

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
HAYDARPAŞA NUMUNE
EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI KLİNİĞİ
KLİNİK ŞEFİ: Doç. Dr. Ömer CERAN

SİGARA DUMANINA MARUZ KALAN PASİF
İÇİCİ DURUMUNDAKİ ÇOCUKLARDA
DNA HASARININ ARAŞTIRILMASI

Dr. Narin AKICI

(UZMANLIK TEZİ)

DANIŞMAN: UZM. DR. TAMAY ÖZKOZACI

İSTANBUL
HAZİRAN 2008

i

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesindeki Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanlık eğitim süresince bizlere sundukları verimli çalışma ortamı nedeniyle, Değerli Başhekimlerimiz Sn.Prof.Dr. Suphi Acar, Sn.Doç.Dr. Mücahit Görgeç, Sn.Prof.Dr. Yusuf Özertürk ve Sn.Doç.Dr. Mehmet Sökmen'e

Uzmanlık eğitimim süresince kendisinden mesleki ve bilimsel açıdan çok şeyler öğrendiğim ve birlikte çalışmaktan onur duyduğum, hocam Sn. Doç. Dr. Ömer Ceran'a,

Tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen; beşeri, mesleki ve bilimsel açıdan çok şeyler öğrendiğim tez danışmanım sevgili Uzm. Dr. Tamay Özkozacı başta olmak üzere, mesleki bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım tüm uzmanlarıma,

Çalışmamın her aşamasında kendilerinden çok şey öğrendiğim, benden sevgi, destek ve değerli bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Marmara Üniversitesi'nden başta Sn. Prof. Dr. Semra Şardaş olmak üzere Eczacılık Fakültesi Toksikoloji Anabilim Dalının değerli öğretim üye ve yardımcılarından Prof. Dr. Gülden Z. Omurtag, Dr. Diren Beyoğlu, Uzm. Ecz. Ayfer Tozan'a ve anabilim dalının diğer çalışanlarına, Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi eşim Doç. Dr. Ahmet Akıcı'ya,

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

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

Yoğun çalışma temposu içerisinde kendilerine yeterli zamanı bazen ayıramadığımı düşündüğüm, başta biricik oğlum Ege Akıcı olmak üzere, aileme.....

içtenlikle TEŞEKKÜR ederim.

KISALTMALAR

SCE: Sister Chromatid Exchange (*Kardeş kromatid değişimi*)

CA: Chromosomal Aberration (Kromozomal aberasyon)

ETS: Environmental tobacco smoke (Çevresel tütün dumanı)

mean tail % DNA: Ortalama olarak kuyruktaki DNA yüzdesi

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Sigara Dumanına Maruz Kalma	4
2.2. Tütün ve Nikotin Hakkında Genel Bilgiler	6
2.3. Sigaranın Toksik Etkileri	7
2.4. Pasif Sigara İçiciliği ve Çocuklarda Oluşturduğu Riskleri	8
2.5. Genotoksik Etkiler	10
2.6. Kromozomal Aberasyon	12
2.7. Comet Tekniği	13
2.8. Araştırmanın Genel Bilgiler Işığında Öngörüsü	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1. Gönüllülerin Niteliği ve Sayıları	16
3.2. Genetik Analizlerin Ayrıntıları	18
3.2.1. Kromozomal Aberasyon Yönetminin Ayrıntıları	18
3.2.1.1. Yöntemde Kullanılan Aletler	18
3.2.1.2. Yöntemde Kullanılan Kimyasal Maddeler	18
3.2.1.3. Yöntemde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	19
3.2.2. Yöntemin Uygulanışı	19
3.2.2.1. Kromozom Kültürünün Hazırlanması	19
3.2.2.2. Lamaların Boyanması ve Değerlendirilmesi	20
3.2.3. Comet Yönetminin Ayrıntıları	21
3.2.3.1. Yöntemde Kullanılan Aletler	21
3.2.3.2. Yöntemde Kullanılan Kimyasal Maddeler	22
3.2.3.3. Yöntemde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması	22

	<u>Sayfa</u>
3.2.3.4. Periferel Kan Lenfositlerinde Comet Yöntemi Uygulanışı	24
3.2.4. Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) Yönetminin Ayrıntıları	25
3.3. Verilerin Değerlendirilmesi	27
3.4. Araştırmanın Sınırlılıkları	27
4. BULGULAR	28
4.1. Katılımcılara Uygulanan Anket Verilerinin Sonuçları	28
4.2. Periferel Kan Lenfositlerinde Kromozomal Aberasyon ve Comet Analizi Sonuçları	31
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇLAR	47
7. ÖZET	48
8. EKLER	50
8.1. Sigara İçen Grup İçin Ebeveyn ve Çocuk Anketi	50
8.2. Sigara İçmeyen Grup İçin Ebeveyn ve Çocuk Anketi	53
9. KAYNAKLAR	56

TABLULARIN DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1: Araştırmaya katılan bireylere uygulanan anket sonuçlarının “pasif içici” ve kontrol grubunda yer alanlara göre karşılaştırılması	30
Tablo 2: Sigara içen aile grubunda yer alan ve “pasif içici” olarak adlandırılan çocukların periferal kan lenfositlerinin kromozomal aberasyon analizinde <i>kromozom kırığı, kromatid kırığı, kromozom açıklığı ve kromatid açıklığı</i> bakımından incelenmesi	31
Tablo 3: Sigara içmeyen aile grubunda yer alan çocukların periferal kan lenfositlerinin kromozomal aberasyon analizinde kromozom kırığı, kromatid kırığı, kromozom açıklığı ve kromatid açıklığı bakımından incelenmesi	32
Tablo 4: Sigara içen aile grubundaki (“pasif içici” konumunda) 5 çocuk ve Sigara içmeyen aile grubunda yer alan 5 çocuğun periferal kan lenfositlerinin comet analizinde % DNA hasarı ortalamalarının karşılaştırılması	33

ŞEKİLLERİN DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1:Nikotinin kimyasal yapısı	7
Şekil 2: Araştırma tasarımı	17
Şekil 3: Comet tekniğinde “Comet Görüntü İşleme ve Analiz Programı Sistemi” (comet image analyse system) değerlendirmesinin fotografik sunumu.	25
Şekil 4: Sigara içen aile grubunda yer alan ve “pasif içici” olarak adlandırılan bir çocuğun kromozomal aberasyon analizi sonucu elde edilen metafaz kromozomlarının mikroskopik görünümü. 34	34
Şekil 5: Sigara içen aile grubunda yer alan ve “pasif içici” olarak adlandırılan bir çocuğun comet analizi sonucunun mikroskopik görünümü.	34
Şekil 6: Sigara içmeyen aile grubunda yer alan bir çocuğun kromozomal aberasyon analizi sonucu elde edilen metafaz kromozomlarının mikroskopik görünümü.	36
Şekil 5: Sigara içmeyen aile grubunda yer alan bir çocuğun comet analizi sonucunun mikroskopik görünümü.	36

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sigara ve diğer tütün mamullerinin kanser, kardiyovasküler sistem ve solunum sistemi hastalıkları başta olmak üzere çok çeşitli sağlık sorunlarına yol açtığı veya bu sorunların ortaya çıkmasını kolaylaştırıcı olduğu, kişilerin bu maruziyeti sürdürmeleri halinde ise, ortaya çıkan sağlık sorunlarını ağırlaştırmada rol oynadığı kanıtlanmıştır [1-6]. Sigaranın sayılan birçok zararına ilave olarak, son yıllarda genotoksisiteye yol açması önemli tartışma konularından birisi olarak kabul edilmektedir. Özellikle sigaraya bağlı birçok sorunun oluşumu ve klinik seyri ile genotoksisite arasındaki kuvvetli ilişkiye değinilmektedir [4,6-12].

Çoğu ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de sigaraya aktif ve pasif maruziyetin engellenmesi veya azaltılması için çeşitli girişimler sürdürülmektedir. Ne yazık ki, toplumu sigara kullanımı alışkanlığından uzak tutmak için yapılan bu eğitim, yasal düzenleme, vb. faaliyetlere karşın, Türkiye’de sigara içenlerin oranının hala endişe verici boyutlarda olduğu görülmektedir. Örneğin 1990 yılların başından beri yürütülen bir çalışmanın verilerine göre erişkin erkeklerde sigara içenlerin oranının % 59.4, erişkin yaş grubu kadınlarda ise bu oranın %18.9 olduğu rapor edilmiştir [13]. Bir diğer çalışmada 20 yaş ve üzeri nüfusta yapılmış bir diabetes mellitus çalışmasında da erkeklerde % 50.9 oranında, kadınlarda ise % 10.9 oranında sigara içildiği ortaya koyulmuştur [14]. Bu konuda güncel ve en fazla endişe verici rapor ise Dünya Sağlık Örgütü’ne (DSÖ) aittir. DSÖ’nün yayımladığı “Küresel Sigara Salgını-2008” adlı raporunda, Türkiye’nin dünyada sigaranın en fazla içildiği 10 ülke arasına girdiği bildirilmektedir [15]. Bu olumsuz tablonun detayları incelendiğinde, sigara vb. tütün mamullerini kullananların, bu alışkanlıklarını çocuklarının da yaşadığı ve en fazla vakit

geçirdikleri ev ortamında da sürdürüyor olmaları, bu konudaki var olan endişeleri daha da artırmaktadır. Nitekim, sigara başta olmak üzere tütün mamulleri, sadece kullanıcısının sağlığını tehdit etmekle kalmayıp, aynı zamanda bu tür maddeleri kullananlarla aynı mekanı paylaşan ve pasif içici durumunda kalan kişilerin sağlığını da önemli ölçüde tehdit etmektedir. Bu tehdidin muhataplarının başında da bu alışkanlığa sahip kişilerin yakın aile bireyleri, özellikle de çocukları gelmektedir [2,3,8,16-22].

Çocuklar, fizyolojik ve psikolojik gelişim süreçlerine paralel olarak çevresel kontaminantlara maruziyetten kolayca etkilenebilen grupların başında gelmektedirler. Dolayısıyla, bu riskli gruptaki bireyleri söz konusu kontaminantlara maruz kalmaktan olabildiğince koruyabilmek özel önem arz etmektedir. Ebeveynleri sigara içen çocukların, solunum yolu hastalıkları başta olmak üzere akut ve kronik çok sayıda hastalığa yakalanma risklerinin hayli arttığı bilinmektedir [3,16,20-25].

Çok önemli bir çevresel kontaminant olan sigara ve diğer tütün mamullerinin yol açabileceği potansiyel genotoksik etki günümüzde çok değişik perspektiflerden araştırılmaya çalışılmaktadır. Örneğin, çocuklarda olası riske işaret eden epidemiyolojik araştırmaların sonuçları, öyküsünde sigara içme ve akciğer kanseri bulunan ebeveynlerin çocuklarında başta nazal kanser olmak üzere, kanser gelişme riskinin artmış olduğunu bildirmektedir [26]. Bununla birlikte pasif sigara içiciliğinin çocukların kromozomları üzerindeki etkisine dair somut bilgiler henüz yeterli oranda bulunmamaktadır. Dolayısıyla, sigara dumanına maruz kalan pasif içici konumdaki çocuklarda oluşabilecek mutajenik etkinin araştırılması büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada söz konusu mutajenik riskin oluşup oluşmadığının tespitine yönelik olarak;

- Pasif içici durumundaki çocuklar ile ev ortamında ebeveynleri sigara içmeyen çocukların DNA hasarı bakımından karşılaştırılması amaçlandı.

- Ayrıca, çalışmada ikincil amaç olarak da, çocuklarda çevresel kontaminantlara bağlı genotoksisite riskinin tespiti için gelecekte yapılabilecek başka çalışmalara yardımcı olması için kromozomal aberasyon tekniği ile comet tekniğinin duyarlılıklarının karşılaştırılması planlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Sigara Dumanına Maruz Kalma*

Çevremizde insan sağlığı bakımından tehlike oluşturan kimyasal maddelerin sayısı her geçen gün artmaktadır. Çeşitli farmasötik ürünler, gıdalarda ve temizlik malzemelerinde bulunan kimyasal maddeler, pestisitler, petrol ürünleri, hava kirliliği ve sigara bunlardan bazılarıdır. Genelde oral, cilt yada solunum yoluyla maruz kalınan bu tür toksik maddelerin yol açtığı genetik bozukluklar ve hastalıklar, ilgili toksik etkene maruziyetin artışına paralel olarak artmaktadır [27]. Mutajen maddelerin bu tür sorunların oluşumuna katkısı ve aralarındaki ilişki günümüzde daha iyi bilinmektedir. Gündelik hayatta sürekli karşı karşıya geldiğimiz böylesi etkiye sahip maddelerin insanlarda oluşturabilecekleri mutajenik etkinin kontrolü büyük önem taşımaktadır [27]. Sayılan toksik etkenler arasında diğerlerine göre sigara, birçok özelliği bakımından farklılık arz eder. İçerdiği toksik maddelerin miktar ve çeşitliliği, kullanım sıklık ve süresinin yol açtığı sorunlarla ilişkisi, bu sorunların halk sağlığını tehdit eden boyutları, yaptığı bağımlılık türü ve tedavi alternatifleri, önlenebilir sık ölüm nedenlerinin arasında yer alması, kullanıcısı dışındakileri de tehdit eden toksik etkileri gibi birçok bakımdan hakkında çok sayıda ayrıntılı incelemeler yapılmış, yorumlarda bulunulmuştur [1,9,23,25,28-31].

Dünyada her yıl 4 milyon insanın sigaradan hayatını kaybettiği ve gerekli önlemlerin alınmadığı takdirde bu sayının 20 yıl içinde 10 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Ayrıca, dünyada günde 11 bin kişinin sigaranın neden olduğu hastalıklardan ötürü öldüğü bildirilmektedir [32,33]. Sigara dumanı, içilen ortamda içen kişi ile birlikte bulunan herkesi etkileyen bir çevre kirleticisidir. Bütün bu nedenlerden

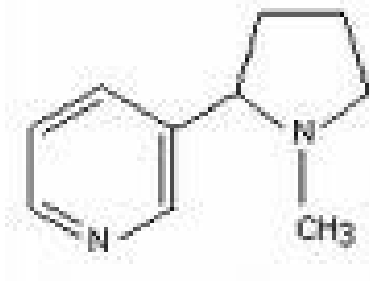
ötürü, içinde Türkiye'nin de bulunduğu çok sayıda ülkede sigara dumanına maruziyeti önlemek amacıyla ve sigara tüketimini azaltmak / engellemek amacıyla bir takım yasal düzenlemelere gidilmiştir. Örneğin, ülkemizde 4207 Sayılı Kanun gereğince, "kapalı mekanlarda tütün ve tütün mamullerinin içilmesi yasaklanmış olup, 5326 sayılı Kabahatler Kanunu'nun 39. maddesinde ise kamu hizmet binalarının kapalı alanlarında tütün mamulü tüketen kişiye idari para cezası verilmesi" hükmüne bağlanmıştır [34].Gün geçtikçe bu konudaki sınırlamaların boyutu da giderek artmaktadır. Söz konusu diğer düzenlemeler ile birlikte, 4207 Sayılı Kanunun kapsamı daha da genişletilerek , "Okul, dersane ve kursların açık alanları ile lokanta, kahvehane, kafeterya ve birahane gibi yerlerde sigara içimini yasaklayan "5727 Sayılı Tütün ve Tütün Mamullerinin Zararlarının Önlenmesine Dair Kanunda Değişiklik Yapılması Hakkında Kanun" Resmi Gazete'nin 19 Ocak 2008 sayısında yayımlanmıştır. Kanunun, yayım tarihinden itibaren 4 ay sonra yürürlüğe girmesi; lokanta, kahvehane, kafeterya gibi yerlerdeki sigara yasağının uygulanmasının ise 18 ay sonra başlaması planlanmıştır [35]. Bu olumlu gelişmelere rağmen, sigara kullananların sigara içmeye başlama yaşının giderek düşmesi, ev ortamında çocuklarla daha fazla bir arada oldukları bilinen kadınlarda sigara kullanma oranlarının artması, gelişmiş ülkelerde getirilen çok sıkı kısıtlayıcı düzenlemelerle pazar payı daralan sigara üreticilerinin kaybettikleri pazarları geliştirmekte olan ülkelere kaydırmaları gibi olumsuz faktörler, sigaraya bağlı sorunların risk grubunda yer alan populasyonlar başta olmak üzere, insan sağlığını tehdit etmeye devam edeceğini göstermektedir [2,4,5,32,33]. Bütün bu gelişmeler birlikte ele alındığında, çocukların sigaraya bağlı sorunlardan etkilenmemesi için çok daha dikkatli olmamızı gerektirmektedir.

