pediatric Hematology and Oncology,** 19(8): 569-573 (2002).

6. Kürekci, A. E., Gökce, H., and Akar, N., "Factor VIII levels in children with thrombosis", **Pediatrics International**, 45: 159-162 (2003).

7. Tavil, B., Sipahi, T., Gökçe, H., Akar, N.," Effect of twice weekly us daily iron treatment in Turkish children with iron deficiency anemia" **Pediatric Hematology and Oncology,** 20 (4): 319-326 (2003).

8. Ulukol B., MS, Tezcan S., Phd, Akar N.,, , Gokçe, H., and Cin, Ş., "Evaluation of erythropoiesis by serum transferin receptor and ferritin in infants aged 0–6 months", **Pediatric Hematology and Oncology,** 21: 293-305 (2004).

9. Uğur, H., Cin, Ş., Deda, G., Gökçe, H., Elhan, H.A., and Akar, N., "Serum soluble transferin receptor is a valiable diagnostic tool in iron deficiency of breath – holding spells", **Pediatric Hematology and Oncology**, 22: 711- 716 (2005).

YURT İÇİ HAKEMLİ DERGİLERDEKİ YAYINLAR

1. Örün, E., Yalçınkaya F., Nuray Ö., Akar N., Gökçe H., 2002, Ailevi akdeniz ateşi (FMF) hastalığında akut faz yanıtı ile tümör nekrozis faktör_α, interlökin-8 ve interlökin-6 düzeylerinin değerlendirilmesi, **Ankara Universitesi Tıp Fakültesi Mecmuası**, 55, (2), 123 – 128 (2002).

ULUSLARARASI KONGRELER

1. Kürekçi E., Gökce H., and Akar N.," Effect of Factor VIII Levels in Pediatric" **Thrombosis 8th World Congress of the International Society of Hematology,** Toronto, Canada, August 26 to 30 (2000).

2. Gökçe H., Akar N., "High levels of FVIII and FIX ın a pediatric patient with retinal artery occlusion". **17th Internatıonal congress on thrombosis**, Bologna, Italy, October 26-30, (2002).

3. Gökçe H., Yüzbaşıoğlu D., Ünal F., İleri T. And Uysal Z., "Determination of possıble genetic damage in thalassaemia major patients using sister chromatid Exchange", **40 th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society,** Oslo, Norvay, Sept 15-18 (2010).

ULUSAL KONGRELER

1. Çulha, K.V., Gökçe, H., Uzunali, Ö., Akar, N., "Demir eksikliği ve enfeksiyonu olan hasta gruplarında demir- bakır metabolizması arasındaki ilişki", ***Türk Pediatri Kurumu XXXV. Ulusal Pediatri Kongresi,*** Ankara, Türkiye, 19-23 Mayıs (1999).

2. Gökçe, H., Yüzbaşıoğlu, D., Taner, G., Ünal, F.," Comet testinde insan periferal kan lenfositlerinin dondurularak kullanımı için bir metod denemesi", ***20. Ulusal Biyoloji Kongresi***, Denizli, Türkiye, 21-25 Haziran (2010).