2.2. Tütün ve Nikotin Hakkında Genel Bilgiler

Kronik tütün maruziyeti, kardiyovasküler sistem hastalıkları, serebrovasküler sistem hastalıkları ve çok değişik kanserler başta olmak üzere çok ciddi sorunlara yol açmaktadır. Ateroskleroz, koroner stenoz, miyokard infarktüsü, inme, pıhtılaşma bozuklukları, kronik obstrüktif akciğer hastalıkları bunların başında gelmektedir. Bu sorunların oluşumunda nikotinin rolü çok tartışılrsa da, atfedilen risk tek başına nikotine bağlı olmayıp, sigara ve diğer tütün mamullerinin bileşimi ve tüketim sırasındaki çok çeşitli faktörlerin de bu olumsuz süreçte katkıları bulunmaktadır [1,3-6,13].

Sigara dumanının bileşimi, sigaranın hammaddesi olan tütünün bileşimiyle aynı değildir. Bu, tütünün yanması sırasında içerdiği kimyasalların kısmen yada tamamıyla başka bileşiklere dönüşmesi ile ilişkilidir. Sigara dumanının bileşimi, sigaranın filtreli olup olmamasına, sarıldığı kağıdın hammadde özelliklerine, kağıt ve tütünün nem derecesine, sarılma tekniğine, nefes çekme sıklığına, derinliğine, yanma hızı ve sıcaklığına ve benzeri çok sayıda faktöre bağlı olarak değişir. Maruziyetin miktar ve süresi bu tür ayrıntıların önemini etkileyebilir. Sigara yanması ile açığa çıkan 4000'in üzerindeki kimyasal bileşik ortama karışmaktadır. Sigara dumanı birçok bakımdan iyi çalışan bir aerosol olarak kabul edilebilir. Nikotin; karbonmonoksit; katran fazındaki karsinojenik maddeler ve bu fazdaki iritanlar olmak üzere sigara dumanının 4 önemli bileşeni toksisitesinde ön plandadır [2,4-6,27].

Nikotin, *Nicotiana tabacum* bitkisinin tütün olarak bilinen kurutulmuş yapraklarından üretilen bir çeşit alkaloiddir. İlk kez Amerika kıtasında yetiştirilmekle birlikte, 16. yüzyılda Avrupa kıtasına ve daha sonra dünya üzerindeki diğer coğrafyalara yayılmıştır. Sigara için kullanılan tütün % 0.5- 3 oranında nikotin ihtiva eder. Kimyasal yapısı; N- metil pirolidin halkası ve piridin halkasından oluşur [2,4,6].



Şekil 1: Nikotinin kimyasal yapısı

Nikotin perkütan yoldan hızla emilebilir, oral yoldan uygulanmasını takiben de solunum yollarından ve bukkal membrandan emilme özelliğine sahiptir. Yaygın kullanılış şekli sigara içimi olmakla beraber, çiğneme yada toz halinde enfiye olarak da tüketilebilmektedir. Tek bir sigara içimini takiben 25-50 ng/mL arasında plazma da maksimum düzeylerine ulaşabilir. Ardından doku dağılımına bağlı plazma düzeyinde hızlı bir düşme sonrası vücuttan atılımı gerçekleşir. Oksidasyon yoluyla metabolize edilir [2,5,6].

2.3. Sigaranın Toksik Etkileri

Sigara dumanında nikotin, nem ve karbonmonoksit çıktıktan sonra geri kalan maddelerin tümünün belirgin karsinojenik etkileri vardır. Dumanın katran fazı olarak adlandırılırlar ve içeriğinde aromatik nitrozaminler, aromatik aminler, polisiklik hidrokarbonlar gibi çok sayıda bileşim bulunur. Bu tür maddelerin içerisinde kanserojenik etkisinin belirgin olduğu iyi bilineni, sigara üretimi aşamasında ve içilmesi sırasında yanma sonucu oluştuğu düşünülen ve tütün-spesifik-N nitrozaminler olarak adlandırılan N-nitrozonornikotin ve metilnitrozamin piridil butanon gibi bileşimlerdir. Bunların dışında da kanserojenik etkileri çok iyi bilinen ve sigara dumanında bulunan

başka maddelere örnek olarak radyoaktif polonyum 210, siyanür, nikel, arsenik, akrolein, fenol bileşikleri gibi daha bir çok maddeyi saymak mümkündür [2,4,6].

Sigara başta olmak üzere pipo, puro gibi tütün mamullerinin sistemik veya lokal uzun süreli etkilerinin neden olduğu hastalıklar ve sağlık sorunları iyi bilinmektedir. Sigara içme alışkanlığı, birçok ülkede ölüme sebebiyet veren hastalıklara yol açan en yaygın toksikolojik problem olarak kabul edilmektedir. Örneğin akciğer kanserinin sigara içenlerde içmeyenlere oranla çok daha fazla görülebildiği iyi bilinmektedir [1,4,32,36]. Sigara içmenin sadece akciğer kanserine değil, aynı zamanda oral ve nazal boşluk, özofagus, gırtlak, yutak, pankreas, karaciğer, böbrek, mide, üriner sistem ve serviks kanserinde de rolü olduğu bildirilmiştir [36].

2.4. Pasif Sigara İçiciliği ve Çocuklarda Oluşturduğu Riskleri

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

şiddette olmakla beraber, benzer kronik sağlık sorunlarına yol açabilir [1-3,6,16,17,20-24,27,37]. Pasif içiciliğin akciğer kanseri ve iskemik kalp hastalığı, bebek ve çocuklarda astım oluşumu, akciğer fonksiyonlarında azalma, pnömoni, bronşit, otitis media, gibi solunum yolu hastalıkları ve ani bebek ölümleri görülmesinde risk artışına yol açması gibi sorunları güncel tartışma konuları arasında yer almaktadır [1-3,6,16,17,20-24,26,27,37].

Sigara içenlerin oranının her geçen gün arttığı ülkemizde bebek ve çocukların büyük oranda pasif içici konumunda oldukları düşünülmektedir. Sigara dumanına maruz bırakılarak pasif içici durumunda bırakılan çocuklarda, kulak ve boğaz enfeksiyonları, bronşit ve pnömoninin, ani bebek ölümlerinin, sıklıkla görüldüğü bilinmektedir [4,5,16,21,23,25,37,38].

Pasif içicilik konusunda en ileri önlemleri alan ülkelerin başında Amerika Birleşik Devletleri (ABD) gelmektedir. Nitekim bu ülke Sağlık Bakanlığı'na bağlı çalışan Ulusal Toksikoloji Programı Kurumu 2002 yılında yayımlamış olduğu 10. Ulusal Raporunda söz konusu "ikinci el dumanın bile kanserojen olduğunu" bildirmiştir. Bu karara istinaden, kapalı yerlerde sigara içilmemesi yönünde düzenlemelerin yolu açılmıştır [39]. Bu tür kısıtlamaların günümüzde sadece ABD ile sınırlı kalmadığı, Avrupa ülkeleri başta olmak üzere çok sayıda ülkede uygulanmaya başlandığı, yukarıda da değinildiği gibi ülkemizde de bu konuda oldukça umut vaad eden gelişmelerin yaşandığı söylenebilir [1,2,16,20]. Kapalı ortamlarda sigara ve benzeri tütün mamullerinin içilmemesi ile ilgili yasal düzenlemelerin ülkemizde de uzun yıllara önce hayata geçirildiğinin de altını çizmek gereklidir [34,35,40].

Sigara içen anne/baba ya da diğer ebeveynlerin pasif içici durumunda olan çocuklarında çeşitli hastalık ve sağlık sorunları ortaya çıkmaktadır [3]. Bu sağlık

sorunlarının yanı sıra, sigara içmenin ve pasif içiciliğin insan kromozomları üzerine etkisi ile ilgili yapılan çalışmalar da bulunmaktadır [11,12,16,29,30,41-51].

2.5. Genotoksik Etkiler

Çevremizdeki çeşitli kimyasal maddeler, çeşitli canlılardaki hücre DNA'sının yapısını bozarak mutasyona bağlı karsinojen etkilere neden olmaktadır. Kimyasal ajanların ya da radyasyonun gamet veya somatik hücrelerdeki DNA üzerinde oluşturduğu kalıcı değişimlere genel olarak *mutasyon* adı verilir. Mutajenez mekanizmasının aydınlatılması ve mutajenlerin saptanması için çeşitli test sistemlerinin geliştirilmesi ve mutajenezin insanlar için oluşturduğu kalıtsal hastalık ve kanser riskinin azaltılması için yapılan çalışmalar toksikoloji'nin en önemli çalışma alanlarından birini oluşturmaktadır. DNA'nın onarım sürecinin tam olarak sağlanamaması, kanser oluşumunda çok önemli bir faktördür. Bilhassa somatik hücrelerdeki mutasyonların kanser oluşumuna zemin hazırlayıcı rollerinin bulunması, genotoksisitenin klinik önemini artırmaktadır [1,12,28,29,31,36,45-48,51-55].

Genotoksisitenin yol açtığı mutasyonları makrolezyonlar (sayısal ve yapısal olarak) ve mikrolezyonlar (çerçeve kayması ve baz çifti değişimi) şeklinde sınıflandırmak mümkündür. Kromozomlarda yapısal değişikliklere neden olan etkenlere genel olarak klastojenler adı verilir [51,52,56].

Mutajenlerin ve karsinojenlerin saptanmasında geliştirilen kısa süreli yöntemler arasında Sister Chromatid Exchange (SCE- Kardeş Kromozom Değişimi), Kromozom aberasyonu, Comet Assay, Mikronukleus testi, UMU test, SOS test, Ames testi gibi testler yer almaktadır. İnsan kromozomlarını daha yakından tanıyabilme ve birbirinden kolayca ayırabilme çabaları sürdürülürken araştırmacılar tarafından comet analiziyle,

DNA hasarının bir göstergesi sayılan kuyruktaki DNA yüzdesi ölçümü tekniği, risk artışı ve hasar konusunda doğru tarama olanağına kavuşmuştur [51,52,56].

Genotoksisiteye bağlı hastalıkların veya maruziyetin değerlendirilmesinde uygun biyogösterge kullanımı, sonuçların doğru yorumlanması bakımından hayati önemdedir. Biyogöstergeler deneysel ve epidemiyolojik araştırmalar ile saptanabilen biyomoleküler değişiklikler arasında bağ kurmada yardımcı olan biyolojik sistemde oluşan değişikliklerdir. Biyogöstergeler; maruziyet, duyarlılık ve etki biyogöstergeleri olmak üzere 3 farklı kategoriye ayrılır. Karşılaşılan sonuca yol açtığı düşünölen (neden-sonuç ilişkisi) maruziyet etkenlerinin rolünü değerlendiren, maruziyet biyogöstergesidir. Genetik yatkınlık veya diğer etkenlere bağlı maruziyetin doğrudan muhatabı riskli bireyler ile toplumun diğer kesimleri arasındaki farkı ve riskli grubun teşhisini kolaylaştırıcı olan biyogösterge, duyarlılık biyogöstergeleri olarak tanımlanabilir. Etkinin doğrudan sonuçlarını yansıtanlar ise etki biyogöstergeleridir. Klasik epidemiyolojik metodlar kullanılarak yapılan çalışmalar genellikle etkene maruziyetin uzun dönemli sonuçlarını tespit etmek ya da değerlendirmek konusunda yardımcı olurken, moleküler epidemiyolojik teknikler ise, hastalık oluşmadan çok önce risk değerlendirmesinde yardımcı bilgiler sunar. Bu temel farklılık, moleküler epidemiyolojik incelemelerin koruyucu sağlığa sunduğu hizmet bakımından üstün yanını oluşturur. Dolayısıyla moleküler epidemiyoloji günümüzde kanser oluşum ve tespit sürecini incelemede yaygın olarak yararlanılan bir uğraş alanıdır [8,9,36,51,52,57,58].

2.6. Kromozomal Aberasyon

Kromozomal aberasyonlar, genotoksisite çalışmalarının validasyonu için geliştirilmiş yöntemlerden birisidir. Bu yöntemin sonuçlarının dikkate alınması kanser riskinin erken tanısına yardımcı olabilir. Teknik tüm genomdaki hasarın izlenmesine imkan tanınması ve maruziyetin değerlendirilmesinde büyük ölçüde uluslararası geçerli standartlara erişmiş olması bakımından önemlidir. Karl Sax tarafından 1930 yılında somatik hücrelerdeki mutasyonun kansere neden olabileceği belirtilmiştir. Bu tespitin ardından mutojenezisin yol açtığı sorunlar ayrıntılı olarak araştırılmaya çalışılmıştır. Etkene maruziyetin kromozomal anomaliye yol açma riskinin saptanmasında, kimyasalların klastojenik aktivitesinin değerlendirilmesinde ve biyogösterge çalışmalarında kromozomlarda görülen değişiklikler oldukça önemlidir [31,41,54,59,60]. Nitekim Hagmar L. ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarda yüksek sıklıkta kromozomal aberasyonlu kişilerde kanser gelişme riskinin daha fazla olması arasında ilişki olduğu gösterilmiştir [61].

Kültüre alınmış periferel kan lenfositlerindeki kromozomal aberasyon sıklığının incelenmesi ve genotoksik hasarın boyutunun tespiti, kromozomların en rahat gözlenebildiği metafaz evresinde yapılır. Bu aşamada hücrelerin tutulabilmesi için hücre kültürüne kolsemid eklenir ve kromozomlardaki makrolezyonlar ve yapısal kromozomal değişiklikler değerlendirilebilir. En sık rastlanan kromozomal aberasyonların; kromatid açıklığı (gap) kromatid kırığı (break), asentrik ve disentrik fragment, ring kromozom, kromatid değişimi, inversiyonlar ve translokasyon şeklinde olduğu söylenebilir DNA sarmal kırılmaları veya baz değişiklikleri onarım kusurlarına bağlı olarak kromozomlarda görülen primer hasarlardır. DNA kırılmaları tek sarmalı veya birbirini tamamlayan çift sarmalı aynı anda etkileyebilir [56,60].

2.7. Comet Tekniği

“Genomik instabilite”, genlerin DNA’nın hasarına yol açacak ajanlarla karşılaşması sonrasında kromozomal destabilizasyon, gen amplifikasyonları ve mutasyonların oluşmasına eğilim derecesini belirlemek için kullanılan bir tanımdır. Alkali *comet* analizi ile genomik instabilite ölçülebilmektedir. Tek zincirde, ikili zincirde ve alkali-labil bölgelerde DNA hasarını çabuk ve kolay bir teknikle gösterebilmek mümkün olabilmektedir. Bu test tek hücre seviyesinde DNA hasarı hakkında bilgi vermektedir. Tek hücre jel elektroforezi (*Single cell gel electrophoresis; SCGE*) veya *Comet* tekniği, DNA hasarını ölçmek ve analiz etmek amacıyla kullanılan hızlı, basit, duyarlı ve yaygın kullanım alanına sahip bir tekniktir. İlk defa 1978 yılında Rydberg ve Johanson tarafından DNA sarmal kırıklarının ölçülmesi amacıyla kurulan, daha sonra 1984 yılında Östling ve Johanson tarafından geliştirilen teknik nötral pH’daki *lysing* şartlarında uygulanarak DNA çift sarmal kırıklarını tayin etmede kullanılmıştır. 1988 yılında Singh ve arkadaşları tarafından protokolda birtakım değişiklikler yapılarak yöntem *alkali lysing* koşullarında uygulanmıştır. Singh ve arkadaşlarının *comet* yöntemi protokolü bugün küçük değişikliklerle dünya genelinde en yaygın kullanılan protokoldür. Yöntemin en önemli avantajlarından bir tanesi de çok çeşitli hücre tiplerinde çalışma olanağı sağlamasıdır [37,52,62].

Comet yönteminde hücreler izole edildikten sonra agar içine gömülerek mikroskopik lamlara yayılırlar. *Lysing* aşamasından sonra elektroforeze bırakılıp floresan boya ile boyanmak suretiyle değerlendirilirler. *Comet* tekniği ile DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde gözle değerlendirmenin yanısıra kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kuyruktaki DNA yüzdesi en yaygın kullanılan parametrelerdir. Kuyruktaki DNA yüzdesinin belirlenmesi ve sonuçların gözle

değerlendirilmesi diğer parametrelere göre doz cevap ilişkisini daha iyi yansıtması sebebiyle tercih edilmektedir [37,52,62].

2.8. Araştırmanın Genel Bilgiler Işığında Öngörüsü

Son yıllarda geliştirilen ve DNA'daki çok küçük harabiyetlerin bile hassas biyogöstergesi olduğu kabul edilen bu kısa sürede yanıt alınan inceleme teknikleri diğer mutajenite testleri ile birlikte kullanılmaya başlanmıştır. Bu tür testlerin kullanımı yoluyla günümüze değin sigara kullanan kişilerde konuyla ilgili değişik araştırmalar yapılmış olmasına karşın, aynı ortamda ebeveynleri sigara içen çocuklarda (pasif içici çocuklarda) bu yönde yapılmış, yayınlanmış kapsamlı bir araştırma henüz bulunmamaktadır. Dolayısıyla, sigaranın insan memeli hücrelerinin DNA'sında olası hasarı, pasif içici durumundaki çocuklarda bu yönde bir hasar oluşturup oluşturmadığının araştırılması, pediatristler başta olmak üzere konunun muhataplarına oldukça yararlı bilgiler sunabilecektir. Ayrıca pasif içici durumundaki çocuklarda ileride bu tekniklerin yaygın bir şekilde kullanılıp kullanılmayacağına ışık tutması açısından da yararlı olacaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırma, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği'nde poliklinik hizmeti alanlar arasında araştırma gruplarında yer alabilecek özelliklere sahip çocuklarda yapıldı. Araştırmaya katılmayı kabul eden ailelere çocukların ve ailenin bazı sosyodemografik özelliklerini ve sigara kullanımı alışkanlıklarını sorgulayan ve DNA hasarını artırıcı faktörler göz önüne alınarak hazırlanan kısa bir anket uygulandı (bkz. Ek-1,2, Anketler). Anketi yanıtlayanların olur izninin alınmasını takiben çocuklarından alınan venöz kan örnekleri, Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Toksikoloji laboratuvarında genotoksisite analizine tabi tutuldu.

Anketi yanıtlayan ailelerin çocukları arasında; yaşları 7 ile 10 arasında olan ve diğer sosyodemografik özellikleri benzeyen, ev ortamında ebeveynleri sigara içmeyen toplam 13 çocuğun ve ailesi sigara içen ve pasif içici konumundaki toplam 20 çocuğun periferal lenfositlerinde genotoksik etki, kromozomal aberasyon yöntemiyle (kromatid kırığı, kromatid gap ve kromozom kırığı, kromozom gap) karşılaştırıldı. Araştırmanın planlama aşamasında kardeş kromozom değişimi (sister chromatid Exchange-SCE) yönteminin de karşılaştırmalarda kullanılması düşünülmüştü. Ancak bu yöntemin çocukların kan örneklerinin analizlerinde karşılaşılan metodolojik sorunlar nedeniyle SCE analizi yapılamadı. Bunun yerine genotoksisitenin tespitinde son yıllarda çok daha duyarlı olduğu iddia edilen comet yöntemi de bu çalışmada denendi. Bunun için her iki gruptan rastgele yöntemiyle 5 çocuğun periferal kan örnekleri kromozomal aberasyon yöntemiyle eş zamanlı olarak comet yöntemiyle de analiz edildi. Comet analizinde incelenen 50 hücrenin her birinde kuyruktaki DNA yüzdesi oranlarının ortalaması "mean tail DNA %" hesaplandı.

Bütün gruplar için çalışmaya dahil edilmede, “Araştırma Etik Kurul Başvuru Formunda beyan edildiği üzere, ebeveynlerin bilgilendirilmiş onamı kabul etmeleri” en temel ön koşul olarak kabul edildi. Bu araştırmada sigara içme alışkanlığı olan ve ev ortamında en az 10 adet/gün sigara içen ebeveynler ile bunların pasif içici durumunda bulunan 7-10 yaş arasındaki çocuklarından gerekli venöz kan örnekleri heparinize edilmiş steril enjektörlere alındı. Bu kişilerle benzer sosyodemografik özelliklere sahip ancak sigara içmeyen ebeveyn ve çocukları ise kontrol grubunda yer aldı. Bu kişilerde de araştırmanın veri toplama süreci, sigara içen gruplardakiyle aynı şekilde planlandı. Kendisi aktif sigara içicisi çocuklar, çocuk ya da ebeveynlerin herhangi birinde kalıtsal hastalığı bulunanlar araştırmaya alınmadı. Araştırmaya dahil edilenlerin gruplandırması aşağıdaki şekilde yapıldı:

3.1. Gönüllülerin Niteliği ve Sayıları

I. Grup (Pasif sigara içen çocuklar): Birlikte yaşadığı evde ebeveynlerinden en az birisinin ağır sigara içicisi olduğu, bilinen herhangi bir kronik hastalığı bulunmayan ve halen herhangi bir ilaç kullanmayan, 7-10 yaş arası kız ya da erkek çocuklar: 21 kişi

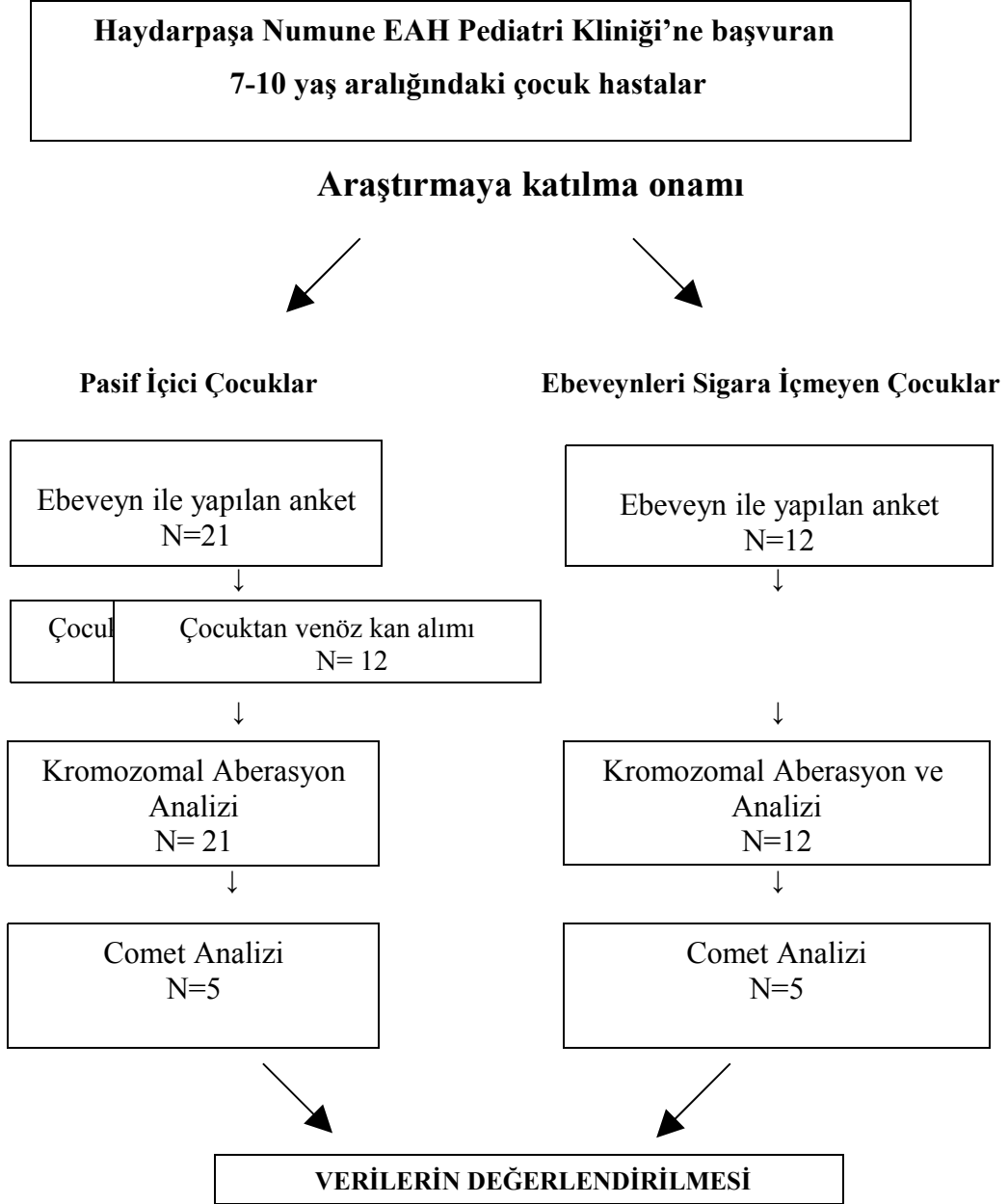
II. Grup (Pasif sigara içen çocukların kontrol grubunda yer alan çocuklar): Birlikte yaşadığı evde ebeveynlerinden hiç birisinin sigara içicisi olmadığı, bilinen herhangi bir kronik hastalığı bulunmayan ve halen herhangi bir ilaç kullanmayan 7-10 yaş arası kız ya da erkek çocuklar: 12 kişi

III. Grup (Sigara içen ebeveynler): 20-42 yaş arası ebeveynler ya da kadın 21 kişi

IV. Grup (Hiç sigara içmeyen ebeveynler): 20-42 yaş arası erkek ya da kadın 12 kişi

Çalışmanın sonunda veriler değerlendirildi ve rapor yazılma aşamasına geçildi. Ebeveynlerde genotoksisite analizi bu araştırmaya alınmadı, sadece bunların

anketlerinden yararlanıldı. Araştırmanın tasarımı Şekil 2’de şematik olarak sunulmuştur:



Şekil 2: Araştırmanın tasarımı

3.2. Genetik Analizlerin Ayrıntıları

Çocuklardan heparinize tüpe alınan venöz kan örnekleri, analiz öncesi oda sıcaklığında (22°C), 72 saat, 37°C'de 48 saat, buzdolabında (4-5 °C) 7-10 gün saklanma olanağına sahipken, bu çalışmada saklama koşullarından oluşabilecek hata payını azaltmak amacıyla kan alındıktan sonra, 1-2 saat içinde Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Toksikoloji Laboratuvarına ulaştırılarak analizleri yapılmaya başlandı.

3.2.1. Kromozomal Aberasyon Yönteminin Ayrıntıları

3.2.1.1. Yöntemde Kullanılan Aletler

- 37°C'lik inkübatör
- Laminar Flow kabini
- Santifüj
- Vorteks
- Cam şale
- Traşlı lam
- Steril kapaklı kromozom tüpü
- Steril enjektör
- Cam pastör pipeti
- Steril lateks eldiven
- Fotograf makinalı mikroskop (Olympus BX51)

3.2.1.2. Yöntemde Kullanılan Kimyasal Maddeler

- RPMI 1640 Besiyeri (Biological Ind.-Kat. No: 01-106-1B)
- Fetal Calf Serum (Biological Ind.-Kat. No: 04-007-1B)

- Fitohemaglutinin (Biological Ind.-Kat. No: 12-006-1H)
- L-Glutamin (Biological Ind.-Kat. No: 03-020-1B)
- Antibiyotik (Streptomisin/Penisilin, Sigma)
- Kolsemid Çözeltisi (Biochrom-Kat. No: L 6221)
- Potasyum Klorür (Merck)
- Metanol (Merck)
- Asetik asit(Merck)
- *Giemsa*

3.2.1.3. Yöntemde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

Hipotonik Çözelti (0.0075 M KCl)

5.592 g KCl (potasyum klorür) 1000 mL distile suda çözülür.

Fiksatif Çözelti

1 kısım glasiyel asetik asit üzerine 3 kısım metanol ilave edilerek iyice karıştırılır.

Çözelti daima taze olarak hazırlanır ve buzlukta soğutularak kullanılır.

3.2.2. Yöntemin Uygulanışı

3.2.2.1. Kromozom Kültürünün Hazırlanması

100 mL'lik şişelerdeki RPMI-1640 besiyeri üzerine kültür ortamını zenginleştirmek amacıyla 25 cc FCS ve 0.75 cc L-glutamin laminar flow altında ilave edildi. Kültür ortamına mitotik indüksiyonu sağlamak amacıyla 2.5 cc fitohemaglutinin ve kontaminasyon riskine karşı 1.3 cc antibiyotik eklendi. Hazırlanan vasat altüst edilerek karıştırıldı ve kullanılacağı zamana kadar buzlukta saklandı.

Dondurulmuş vasat etüvde 370 °C'ye getirildi. 0.5 mL kan içeren kromozom tüplerine steril enjektör yardımıyla her tüpte 5 mL olmak kaydıyla ilave edildi. Kromozom tüpleri hücrelerin daha iyi üremesi için yatay şekilde 37 °C'lik etüvde 48 saat sürecek inkübasyona bırakıldı. 45. saat sonunda her tüpe 3 damla kolsemid ilave edilerek 3 saat daha inkübasyona bırakıldı. 48. saatin sonunda 10 dakika 1000 rpm'de santrifüj edilerek süpernatant kısmı su trompu ile atıldı. Çökelti üzerine 0.0075 M potasyum klorürden 5 mL vorteks üzerinde karıştırılarak eklendi. Tüpler 25 dakika 37 °C'lik etüvde bekletildi. 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı. Buzlukta bekleyen taze hazırlanmış fiksatif çözeltisinden (metanol/asetik asit, 3/1) çözeltisinden vorteks üzerinde damla damla 5 mL ilave edildi. 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı. Bu işleme dipteki pellet iyice beyazlaşana kadar devam edildi.

Fiksasyon sonucunda tüplerin dibinde pellet şeklinde kalan hücreler cam pastör pipetiyle pipetaj yapılarak karıştırıldı. Distile su içinde buzdolabında soğutulmuş lamalar iyice kurulandıktan sonra 30 cm yükseklikten 3-4 damla süspansiyon damlatıldı. Damlanın iyice yayılmasıyla lamalar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Çalışma süresince her birey için 3 lama yayım yapıldı.

3.2.2.2. Lamaların Boyanması ve Değerlendirilmesi

4 mL Giemsa boyası distile su ile 100 mL'ye tamamlanarak %4'lük Giemsa boyama çözeltisi hazırlandı. Lamalar Giemsa boyama çözeltisi içinde 20 dakika bekletildi. Boyamanın tamamlandığına karar verilince lamalar distile su ile iyice yıkanıp oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

Boyanmış metafazlar, yapısal kromozomal bozuklukları (kromozomal aberasyonları) belirlemek amacıyla ışık mikroskopunda x100'lük objektif altında immersiyon yağı damlatılarak incelendi. Her birey için 100 iyi kalite metafaz değerlendirildi.

3.2.3. Comet Yöntemi

3.2.3.1. Yöntemde Kullanılan Aletler

- Dijital üstten kefeli terazi
- Ph metre
- Soğutmalı santrifüj
- Elektroforez tankı
- Otomatik mikro pipetler
- Traşlı lam
- Lamel (32x64 boyutunda)
- 1.5 mL ependorf tüpü
- Plastik pastör pipeti
- Steril lateks eldiven
- Parafilm
- Cam şale
- Floresan ataçmanlı mikroskop (Olympus BX51)
- Isıtıcı
- Buzdolabı

3.2.3.2.Yöntemde Kullanılan Kimyasal Maddeler

- DMSO (Merck)
- NaCl (Merck)
- KCl (Merck)
- NaOH (Merck)
- Histopaque 1077 (Sigma, 1077-1)
- Etidyum Bromide (Sigma, E-8751)
- Triton-X 100
- EDTA
- Trizma Base
- HMA
- LMA
- Fosfat tamponu (PBS) (Biological Ind.-Kat. No:02-023-1A)

3.2.3.3.Yöntemde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

10 M NaOH çözeltisi

NaOH	400 g
Distile su	ym 1000 mL

0.2 M EDTA çözeltisi

EDTA	74.4 g
Distile su	ym 1000 mL

10 M KOH çözeltisi

KOH	561.1 g
Distile su	ym 1000 mL

Stok 100 µg/ml Etidyum Bromür Çözeltisi

EB	5 mg
Distile su	ym 50 mL

Hazırlanan stok çözelti +4C de saklanır. Lamlar boyanacağı zaman çözelti 1:4 oranında distile su ile seyreltilip kullanılır.

Stok Lizis Çözeltisi

2.5 M NaCl	146.1 g
100 mM EDTA	37.2 g
10 mM Tris	1.2 g
Distile su	ym 900 mL

Çözeltinin pH'sı 10 M NaOH ile pH= 10'a ayarlanır. Hazırlanan stok lizis çözeltisi oda sıcaklığında saklanır. Kullanmadan önce her 100 mL çözelti için 1 mL Triton X ve 10 mL DMSO ilave edilir.

Elektroforez Tamponu

0.3 M NaOH	37.5 mL
1 mM EDTA	6.75 mL
Distile su	ym 1250 ml

Nötralizasyon Tamponu

0.4 M Tris	48.5 g
Distile su	ym 1000 mL

Çözeltinin pH'sı konsantre HCl ile pH=7.5'e ayarlanır.

Düşük kaynama dereceli agar (%0.65)

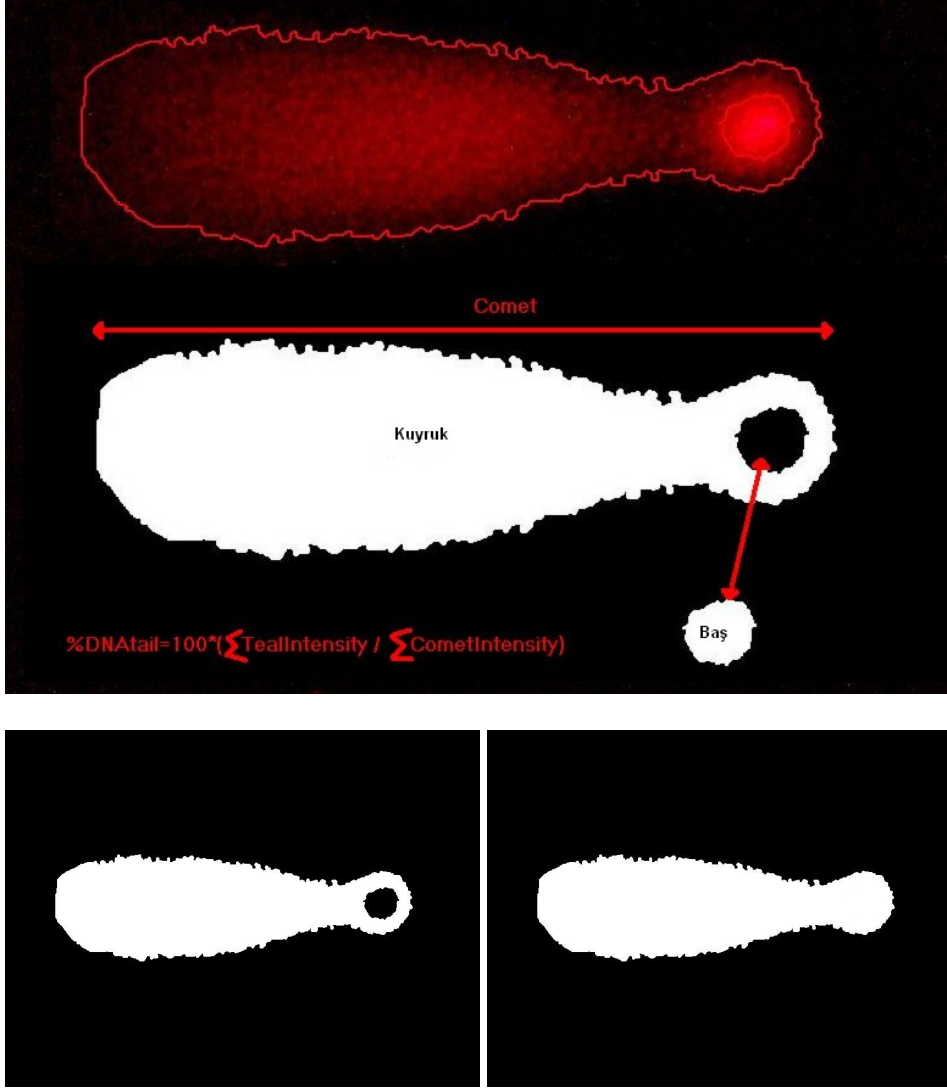
PBS içinde hairlanır.

Yüksek kaynama dereceli agar (%0.65)

Distile su içinde hazırlanır.

3.2.3.4. Periferel Kan Lenfositlerinde Comet Yöntemi Uygulanışı

Çalışmaya başlamadan önce % 0.65'lik HMA distile suda hazırlanır. Lamlar agara batırılır, oda sıcaklığında kurutulur. Her örnek için iki lam çalışılmıştır. Her lam için bir endorff tüpüne 1'er mL PBS konur (+ 4 °C). 100 µl kan tüplerdeki PBS (+ 4 °C) üzerine eklenir. Karıştırılır ve 10-15 dakika bekletilir. 100 µl histopaque tüpün dibine eklenir. 1060 rpm, + 4C'de 3 dakika santrifüj edilir. Ayrılan lenfositlerden 100 µl alınır. Hücreler 37 °C'deki 100 µl PBS içinde hazırlanmış % 0.65'lik LMA ile karıştırılarak önceden HMA ile kaplanıp kurutulmuş lama yayılır. 32x64 lamelle kapatılarak buzdolabında agar katılaşana kadar bekletilir. Lamel lamın yüzeyinden çekilerek lysis solüsyonunda bir gece + 4 °C'de bekletilir. Soğuk elektroforez çözeltisi tankın içine doldurulur. 25 Volt 300 mA olacak şekilde çözelti miktarı ayarlanır. Lamlar tank içinde 20 dakika bekletilir. 20 dk 25 V, 300 mA'de elektroforez uygulanır. Elektroforezden çıkartılan lamlar 3 defa nötralizasyon tamponunda 5'er dakika bekletilerek nötralize edilir. Bu işlem sonrasında her lam üzerine floresan renk vermesi için 50 µl etidyum bromür çözeltisinden damlatılarak lamelle kapatılır ve iyiyce boyanması için 15-20 dakika bekletilir. Lamlar boyandıktan sonra Olympus BX51 marka floresan mikroskopta 'Comet Görüntü İşleme ve Analiz Programı Sistemi' (BAB Bs 200 Pro) programı kullanılarak değerlendirme yapılmıştır.



Şekil 3: Comet tekniğinde “Comet Görüntü İşleme ve Analiz Programı Sistemi” (comet image analayse system) değerlendirmesinin fotografik sunumu.

3.2.4. Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) Yönteminin Ayrıntıları;

Wolff ve Perry'nin yöntemine göre SCE analizi yapıldı [63]. Steril şişelere RPMI 1640 besiyeri içine kültür ortamını zenginleştirmek amacı ile fetal calf serumu ilave edilir. Daha sonra fitohemaglutinin ilave edilir ve vorteksle karıştırılır. Daha sonra steril özel kültür tüplerine dağıtılır.

Boyama teknikleri: Bilinen iki türlü boyama tekniği vardır. Birincisi 33258 Hoechst, 2XSSC, Gimsa tekniğidir. Bu teknikte önceden hazırlanan kurumuş lamlar petri kutusuna konulur. Üzerine Hoechst 33258 ilave edilir. Aluminyum kağıda sarılarak karanlıkta bekletilir. Hoechst'ten çıkan lamlar distile su ile yıkanır, petri kutusuna konulur ve üzeri 2XSSC çözeltisi ile kapatılır. Güneş ışığında iki saat bekletilir, distile suda yıkanır. Gimsa hazırlanır, lamlar özel cam kaplarda gimsa içinde bekletilir. Gimsadan çıkan lamlar distile suda yıkanır ve kurumaya bırakılır. İkinci teknik ise PBS, McI tampon tekniğidir. Bu teknikte en az on gün önceden hazırlanan kurumuş lamlar PBS çözeltisi içinde bekletilir. Bu çözeltilerden çıkan lamlar Hoechst 33258 çözeltisi içinde 10 dakika bekletilir. Önce PBS, sonra distile su ile yıkanır. Petri kutusunda McI tampon çözeltisi içinde iki saat süre ile bekletilir. Bu sırada 2XSSC çözeltisi su banyosunda hazır bekler ve McI tamponundan çıkan lamlar 2XSSC çözeltisi içinde tutulur. Daha sonra gimsa boyasında bekletildikten sonra kurumaya bırakılır.

33258 Hoechst, 2xSSC, Gimsa tekniği ve/veya PBS, McI tampon tekniği boyama teknikleri denenerek en uygun iyi görünümlü boyama yöntemi bulunur. Standart istatistik veriler ortalama SCE/hücre olarak belirtilip, sonuçlar istatistiksel olarak analiz edilir. Her bir bireyin metafaz örneklerinde en iyi SCE gösteren en az 50 metafaz plağı incelenir.

Her birey için iyi dağılmış en az 50 metafazın kromozomları SCE sıklığını saptamak üzere, 100x20'lik mikroskop altında incelenir. Her bir metafazda gözlenen toplam SCE tespit edilir ve en az 50 metafazda gözlenen toplam değerlerin ortalaması alınarak, her birey için ortalama SCE değerleri elde edilir. Bu değerler kullanılarak gruptaki bireyler için ortalama SCE/hücre değerleri hesaplanır. Bu arada boyanmış

kromozom preparatlarındaki iyi dağılmış metafazların 100x20 objektif ve immersiyon yağı kullanılarak fotoğrafları çekilir.

3.3. Verilerin Değerlendirilmesi

Veriler SPSS 11.5v ve GraphPad Prism 3.0v bilgisayar programları kullanılarak değerlendirilmiş, analizinde; Student's t testi, Ki kare testi kullanılmıştır. $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.4. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmanın planlanma aşamasında her iki gruptaki yer alan çocuklardan ve bunların annelerinden genotoksisite analizinde bir başka metod olarak kabul edilen kardeş kromozom değişimi (SCE- sister chromatic exchange) yönteminin de karşılaştırmalarda kullanılması düşünülmüştü. Ancak bu yöntemin araştırma laboratuvarımızda başka araştırmalar için rahatlıkla kullanılıyor olmasına rağmen çocukların venöz kanlarında SCE analizi maalesef başarılı olarak yapılamamıştır. Bu laboratuvarımızda çocuklarda bu metodu uygulamada nedenini çözmeye çalıştığımız bir sorundan kaynaklanabileceği gibi, henüz bilemediğimiz başka bir nedenden dolayı da olabilir. Nitekim bu kişilerin annelerinden alınan kan örneklerinin bu yöntemle ilk analizleri çocuklardaki gibi problemlili olmamıştır. Ancak çocuklarının SCE analizi olmadığından, sunulan bu çalışmada annelerin SCE analizi değerlendirilmemiştir.

Araştırmanın bir diğer kısıtlılığı ise, başlangıçta planlanandan daha az sayıda kişide analizlerin yapılmış olmasıdır. Bu kısıtlılığın da araştırmanın veri toplama aşamasında araştırmaya dahil olma kriterlerine uyan çocukların kliniğimize başvurusunun önceden öngörülenden az olması ile ilişkilidir.

4. BULGULAR

4.1. Katılımcılara Uygulanan Anket Verilerinin Sonuçları

Araştırmada 21'i "pasif içici" konumundaki grupta ve 12'si ailesi sigara içmeyen (kontrol) grubunda yer alan toplam 33 çocuğun ebeveynlerine, bu kişilerin ve çocuklarının bazı sosyodemografik özelliklerini ve DNA hasarını değiştirici faktörleri sorgulamaya yönelik kısa bir anket uygulandı. Anketten elde edilen verilere göre yaşlarının ortalaması pasif içici grupta; 8.1 ± 1.3 yaş ve kontrol grubunda ise 7.8 ± 1.1 olarak tespit edildi. Araştırmaya katılan çocukların gruplara dağılımlarının benzer olduğu ve yaş parametresi bakımından gruplara arasında istatistiksel bir farklılığın olmadığı saptandı ($p>0.05$).

"Pasif içici" grubundaki çocukların % 52.4'ü, kontrol grubundakilerin ise yarısı erkeklerden oluşmakta idi. Araştırmaya katılan çocuklar cinsiyetleri bakımından birbirleriyle karşılaştırıldığında grupların birbirine benzediği tespit edildi ($p>0.05$), (Tablo 1).

Anketten elde edilen veriler doğrultusunda çocukların yaşadığı fiziki mekanların karşılaştırılmasında, "pasif içici" grubundaki çocukların yaşadığı evlerde ortalama; 3.5 ± 0.7 oda olduğu ve bu evlerde ortalama; 5.9 ± 2.6 kişinin birlikte yaşadığı buna karşın kontrol grubundakilerin evlerinde ise ortalama; 3.7 ± 0.5 oda olduğu ve bu evlerde ortalama; 4.7 ± 0.7 kişinin birlikte yaşadığı tespit edildi. İncelenen bu iki parametrenin her ikisi bakımından da gruplar arasında var olan bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Çocukların yaşadığı fiziki mekanların karşılaştırılmasında, yukarıda değinilen farklılıklara rağmen, evlerinde havalandırma sisteminin olup olmaması ve evde araştırmaya konu olan çocuğun ayrı bir odasının olup olmaması sorgulandığında

gruaplarda yer alan çocukların sorgulanan bu parametreler bakımından birbirlerine benzer özellikler gösterdikleri saptandı ($p>0.05$). Gruplar arasındaki bu benzerliklerin, anne ve babanın eğitim düzeyleri, işleri, ailenin aylık gelir durumu, sosyal güvence varlığı akraba evliliği olup olmaması konularında da mevcut olduğu ($p>0.05$) tespit edildi. Bütün bu sayılan parametrelerde benzerlikler olmasına karşın, istatistiksel olarak anlamlı farklılık yaratmasa da “daha düşük eğitim düzeyine ve daha düşük gelir düzeyine sahip olan ailelerde “pasif içici”lerin ailelerin oranlarının diğer gruba göre daha yüksek olması dikkati çekmektedir (Tablo 1).

Tablo 1: Araştırmaya katılan bireylere uygulanan anket sonuçlarının “pasif içici” ve kontrol grubunda yer alanlara göre karşılaştırılması ($p < 0.05$, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir).

Anket Soruları	“Pasif içici” durumdaki çocukların olduğu grup		Ailesi sigara içmeyen çocukların olduğu grup (kontrol)		İstatistik: Ki kare
	n	%	n	%	
<i>Annenin eğitimi</i>					p>0.05
Okur-yazar olmayan	7	33.3	1	8.3	
İlköğretim	13	61.9	9	75.0	
Lise ve üstü	1	4.8	2	16.7	
Toplam	21	100.0	12	100.0	
<i>Babanın eğitimi</i>					p>0.05
Okur-yazar olmayan	6	30.0	1	8.3	
İlköğretim	12	60.0	7	58.3	
Lise ve üstü	2	10.0	4	33.4	
Toplam	20	100.0	12	100.0	
Annenin çalışma durumu					p>0.05
Evhanımı	17	81.0	11	91.7	
Çalışan	4	19.0	1	8.3	
Toplam	21	100.0	12	100.0	
Babanın çalışma durumu					p>0.05
Serbest meslek	15	71.4	8	66.7	
Diğer iş kolu	6	28.6	4	33.3	
Toplam	21	100.0	12	100.0	
Ailenin aylık geliri					p>0.05
≤ 1000 YTL	7	41.2	4	33.3	
> 1000 YTL	10	58.8	8	66.7	
Toplam	17	100.0	12	100.0	
Ailenin sosyal güvencesi					p>0.05
Evet	8	38.1	8	66.7	
Hayır	13	61.9	4	33.3	
Toplam	21	100.0	12	100.0	
Akraba evliliği					p>0.05
Evet	5	23.8	2	16.7	
Hayır	16	76.2	10	83.3	
Toplam	21	100.0	12	100.0	
Evde havalandırma sistemi bulunuyor mu?					p>0.05
Evet	1	4.8	-	-	
Hayır	20	95.2	12	100.0	
Toplam	21	100.0	12	100.0	
Evde araştırmaya konu olan çocuğunuz için ayrı oda bulunuyor mu?					p>0.05
Evet	8	38.1	5	45.5	
Hayır	13	61.9	6	54.5	
Toplam	21	100.0	12	100.0	
Araştırmaya konu olan çocuğunuzun cinsiyeti					p>0.05
Erkek	11	52.4	6	50.0	
Kız	10	47.6	6	50.0	
Toplam	21	100.0	12	100.0	

4.2. Periferel Kan Lenfositlerinde Kromozomal Aberasyon ve Comet Analizi Sonuçları

Tablo 2: Sigara içen aile grubunda yer alan ve ‘‘pasif içici’’ olarak adlandırılan çocukların periferel kan lenfositlerinin kromozomal aberasyon analizinde *kromozom kırığı, kromatid kırığı, kromozom açıklığı ve kromatid açıklığı* bakımından incelenmesi (*t.e; anomali tespit edilmedi*).

Sıra no	Pasif iici durumundaki çocuklar (n=21)	Kromozom kırığı	Kromatid kırığı	Kromozom açıklığı	Kromatid açıklığı
1	<i>S.D.A.s</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
2	<i>Y.Y.s</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
3	<i>D.B.s</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
4	<i>B.P.s</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
5	<i>S.T.s</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
6	<i>Y.D.s</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
7	<i>K.A.s</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
8	<i>T.K.s</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
9	<i>B.M.A.s</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
10	<i>R.D.s</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
11	<i>H.E.İ.s</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
12	<i>E.D.s</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
13	<i>B.M.U.s</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
14	<i>Ş.A.s</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
15	<i>S.G.s</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
16	<i>S.D.s</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
17	<i>A.S.s</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
18	<i>S.Ö.s</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
19	<i>B.İ.s</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
20	<i>G.K.s</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
21	<i>A.S.A.s</i>	t.e	t.e	t.e	t.e

Tablo 2’de sigara ien aile grubunda yer alan ve ‘‘pasif iici’’ olarak adlandırılan 21 çocuğun periferel kan lenfositlerinin kromozomal aberasyon analizinde, incelenen 4 parametre (kromozom kırığı, kromatid kırığı, kromozom açıklığı ve kromatid açıklığı) bakımından da herhangi bir anomali tespit edilmedi. Tabloda yer alan tüm çocukların metafaz kromozomlarının mikroskobik görüntüleri oldukça net olarak incelenebildi. Bu bakımdan herhangi bir problemle karşılaşılmadı. Bu tabloda yer alan ve BPs kodlu çocuğun metafaz kromozomlarının görüntüsü buna örnek olarak gösterilebilir (Şekil 4).

Tablo 3: Sigara içmeyen aile grubunda yer alan çocukların periferal kan lenfositlerinin kromozomal aberasyon analizinde kromozom kırığı, kromatid kırığı, kromozom açıklığı ve kromatid açıklığı bakımından incelenmesi (*t.e; anomali tespit edilmedi*).

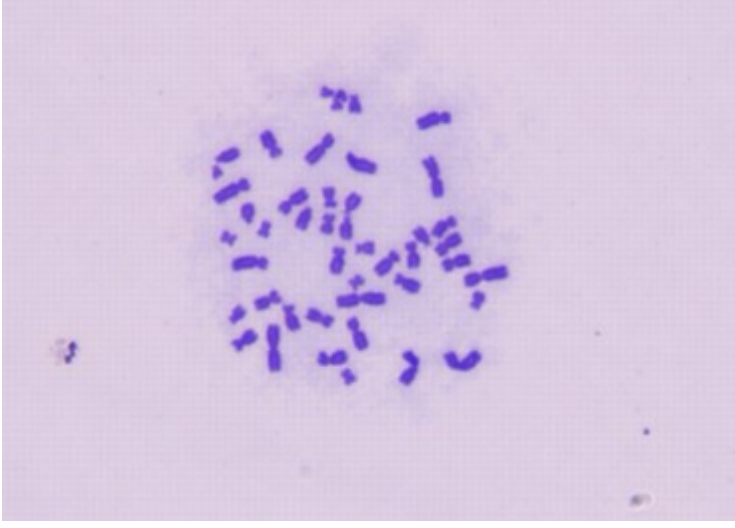
Sıra no	Sigara içmeyen aile çocukları grubu (n=12)	Kromozom kırığı	Kromatid kırığı	Kromozom açıklığı	Kromatid açıklığı
1	<i>L.E.k</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
2	<i>S.Ç.k</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
3	<i>S.P.k</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
4	<i>M.Y.k</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
5	<i>M.K.k</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
6	<i>S.D.E.k</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
7	<i>K.K.k</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
8	<i>O.Ç.k</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
9	<i>Ö.Ç.k</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
10	<i>S.B.k</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
11	<i>H.B.k</i>	t.e	t.e	t.e	t.e
12	<i>O.D.k</i>	t.e	t.e	t.e	t.e

Tablo 2’de sunulan ve araştırmada “pasif içici” olarak adlandırılan çocukların kromozomal aberasyon sonuçlarına benzer şekilde, Tablo 3’de sigara içmeyen aile grubunda yer alan 12 çocuğun periferal kan lenfositlerinin kromozomal aberasyon analizinde, incelenen 4 parametre (kromozom kırığı, kromatid kırığı, kromozom açıklığı ve kromatid açıklığı) bakımından da herhangi bir anomali tespit edilmedi. Tablo 2’de de değinildiği gibi, bu tabloda da yer alan tüm çocukların metafaz kromozomlarının mikroskobik görüntüleri oldukça net olarak incelenebildi. Bu bakımdan herhangi bir problemle karşılaşılmadı. Bu tabloda yer alan ve L.E.k kodlu çocuğun metafaz kromozomlarının görüntüsü buna örnek olarak gösterilebilir (Şekil 6).

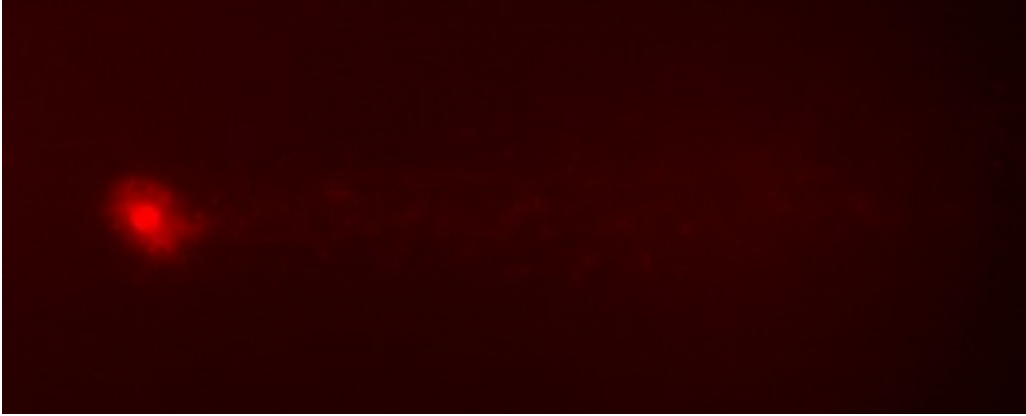
Tablo 4: Sigara içen aile grubundaki (“pasif içici” konumunda) 5 çocuk ve Sigara içmeyen aile grubunda yer alan 5 çocuğun periferal kan lenfositlerinin comet analizinde % DNA hasarı ortalamalarının karşılaştırılması ($p < 0.05$, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir).

Pasif içici durundaki çocuklar (n=5)		Ailesi sigara içmeyen gruptaki (kontrol) çocuklar (n=5)	
Kişi Kodu	Comet %DNA hasar	Comet %DNA hasar	Kişi Kodu
B.P.s	8.84	5.97	L.E.k
S.T.s	8.61	6.99	S.Ç.k
Y.D.s	9.13	7.72	S.P.k
K.A.s	9.50	7.38	M.Y.k
T.K.s	9.49	6.94	M.K.k
Ortalama %DNA tail \pmS.Sapma	9.11 \pm 0.39	7.00 \pm 0.66	Ortalama %DNA tail \pmS.Sapma
İstatistik: Student's t test	p < 0.05 t= 6.17 Sd=8		

Araştırmanın metodolojisinde ayrıntılı olarak bahsedildiği üzere, kromozomal aberasyon analizi yapılmış tüm çocuklar arasında rastgele yöntemiyle 5'er çocuğun (pasif içici grup ve ailesi sigara içmeyen gruptan) periferal kan lenfositlerinin comet analizinde % DNA tail ortalamaları incelendi. Pasif içici grupta 9.11 \pm 0.39 olan bu değer, ikinci grupta 7.00 \pm 0.66 olduğu saptandı. İki grubun sonuçlarının ortalamasının karşılaştırılması gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p < 0.05$), (Tablo 4).



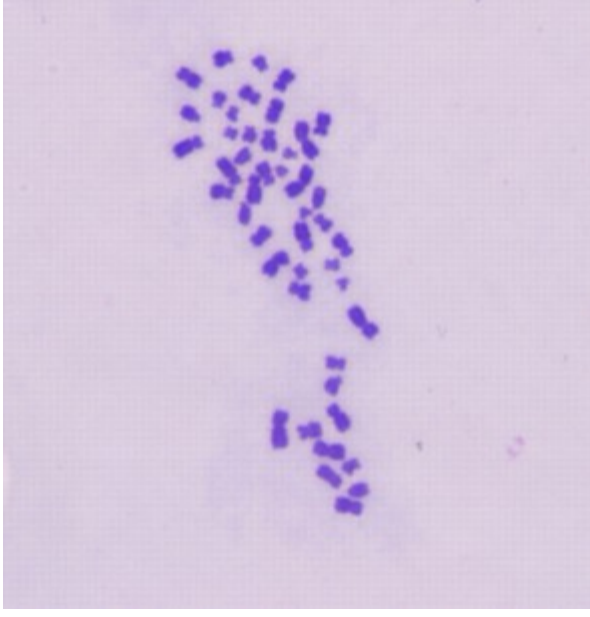
Şekil 4: (Kişi Kodu: B.P.s)- Sigara içen aile grubunda yer alan ve “pasif içici” olarak adlandırılan bir çocuğun kromozomal aberasyon analizi sonucu elde edilen metafaz kromozomlarının mikroskopik görünümü.



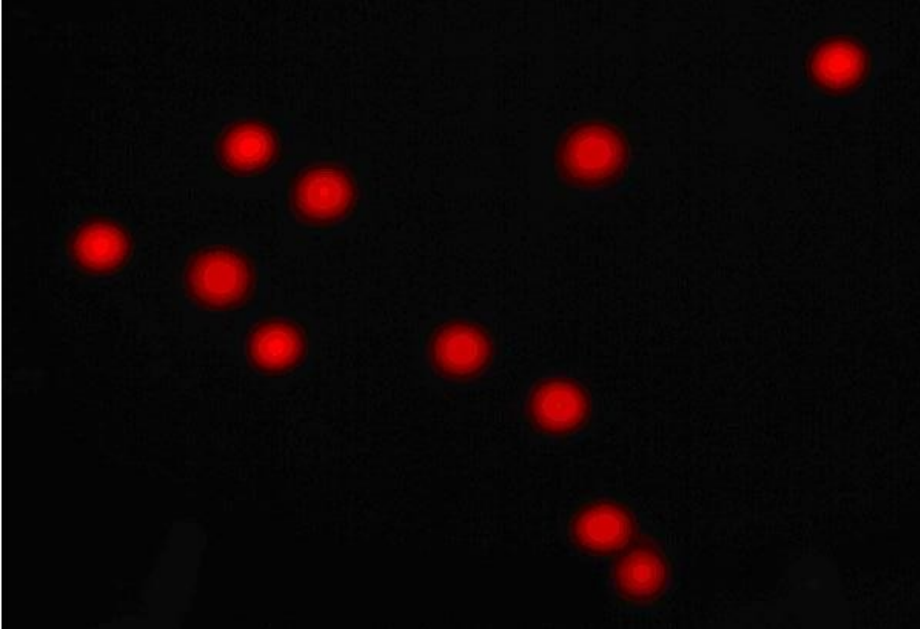
Şekil 5: (Kişi Kodu: B.P.s)- Sigara içen aile grubunda yer alan ve “pasif içici” olarak adlandırılan bir çocuğun comet analizi sonucunun mikroskopik görünümü.

Şekil 4 ve 5'te sigara içen aile grubunda yer alan ve "pasif içici" konumunda bulunan çocukların kromozomal aberasyon (Şekil 4) ve comet (Şekil 5) analizinin mikroskopik görünümülerinden baskılı fotoğrafik sunumunda net olarak görülebilenlerinden örnekler sunulmuştur. Örneğin Şekil 4'te de görüleceği üzere, kromozomal aberasyon analizinde pasif içici konumunda yer alan çocuğun periferal kan lenfositlerinde metafaz kromozomlarının incelemesi sonucunda kromatid kırığı, kromatid gap ve kromozom kırığı kromozom gap yönünden herhangi bir anomali görülmedi.

Oysa bu çocuğun ve Şekil 5'te comet analizi sonucunda, periferal kan lenfositlerinde, kuyruktaki % DNA hasarı oranının, bu çocuğun sayılan 50 hücresinde ortalama; 8.84 olduğu tespit edildi. Şekil-5 comet analizi dikkatle incelendiğinde kuyruk bölümünde görülen değişiklik, bilhassa normal bir hücredekine (DNA göçü bakımından hasarsız) göre, şekil değişikliği (sferik yapının giderek bozulmaya ve uzamaya meyil ettiği) dikkati çekmektedir.



Şekil 6: (Kişi Kodu: L.E.k)- Sigara içmeyen aile grubunda yer alan bir çocuğun kromozomal aberasyon analizi sonucu elde edilen metafaz kromozomlarının mikroskopik görünümü.



Şekil 7: (Kişi Kodu: L.E.k)- Sigara içmeyen aile grubunda yer alan bir çocuğun comet analizi sonucunun mikroskopik görünümü.

Şekil 6 ve 7’de sigara içmeyen aile grubunda yer alan çocukların kromozomal aberasyon (Şekil 6) ve comet (Şekil 7) analizinin mikroskopik görünümünden baskılı fotoğraflık sunumunda net olarak görülebilenlerinden örnekler sunulmuştur. Şekil 6’da da görüleceği üzere, kromozomal aberasyon analizinde ailesi sigara içmeyen ve ev ortamında bu kontaminant maddeye maruz kalmayan çocuğun periferel kan lenfositlerinde metafaz kromozomlarının incelemesi sonucunda kromatid kırığı, kromatid gap ve kromozom kırığı, kromozom gap yönünden herhangi bir anomali görülmedi.

Aynı çocuğun Şekil 7’de comet analizi sonucu periferel kan lenfositlerinde, kuyruktaki % DNA hasarı oranının, bu çocuğun sayılan 50 hücresinde ortalama 5.97 olduğu tespit edildi. Şekil dikkatle incelendiğinde hücrelerin normal sferik yapısını muhafaza ettikleri görüldü. Şekil 7’deki bu mikroskopik görünümün, yöntemde Şekil 3’te demonstratif sunulan, ve Şekil 5’te “pasif içici” konumundaki çocuğun periferel kan lenfositlerindeki yapısal değişimin görünümünden oldukça farklılık arz ettiği dikkati çekmektedir. Bu sunumlarda önemli bir bulgu da; mikroskopik sonuçları Şekil 5 ve 7’de sunulmuş olan bu 2 çocuğun ortalama % DNA hasar oranlarının (ilki “pasif içici”= 8.84, ikincisi ise ailesi sigara içmeyen grupta= 5.97) arasındaki fark dikkati çekmektedir.

5. TARTIŞMA

Pasif sigara içiciliği, tıbbi sonuçlarından, sosyolojik ve hukuki boyutlarına kadar çok değişik yönleriyle günümüzde oldukça fazla tartışılan konulardan birisidir. Bu konu, çocukların maruziyeti bakımından ele alındığında genellikle sigara kullanan yakın aile bireylerinin yoluyla çocukların “pasif içici” konumuna düştükleri gözlenmektedir. “Pasif içici”liğin derecesi ölçüsünde çocuklarda çok çeşitli sağlık sorunları ortaya çıkabilmektedir. Bu sorunların başında bebek ve çocuklarda astım oluşumu, pnömoni, bronşit, akciğer fonksiyonlarında azalma, otitis media, gibi solunum yolu hastalıkları ve ani bebek ölümleri gibi sorunlar gelmektedir [2,3,16,20,21,24,26]. Öte yandan genel popülasyonda pasif içiciliğin insan kromozomları üzerine olan olumsuz etkisi geniş yankı uyandırmaktadır. Sigara içen ve pasif içici erişkin bireylerde yapılmış çok sayıda araştırma, bu kontaminant maddenin hücre DNA’sının yapısını bozarak yol açtığı genotoksik etkileri tartışmaktadır [11,12,29,30, 36, 41-51]. Bu genotoksik etkinin ileride karsinojen etkilere neden olma riskini artırması, bu konunun klinik önemini daha da artırmaktadır. Benzer risklerin çocuklarda da bulunduğu değinen araştırmaların olduğu da dikkate alındığında, çocuklarda pasif içiciliği; yol açtığı diğer sağlık sorunlarının yanı sıra, genotoksisiteye bağlı potansiyel kanserojen etki bakımından da hayati önemdedir [16,26,37]. Her ne kadar çocuklarda pasif içiciliği azaltmak için ciddi tedbirler alınmaya çalışılsa da yakın bir gelecekte bu maruziyeti ortadan kaldırma imkanı pek gözükmemektedir. Dolayısıyla bu sorunun daha uzun yıllar devam edeceği düşünülebilir. Bu durumda çocukların pasif içicilikten ne oranda etkilendiklerinin tespiti önemlidir. Gün geçtikçe bu genotoksik etkilerin daha hassas bir şekilde tespit edilmesi, ve endişe duyulan kanserojen etkinin rutinde tespitine

yönelik, kullanılabilecek bir marker'ı olup olmayacağı tartışılmaktadır [8,9,25,41,57,61].

Araştırmamızın yapıldığı laboratuvar ve konuyla ilgili araştırma ekibimizin gerek sigaranın, gerekse diğer kontaminant maddelerin yol açtığı genotoksisitenin tespitine yönelik ulusal ve uluslar arası düzeyde oldukça deneyim sahibidir [11,49,50] Bu deneyimin de sunduğu olanaklarla araştırmamızda çocuklarda pasif içiciliğin genotoksik hasarının incelenmesi gibi hassas bir konuyu incelemeye çalıştık. Henüz konuyla ilgili laboratuvar standartlarının tartışıldığı bu ortamda mevcut deneyimden oldukça fazla yararlanmaya çalıştık. Örneğin, kardeş kromatid değişimi (SCE) tekniği bu pasif içiciliği değerlendirmede ne ölçüde kullanılabilir sorusu, tüm dünyada konuyla ilgilenenlerin güncel tartışma konularından birisidir. Biz de bu araştırmanın bulgularına dahil etmesek de, SCE analizini denedik. Ancak “pasif içici” çocuklarda bu yöntemin validasyon problemi gösterdiğini tespit ettik. Nitekim literatürde, benzer konuyla uğraşanlarında bu yöntemin kullanımı ile ilgili bildirdikleri çekinceler, bizim “SCE'nin pasif içiciliğin yol açmış olabileceği genotoksisiteyi tespit etmede, yetersiz kaldığı” görüşümüzü destekler niteliktedir [9,18,41,64].

Araştırmamızın ilginç bulgularından birisi de incelenen pasif içici ve kontrol grubunda yer alan tüm çocukların periferal kan lenfositlerinde yapılan kromozomal aberasyon yöntemiyle de herhangi bir kromozomal anomali tespit edilmemiş olmasıdır (Tablo 2 ve Tablo3). Şekil 4 ve Şekil 5’de “pasif içici” ve kontrol gruplarında yer alan BPs ve LEk kodlu çocukların metafaz kromozomlarının görüntüsünde de görüldüğü gibi, çocukların metafaz kromozomlarının mikroskobik görüntüleri oldukça net olarak incelenebildi. Dolayısıyla, tüm çocukların kromozomal aberasyon analizi sonuçlarında

anomali görülmemiş olması, laboratuvar düzeneğimiz bakımından herhangi bir kuşkuya yer olmadığını ortaya koymaktadır.

Bu sonucu asıl ilginç kılan durum ise, kromozomal aberasyon analizi yapılmış tüm çocuklar arasında rastgele yöntemiyle 5'er çocuğun (pasif içici grup ve ailesi sigara içmeyen gruptan) periferal kan lenfositlerinin comet analizinde % DNA hasar ortalamalarının pasif içici grupta 9.11 ± 0.39 olan bu değer, ikinci grupta 7.00 ± 0.66 olduğu ve gruplar arası bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmasıdır ($p < 0.05$), (Tablo 4). Dolayısıyla bizim araştırmamızda da gözlemlediğimiz üzere, gerek SCE, gerekse kromozomal aberasyon teknikleri pasif sigara içiminin olası genotoksisite sonuçlarını yansıtmada kuşku uyandırmaktadır.

Sitogenetik bir yöntem olan kardeş kromatid değişiminin (SCE) laboratuvar koşullarında validasyonunun çok iyi sağlanması gerekir. SCE'nin düşük orandaki kontaminant maruziyetinin sonuçlarını saptamada yetersiz kalması, bu validasyon güçlüğüne eklendiğinde, sorunu daha da artırmaktadır. Bu durum, yeni biyogösterge tekniklerinin bu tür durumlarda kullanımına gereksinim doğurmuştur. SCE ve kromozomal aberasyon yöntemine kıyasla, comet tekniğinin daha düşük seviyede sigaraya maruziyetin oluşturabileceği hasarın daha hassas biyogöstergesi olabileceği, çeşitli araştırmacılar tarafından da iddia edilmektedir. Örneğin Betti ve arkadaşları [64], 200 sağlıklı yetişkin bireyi, sigara içme özelliklerine göre SCE ve comet yöntemini kullanarak değerlendirdiklerinde; sigara içen bireylerde DNA hasarını, SCE ile tespit edememelerine rağmen, comet yöntemiyle tespit etmiş olduklarını bildirmişlerdir. Benzeri bir diğer çalışmada, yine sağlıklı ve sigara içen kişilerden alınan 100 örnek, kıyaslandığında DNA hasarının comet tekniğinde daha anlamlı ve hatta erkeklerde kadınlara kıyasla daha da anlamlı derecede "fark edilebilir" olduğunu rapor etmiştir

[65]. Betti ve arkadaşlarının bu çalışmasının ilgi çeken bir diğer bulgusu da genç ve erişkin kişilere ait örnekleri arasında cometin benzer genotoksisite tespitine imkan sunduğunu beyan etmeleridir. Zira DNA hasarının biyogöstergesini etkilediği tartışılan çok sayıda metoda ait fiziksel faktör ve kişiye ait biyolojik faktör, comet tekniğinde karıştırıcı birer faktör olmaktan çıkmakta ve “*ihmal edilebilir*” düzeyde etkisinin olabileceği kabul edilmektedir. Dolayısıyla, comet, sigara vb. çevresel kontaminantların DNA’da yol açabileceği hasarın tespitinde hassas bir yöntem olduğu yönünde ciddi kanıtlar olarak değerlendirilebilir. Daha öncede değinildiği üzere, SCE analizi için araştırma laboratuvarımızda çocukların periferal kan lenfositlerinde tekrarlanabilir bulgulara ulaşamamamız, bu tekniğin sonuçlarını araştırmamızda tartışmaya mani oldu. Nitekim, Betti ve arkadaşlarının ve Anderson ve arkadaşlarının [65,66], çalışmaları bizim kuşkularımızı destekler şekilde, SCE gibi sitogenetik tekniklere kıyasla aynı bireyde comet **tekniğinin** tekrarlandığında tutarlı sonuçları yansıttığını beyan etmişlerdir.

Sitogenetik yöntemlerle de sigaraya bağlı DNA hasarını gösteren çalışmalara literatürde rastlanmaktadır. Bu çalışmalarda, DNA hasarı, ağır sigara içen bireylerde ancak tespit edilebilirken, comette ise, düşük maruziyetin yol açmış olabileceği DNA hasarı bile tespit edilebilmektedir. Bu kadar hassas tespit yapabilmenin nedeni, sigara dumanı gibi serbest radikallerin lökosit DNA tek sarmalında yarattığı inflamasyon derecesi ile ilişkilidir ve comet tekniği de, bu amaca yönelik olarak tek sarmaldaki hasarı göstermesi bakımından önemlidir [67]. Bu inflamasyonun; maruz kalınan etkenin yoğunluğundan ziyade, bireysel farklılıklara bağlı olduğu ihtimali üzerinde durulmaktadır. Özetle SCE tekniği ile böylesi bir DNA hasarını tespit etmek; çok uzun süreli etkene maruziyet veya çok yüksek oranda maruziyet olması koşuluna bağlıdır.

Comette ise bunun tam tersi geçerlidir. Nitekim bizim çalışmamızda çocukların pasif içici konumları ve erişkine göre daha kısa süreli sigaraya maruz kalmış olmaları dikkate alındığında, comet yönteminin çocuklarda genotoksisiteyi tespit etmede daha geçerli ve güvenilir yöntem olduğunu kanıtlamaktadır.

Mutajenik etkinin hassas göstergesi olan DNA hasarı, ileride bu kişilerin kanser geliştirme olasılığının daha yüksek olması bakımından klinik önemi göz ardı edilmemelidir. Nitekim bu araştırmada kullanılan biyogöstergelerden günümüzde kanser riskini önceden belirleyici yöntemler olarak yararlanılmaktadır [41]. Ne tip kanserlere yatkınlık riski olduğuna işaret etmektedirler. Nitekim bu konuda 22000 kişide yapılmış Avrupa müşterek “kanser risk biyogöstergeleri “ adlı projede sigara ve diğer kontaminant faktörlere bağlı DNA hasarının saptandığı biyogöstergelerle yüksek seviyede risk tespit edilen gruplarda uzun süreli cohort gözlem sonuçları, kanser gelişme riskinin paralel derecede yüksek olduğu ile gösterilmiştir [41, 31]

Comet yönteminde lenfosit hücrelerinin mikroskopta yuvarlak, kenarları daha az yoğun parlaklıkta olmak üzere ortada yoğun bir parlak ışık görünümünün elde edilmesi hasarsız hücre görünümü ya da “nonmigration” (NM) olarak da isimlendirilir. Öte yandan DNA hasarının oluşmasına paralel olarak DNA kırıklıkları çekirdek dışına göç etmeye başlar ve bir yöne doğru saçılmayla kendini belli eder. Söz konusu hasarın artışıyla birlikte lenfositlerde kuyruklu yıldız şeklinde değişim gözlenir [68]. Bizim çalışmamızda Şekil 7’te gösterilen ve ailesi sigara içmeyen bir çocuğa ait olan comet analizi görüntüsü, çocukların periferal kanlarındaki hasarsız lenfositlerin comet yöntemi ile net bir şekilde ayırt edilebildiklerini göstermektedir. Çalışmanın öngördüğü şekilde “pasif içici” konumdaki çocukların comet analizine örnek olarak Şekil 5’de sunulan çocuğun comet analizi sonucu da aynı şekilde literatürde bildirilen hasarlı

DNA yapısıyla oldukça uyumlu bulunmuştur. Bu bulgular comet yönteminin çocuklardaki DNA hasarının tespitinde oldukça başarılı bir biyogösterge olduğunu ortaya koymaktadır. Öte yandan gerek Şekil 5'te comet analizi ile hasar tespit edilen mikroskopik görüntüsü sunulan çocuğun bulgusu gerekse Tablo 3'de ortalama % DNA hasarları ayrıntılı olarak sunulan ve "pasif içici" konumundaki çocukların hiçbirisinde kromozomal aberasyon yöntemi ile hasar tespit edilememiş olması düşündürücüdür.

Kromozomal aberasyon yöntemiyle sigara içen bireylerin periferik kan lenfositlerinde yapısal kromozomal anomalilerine rastlanmasına rağmen, pasif içici konumundakilerde bu hasar kromozomal aberasyon yöntemiyle tespit edilemediği Sorsa ve arkadaşlarının da iddiasıdır [18]. Bizim çalışmamızda da CA yöntemiyle pasif içicilerde herhangi bir kromozomal anomaliye rastlanmamış olması bu iddiayı destekler mahiyettedir.

2007 yılında yayımlanan yeni bir çalışmada, çocuklarda pasif sigara içiminin DNA hasarını 1-8 yaş arası 64 çocukta araştıran Zalata ve arkadaşlarının çalışmasında [37]; maruz kalan çocuklar 20 sigaradan fazlasına ve azına maruz kalanlar şeklinde ve sigaraya maruz kalmayanlar şeklinde 3 grupta incelenmiştir. Maruz kalanlarda yapılan uzun süreli prospektif incelemede gelişme geriliği, göğüs hastalıkları ve gastroenterit görülme sıklığının kontrole göre daha yüksek olduğunu tespit etmişler. Bu çocuklarda comet tekniğiyle % DNA hasarının kontrol grubuna göre son derece fazla oranda anlamlı olduğunu buna karşın, sigaraya az oranda maruz kalanlarda ve kontrol grubunda (sırasıyla DNA hasarı: 11.81 ve 7.46) bulunmuş olması, bu değerlerinde Tablo 4'de sunmuş olduğumuz ortalama değerlere oldukça benzerlik göstermiş olması (9.11 ± 0.39 ve 7.00 ± 0.66), araştırmamızın tutarlılığı açısından oldukça önemlidir.

Etkene maruziyetin derecesi, genotoksisitenin klinik sonuçlarında ve bu sonuçların tespitinde önem taşımaktadır. Pasif içicilik gibi durumlarda etkene maruziyetin derecesini çok çeşitli faktörler etkileyebilir. Bizim çalışmamızda sigaraya maruziyetin sonuçlarını etkileyebileceğini düşündüğümüz birçok faktör göz önüne alınmaya çalışıldı. Bu faktörler bakımından karşılaştırılan grupların olabildiğince benzer niteliklere sahip olmalarına özen gösterildi. Nitekim, daha araştırmanın başında çalışma gruplarındaki çocukların benzer yaş gruplarında olmasına dikkat edildi. Yaş değişkeni dışında Tablo 1’de de gösterildiği gibi bu benzerliğin; cinsiyet, evlerinde havalandırma sisteminin olup olmaması, evde araştırmaya konu olan çocuğun ayrı bir odasının olup olmaması, anne ve babanın eğitim düzeyleri, işleri, aylık gelir durumu, sosyal güvence varlığı, akraba evliliği olup olmaması konularında da mevcut olduğu ($p>0.05$) görüldü. Dolayısıyla yukarıda değinilen birçok sosyodemografik özellikleri bakımından kontrol grubuna benzer olan “pasif içici” konumdaki çocukların periferal kan lenfositlerinde yapılan comet analizi verilerinin göstermiş olduğu artmış genotoksisite riski, “pasif içici”lik ile kuvvetle ilişkilendirilebilir.

Gözden kaçırılmaması gereken bir konu da sunulan bu araştırmamızın, temelde laboratuvar analizine dayanmakla birlikte, klinik inceleme bakımından gözlemsel çalışma olmasıdır. Bu bakımından, bu araştırmanın da diğer gözlemsel çalışmalarda olduğu gibi bir takım taraf tutmalara (bias) da açık olduğunu belirtmek gereklidir. Bilhassa bazı çevresel ve bireysel faktörler; araştırmanın bu konudaki karıştırıcı faktörleri arasında sayılabilir. Bizim çalışmamızda bu sayılan faktörlerin çoğu yönünden gruplar birbirine benzer olmasına karşın, istatistiksel olarak anlamlı farklılık yaratmasa da “daha düşük eğitim düzeyine ve daha düşük gelir düzeyine sahip olan ailelerde “pasif içici”lerin ailelerinin oranlarının diğer gruba göre daha yüksek olması

dikkati çekmektedir (Tablo 1). Pasif icici konumundaki çocukların ailelerinin bu özellikleri, Zalata ve arkadaşlarının bu konuda yaptığı tespitlerle uyum göstermektedir [37]. Her iki araştırmanın bu tespitleri aslında şaşırtıcı da değildir. Çünkü çocuklarının yanında sigara içme sağlıklı yaşam konusunda yeterli düzeyde eğitimi genel olarak olmayanların sorunudur. Bizim bulgularımızı etkileyebilecek ölçüde fark yaratmamış olan bu nevi karıştırıcı faktörlerin, ileride bu alanda yapılacak başka araştırmalarda da mutlaka göz önüne alınmasında yarar vardır.

Son yıllarda pasif sigara içiminin yol açtığı hasarların önlenmesine yönelik yapılan yasal düzenlemeler, elektronik sigara (e-sigara) diye satışı bazı ülkelerde yapılan ve kapalı ortamlarda tüketilen bir ürünün ortaya çıkmasına/ satışının artmasına zemin hazırlamıştır. Ancak sigara kullanımını özendirdiği, doz problemi, hakkındaki uzun süreli ciddi toksik etki kuşkularının varlığı gibi nedenlerden ötürü ülkemizde de yakın bir zamanda bu tür ürünlerin satışının ve reklamının yapılması yasaklanmıştır. Bu güncel konunun çocukların pasif içiciliğinde özel bir önemi vardır. Zira ebeveynleri bu tür ürünleri çocuklarına zarar vermemesini de göz önüne alarak tercih edebilmektedirler. Oysa çocukların psikolojik olarak bu tür ürünleri “zararsızmış” gibi algılaması ve “model edinme”leri eğilimi riskleri, bu tür ürünlerin ebeveynler tarafından kullanılmaması gerektiğinin bir başka açıdan önemli nedenleri arasında sayılabilir. Bu çalışmadaki gibi “pasif içici”liğin potansiyel zararlarına değinen araştırmaların sonuçlarının ilgili kamuoyuyla paylaşılması, bahsi geçen e-sigara gibi ürünlerin kamuoyuna “bu olumsuz durumların alternatifi/ çaresi” olarak sunulmaması konusunda uyanık olmayı gerektirmektedir.

Çalışmamızın bazı sınırlılıkları olmuştu. Bunların başında, nedenleri yukarıda değinildiği gibi, SCE yönteminin somut verilerinin karşılaştırmalarda kullanılamamış

olması gelmektedir. Araştırmanın bir diğer kısıtlılığı ise, başlangıçta planlanandan daha az sayıda kişide analizlerin yapılmış olmasıdır. Bunun başlıca nedeninin araştırmaya dahil olma kriterlerinin ayrıntılı olmasına bağlı olarak bu kriterlere uyan çocukların kliniğimize başvurusunun önceden öngörülenden daha az olması ile ilişkili bulunmasıdır. Son olarak bu çalışmanın klinik yansımalarının daha farklı boyutta tartışılmasını sağlamak için, pasif içiciliğin yol açmış olabileceği diğer sağlık sorunlarının da araştırmada değerlendirilebilmesi yararlı olabilirdi. Gelecekte bu konularda araştırma yapacaklara ışık tutması açısından bu sınırlılıkların dikkate alınması önem taşımaktadır. Bütün bu yapılan ve önerilen analizler gelecekte çok sayıda bireyde ve şayet “pasif içici” konumundaki aile bireylerini de kapsayacak şekilde genişletilerek yapılabilirse ve bu kişilerin DNA onarım kapasitesi ölçülebilirse, “pasif içici”lik kavramı hakkındaki kuşkuları gidermede daha fazla yardımcı olabilecektir.

6. SONUÇLAR

Sunulan bu araştırmanın bulguları, kromozomal aberasyon yönteminin çocuklardaki pasif sigara içilmesine bağlı klastojenik etkiyi saptamada yeterli duyarlılığa sahip olmadığını düşündürmektedir. Nitekim, bu yöntemle genotoksisite analizi yapılan ve herhangi bir yapısal kromozomal anomali tespit edilememiş çocukların kanlarında, comet yöntemiyle gruplar arasında farklılık saptanmış olması, bu tespiti doğrulamaktadır. Öte yandan SCE tekniğinin de çocuklarda “pasif içiciliği” değerlendirmede yol açtığı metodolojik validasyonlar nedeniyle elverişli bir yöntem olmadığını düşündürmektedir. Bu konuda en rahat kullanılabilir tekniğin literatürde sigara dışında başka kontaminatlarında kısa süreli ya da eser miktarlarının yol açtığı genotoksisiteyi yansıtabilen comet tekniği olduğu görüşünü bu araştırmanın bulguları da desteklemektedir.

Sınırlı sayıdaki veriye dayanan comet analizinin bu araştırmadaki sonuçları, pasif içici konumundaki çocukların bu riske maruz kalmayanlara göre genotoksisite bakımından risk altında olduklarını kuvvetle düşündürmektedir. Bu araştırmanın ilk verileri ışığında ileride bu konuda comet yöntemiyle kapsamlı çalışmaların yapılması, daha somut yorumlara olanak sunabilecektir.

Son olarak, sigaranın çocuklarda pasif içiciliğe bağlı DNA hasarına yol açtığı bu çalışma ile de kesin olarak ispatlanmıştır. Dolayısıyla sigara dumanından arındırılmış yaşam alanlarının çocuklar için sağlanması şarttır. Çocukların bu kontaminanta maruz kalmalarının önlenmesi; bu konuda daha uygulanabilir yasal ve idari önlemlerin alınmasına, sorunların tespitine yardımcı ileri laboratuvar tekniklerinin geliştirilmesine /kullanılmasına ve çocukların sağlığı ile uğraşanların bu konuda kamuoyunu yeterince bilgilendirmesine bağlıdır.

7.ÖZET

Sigara başta olmak üzere tütün mamülleri, sadece kullanıcısının sağlığını tehdit etmekle kalmayıp, aynı zamanda bu tür maddeleri kullananlarla aynı mekanı paylaşan ve pasif içici durumunda kalan kişilerin sağlığını da önemli ölçüde tehdit etmektedir. Bu tehdidin muhataplarının başında çocuklar gelmektedir. Ebeveynleri sigara içen çocukların, solunum yolu hastalıkları başta olmak üzere akut ve kronik çok sayıda hastalığa yakalanma risklerinin hayli arttığı bilinmektedir. Örneğin, epidemiyolojik araştırmaların sonuçları, öyküsünde sigara içme ve akciğer kanseri bulunan ebeveynlerin çocuklarında başta nazal kanser olmak üzere, kanser gelişme riskinin artmış olduğunu bildirmektedir. Dolayısıyla, sigara dumanına maruz kalan pasif içici konumundaki çocuklarda oluşabilecek mutajenik etkinin araştırılması büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada söz konusu mutajenik riskin oluşup oluşmadığının tespitine yönelik olarak, pasif içici konumundaki çocuklar ile ev ortamında ebeveynleri sigara içmeyen çocukların DNA hasarı bakımından karşılaştırılması amaçlandı.

Araştırmada pasif içici konumundaki grupta ve kontrol grubunda yer alan tüm çocukların ebeveynlerine bazı sosyodemografik özelliklerini ve DNA hasarını değiştiren faktörleri sorgulamaya yönelik kısa bir anket uygulandı. Anketi yanıtlayan ailelerin çocukları arasında; yaşları 7 ile 10 arasında olan ve diğer sosyodemografik özellikleri benzeyen, ev ortamında ebeveynleri sigara içmeyen toplam 12 çocuğun ve ailesi sigara içen ve pasif içici konumundaki toplam 21 çocuğun periferal kan lenfositlerinde genotoksik etki, kromozomal aberasyon yöntemiyle (kromatid kırığı, kromatid gap ve kromozom kırığı, kromozom gap) karşılaştırıldı. Genotoksisitenin tespitinde son yıllarda çok daha duyarlı olduğu iddia edilen comet yöntemi de bu çalışmada denendi. Bunun için her iki gruptan rastgele yöntemiyle 5 çocuğun periferal

kan örnekleri kromozomal aberasyon yöntemiyle eş zamanlı olarak comet yöntemiyle de analiz edildi. Comet analizinde DNA hasarı yüzdesi görüntüleme analizi yöntemiyle kantitatif olarak değerlendirildi.

Sigara dumanına maruz kalan ve kalmayan grupların her ikisinde yer alan çocukların kromozomlarında kromozomal aberasyon yöntemi ile klastojenik etki saptanamadı. Buna karşın, her iki gruptan beşer çocuğun periferal kan lenfositlerinin comet analizinde ise, pasif içici grubunda yer alan çocuklarda; ortalama 9.11 ± 0.39 oranında, ev ortamında ebeveynleri sigara içmeyen çocuklarda ise; ortalama 7.00 ± 0.66 oranında DNA hasar yüzdesi tespit edildi. Anket verilerine göre araştırmaya katılan ve ortalama 8 yaşında olan bu çocukların aile gelir düzeyi ve aile eğitim düzeyi gibi bazı verileri “pasif içici” grupta kısmen daha düşük olmakla beraber, her iki grupta da yaş, cinsiyet, ailelerinin sosyoekonomik düzeyi vb. parametreler bakımından birbirlerine benzer özellikler gösterdikleri tespit edildi ($p>0.05$).

Sonuç olarak bu araştırmanın bulguları kromozomal aberasyon yönteminin çocuklardaki klastojenik etkiyi saptamada yeterli duyarlılığa sahip olmadığını düşündürmektedir. Nitekim, bu yöntemle genotoksisite analizi yapılan ve herhangi bir yapısal kromozomal anomali tespit edilememiş çocukların kanlarında, comet yöntemiyle gruplar arasında farklılık saptanmış olması, bu tespiti doğrulamaktadır. Öte yandan sınırlı sayıdaki veriye dayanan comet analizinin bu araştırmadaki sonuçları, pasif içici konumundaki çocukların bu riske maruz kalmayanlara göre genotoksisite bakımından risk altında olduklarını kuvvetle düşündürmektedir. Bu araştırmanın ilk verileri ışığında ileride bu konuda comet yöntemiyle kapsamlı çalışmaların yapılması, daha somut yorumlara olanak sunabilecektir.

8. EKLER

Ek 1:

Sigara İçen ve İçmeyen Ebeveynlerin Kendilerinin ve çocuklarının DNA'sında Olası Değişikliklerin Karşılaştırılmasında SİĞARA İÇENLERE Yönelik Hasta Anketi

“Bu anket, Sigara içen ve içmeyen ebeveynlerin çocuklarının DNA'sında olası değişiklikleri incelemeye yönelik bir araştırma içindir. Katılımınız sadece bu amaca hizmet edecektir ve herhangi bir sorumluluk veya endişe duymanıza gerek yoktur.”

Hastaya okundu

Hastanın Araştırma Sıra Numarası:

Tarih:.....

Anketörün Dikkatine aşığıdaki toplam 39 soruyu, evde 7-10 yaş arası çocuğu bulunan ve evlerinde günde en az 1 paket sigara iilenlere yöneltiniz. (Her iki grup içinde kişilerin kronik hastalıklarının olmaması ve son haftada ilaç kullanmıyor olmalarına ve bu çocukların herhangi bir vitamini düzenli kullanmıyor olmalarına özen gösteriniz). Ankette soruların yönlendirdiği gibi ilk bölümde yer alan soruları, bu ailede en ağır sigara içicisi konumundaki (günde 1 paket ve üstü sigara içen) aile bireyine yönelik olarak sorunuz. İkinci bölümdeki soruları ise, anne/baba/diğer ebeveynleri tarafından ev ortamında toplam, en az 1 paket sigara içilen, 7-10 yaş arası çocuğa yönelik olarak sorunuz. Aldığınız cevaplarda açık uçlu olanların yanıtını, ayrılan yere yazarak, diğerlerinin yanıtını ise ilgili alandaki kutucuğu (X) işaretleterek doldurunuz.

BÖLÜM I: (anne / baba / diğer ebeveynlerine yönelik)

1- Görüşme Yapılanın Araştırmaya Katılacak ocuğa Yakınlık Derecesi:

Anne **Baba** **Diğer Ebeveyn (ise açıkça belirtiniz:.....)**

2- Adınız ve Soyadınız nedir?

3- Kaç yaşındasınız?

4- Cinsiyetini yazınız: **E** **K**

5- Okuma yazma biliyor musunuz?

Hayır

Evet **“ise, En son bitirdiğiniz okul aşığıdakilerden hangisi”**

Okur-yazar

İlköğretim mezunu

Lise mezunu

Üniversite mezunu

6- Ne iş yapıyorsunuz? Kaç yıldır:.....

7- Eşiniz ne iş yapıyor?..... Kaç yıldır:

8-Eşiniz kaç yaşında?.....

9-Eşiniz okuma yazma biliyor mu?

Hayır

Evet **“ise, En son bitirdiği okul aşığıdakilerden hangisi”**

Okur-yazar

İlköğretim mezunu

Lise mezunu

Üniversite mezunu

10- Ailenizin aylık ortalama geliri kaç YTL?

500 veya altında 501-1000 1001-1500 1501-2000 2000 üstü

11- İkamet adresiniz: İl:.....

İlçe:.....

Mahalle:.....

Sokak:.....

Telefon:.....

Ne zamandır bu adreste oturuyorsunuz:.....

12- Sosyal güvenceniz var mı?

Hayır yok

Evet var **“ise, Sosyal güvenceniz aşağıdakilerden hangisi”**

Emekli Sandığı

Bağ Kur

SSK

Yeşil Kart

Özel Sağlık sigortası

Diğer **“ belirtiniz”**

13- Günde içtiğiniz toplam sigara adedi ortalama nedir?:.....

14-Ne zamandır bu miktarda sigara içiyorsunuz?.....

15- Ne zamandır sigara içiyorsunuz?:.....

16- Sigara dışında başka tütün ürünü kullanıyor musunuz?

Hayır

Evet (ise, ne olduğunu ve günlük miktarını belirtiniz:...../.....)

17- Evde sizden başka sigara içen ve aynı evde ikamet eden birileri var mı?

Hayır Evet (ise, Kaç kişi:..... Kim(ler):.....; Evde içilen toplam sigara miktarı/gün tahminen ne kadardır?.....)

18-Evde sizden ve ikamet eden diğer aile bireylerinden başka (düzenli olarak evinize gelen) ve sigara içen yakın(lar)ınız var mı? Hayır Evet (ise, Kim(ler):.....; Sizin evinizde içtikleri toplam sigara miktarı/gün tahminen ne kadardır?.....)

19- Alkol kullanıyor musunuz? Hayır

Evet

içersiniz:.....
nedir?...../.....)

ve

İçilen

(ise, çoğunlukla
miktar/içme

ne
sıklığınız

20- Çay/kahve içme alışkanlığınız var mı? Hayır Evet (ise, çoğunlukla neyi tercih ediyorsunuz:..... ve İçilen miktar/gün...../.....)

21- Aile bireylerinde veya sizde genetik bir hastalık var mı?

Hayır

Evet (ise, Nedir.....)

22- Daha önce geçirdiğiniz bir rahatsızlık sebebiyle ameliyat oldunuz mu?

Hayır

Evet (ise, Rahatsızlığınız neydi?:..... ve Ne zaman ameliyat oldunuz?:.....)

23- Günlük vitamin kullanma alışkanlığımız var mı? Hayır

Evet

(ise, Ne kullanıyorsunuz?:..... Hangi sıklıkta?:..... Ne kadar zamandır?:.....)

24- Düzenli olarak kullandığınız bitkisel bir ürün var mı? Hayır Evet (ise, Ne kullanıyorsunuz?:.....Ne amaçla?:..... Hangi sıklıkta?:..... Ne kadar zamandır?:.....)

25- Akraba evliliği mi yaptınız? Hayır Evet (ise, derecesi nedir:.....)

26- Eviniz salon dahil kaç odalıdır?: (..... oda)

27- Evinizde araştırmaya dahil olacak çocuğunuzun ayrı bir odası var mı? Hayır Evet (ise, bu odada da sigara içildiği oluyor mu?:.....)

28- Evinizin ısıtma sistemi nedir?

- Kömür sobası Odun sobası Doğal Gaz sobası Elektrikli ısıtıcı
Merkezi Kalorifer Kat Kalorifer Diğer (belirtiniz:.....)

29- Evinizde özel havalandırma sistemi var mı? Hayır Evet(ise, nedir:.....)

30- Evinizde toplam kaç kişi yaşamaktadır?:.....

BÖLÜM II: (7-10 Yaş arası çocuğa yönelik)

31- Yedi ile on yaş arası kaç çocuğunuz var:.....

32- Araştırmaya alınan çocuğunuzun tam olarak doğum tarihi nedir?:/...../.....

33- Araştırmaya alınan çocuğunuz, günde tam olarak evde kaç saatini geçiriyor?:.....

34- Araştırmaya alınan çocuğunuzun cinsiyeti nedir? **E** **K**

35- Araştırmaya alınan çocuğunuz sigara içiyor mu?
Hayır Evet (ise, ne miktarda/gün:.....)

36- Araştırmaya alınan çocuğunuz alkol içiyor mu?
Hayır Evet (ise, ne miktarda/gün:.....)

37- Araştırmaya alınan çocuğunuzun çay/kahve içme alışkanlığı var mı?
Hayır Evet (ise, çoğunlukla neyi tercih ediyor:..... ve İçilen miktar/gün...../.....)

38- Araştırmaya alınan çocuğunuz daha önce geçirdiği bir rahatsızlık sebebiyle ameliyat oldu mu? Hayır Evet (ise, Rahatsızlığı neydi?:..... ve Ne zaman ameliyat oldu?:.....)

39- Araştırmaya alınan çocuğunuz düzenli olarak bitkisel bir ürün kullanıyor mu?
Hayır Evet (ise, Ne kullanıyor?:.....

Ne amaçla?:..... Hangi sıklıkta?:..... ve Ne kadar zamandır?:.....)

***** *Bu ankete katıldığınız için teşekkür ederiz.* *****

Ek-2:
Sigara İçen ve İçmeyen Ebeveynlerin Kendilerinin ve Çocuklarının
DNA'sında Olası Değişikliklerin Karşılaştırılmasında SİGARA
İÇMEYENLERE Yönelik Hasta Anketi

“Bu anket, Sigara içen ve içmeyen ebeveynlerin çocuklarının DNA'sında olası değişiklikleri incelemeye yönelik bir araştırma içindir. Katılımınız sadece bu amaca hizmet edecektir ve herhangi bir sorumluluk veya endişe duymanıza gerek yoktur.”

Hastaya okundu

Hastanın Araştırma Sıra Numarası:

Tarih:.....

Anketörün Dikkatine aşağıdaki toplam 34 soruyu, evde 7-10 yaş arası çocuğu bulunan ve evlerinde sigara içilmeyenlere yöneltiniz. (Her iki grup içinde kişilerin kronik hastalıklarının olmaması ve son haftada ilaç kullanmıyor olmalarına ve bu çocukların herhangi bir vitamini düzenli kullanmıyor olmalarına özen gösteriniz). Ankette soruların yönlendirdiği gibi ilk bölümde yer alan soruları, aile bireyine yönelik olarak sorunuz. İkinci bölümdeki soruları ise, 6-10 yaş arası çocuğa yönelik olarak sorunuz. Aldığınız cevaplarda açık uçlu olanların yanıtını, ayrılan yere yazarak, diğerlerinin yanıtını ise ilgili alandaki kutucuğu (X) işaretleyerek doldurunuz.

BÖLÜM I: (anne / baba / diğer ebeveynlerine yönelik)

1- Görüşme Yapılanın Araştırmaya Katılacak Çocuğa Yakınlık Derecesi:

Anne **Baba** **Diğer Ebeveyn (ise açıkça belirtiniz:.....)**

2- Adınız ve Soyadınız nedir?

3- Kaç yaşındasınız?

4- Cinsiyetini yazınız: E K

5- Okuma yazma biliyor musunuz?

Hayır

Evet **“ise, En son bitirdiğiniz okul aşağıdakilerden hangisi”**

Okur-yazar

İlköğretim mezunu

Lise mezunu

Üniversite mezunu

6- Ne iş yapıyorsunuz? **Kaç yıldır:**.....

7- Eşiniz ne iş yapıyor?..... **Kaç yıldır:**

8-Eşiniz kaç yaşında?.....

9-Eşiniz okuma yazma biliyor mu?

Hayır

Evet **“ise, En son bitirdiği okul aşağıdakilerden hangisi”**

Okur-yazar

İlköğretim mezunu

Lise mezunu

Üniversite mezunu

10- Ailenizin aylık ortalama geliri kaç YTL?

500 veya altında

501-1000 1001-1500

1501-2000 2000 üstü

11- İkamet adresiniz: İl:..... İlçe:.....
Mahalle:..... Sokak:..... Telefon:.....
Ne zamandır bu adreste oturuyorsunuz:.....

12- Sosyal güvenceniz var mı?
 Hayır yok
 Evet var **“ise, Sosyal güvenceniz aşağıdakilerden hangisi”**
 Emekli Sandığı
 Bağ Kur
 SSK
 Yeşil Kart
 Özel Sağlık sigortası
 Diğer **“ belirtiniz”**

13- Sigara içilen ortamlarda sıkça bulunuyor musunuz?
 Hayır Evet (ise,günün ortalama kaç saatinde bu ortamlarda bulunuyorsunuz:...../.....)

14- Alkol kullanıyor musunuz? Hayır Evet (ise,çoğunlukla ne içersiniz:..... ve İçilen miktar/içme sıklığınız nedir?...../.....)

15- Çay/kahve içme alışkanlığınız var mı? Hayır Evet (ise, çoğunlukla neyi tercih ediyorsunuz:..... ve İçilen miktar/gün...../.....)

16- Aile bireylerinde veya sizde genetik bir hastalık var mı?
 Hayır Evet (ise,Nedir.....)

17- Daha önce geçirdiğiniz bir rahatsızlık sebebiyle ameliyat oldunuz mu?
 Hayır Evet (ise, Rahatsızlığınız neydi?..... ve Ne zaman ameliyat oldunuz?.....)

18- Günlük vitamin kullanma alışkanlığınız var mı? Hayır Evet (ise, Ne kullanıyorsunuz?..... Hangi sıklıkta?..... Ne kadar zamandır?.....)

19- Düzenli olarak kullandığınız bitkisel bir ürün var mı? Hayır Evet (ise, Ne kullanıyorsunuz?.....Ne amaçla?..... Hangi sıklıkta?..... Ne kadar zamandır?.....)

20- Akraba evliliği mi yaptınız? Hayır Evet (ise, derecesi nedir:.....)

21- Eviniz salon dahil kaç odalıdır?: (..... oda)

22- Evinizde araştırmaya dahil olacak çocuğunuzun ayrı bir odası var mı? Hayır
Evet (ise, bu odada da sigara içildiği oluyor mu?:.....)

23- Evinizin ısıtma sistemi nedir?

Kömür sobası Odun sobası Doğal Gaz sobası Elektrikli ısıtıcı
Merkezi Kalorifer Kat Kalorifer Diğer (belirtiniz:.....)

24- Evinizde özel havalandırma sistemi var mı? Hayır Evet (ise, nedir:.....)

25- Evinizde toplam kaç kişi yaşamaktadır?:.....

BÖLÜM II: (7-10 Yaş arası çocuğa yönelik)

26- Düzenli olarak evinize gelen ve sigara içen yakın(lar)ınız var mı? Hayır Evet (ise, Kim(ler):.....; Sizin evinizde içtikleri toplam sigara miktarı/gün tahminen ne kadardır?:.....)

27- Yedi ile on yaş arası kaç çocuğunuz var:.....

28- Araştırmaya alınan çocuğunuzun tam olarak doğum tarihi nedir?:/...../.....

29- Araştırmaya alınan çocuğunuz, günde tam olarak evde kaç saatini geçiriyor?:.....

30- Araştırmaya alınan çocuğunuzun cinsiyeti nedir? **E** **K**

31- Araştırmaya alınan çocuğunuz alkol içiyor mu?
Hayır Evet (ise, ne miktarda/gün:.....)

32- Araştırmaya alınan çocuğunuzun çay/kahve içme alışkanlığı var mı?
Hayır Evet (ise, çoğunlukla neyi tercih ediyor:..... ve İçilen miktar/gün...../.....)

33- Araştırmaya alınan çocuğunuz daha önce geçirdiği bir rahatsızlık sebebiyle ameliyat oldu mu? Hayır Evet (ise, Rahatsızlığı neydi?:..... ve Ne zaman ameliyat oldu?:.....)

34- Araştırmaya alınan çocuğunuz düzenli olarak bitkisel bir ürün kullanıyor mu?

Hayır Evet (ise, Ne kullanıyor?:.....)

Ne amaçla?:..... Hangi sıklıkta?:..... ve

Ne kadar zamandır?:.....)

***** **Bu ankete katıldığınız için teşekkür ederiz.** *****

9. KAYNAKLAR

- 1-Vineis P, Hoek G, Krzyzanowski M, et al. Lung cancers attributable to environmental tobacco smoke and air pollution in non-smokers in different European countries: a prospective study. *Environ Health*. 2007;6:1-7.
- 2-Giovino GA. The tobacco epidemic in the United States. *Am J Prev Med*. 2007;33(6 Suppl):S318-26.
- 3- Barcala FJG, Takkouche B, Valdés L, Temes E, Leis R, Cabanas R, Suárez JRR, Tojo R. Parenteral smoking and lung function in healthy children and adolescents. *Arch. Bronconeumol*. 2007;43(2): 81-85.
- 4-Karlıkaya C. Sigara ve meslek. *Solunum* 2004;6(6):262-275.
- 5- Karlıkaya C, Öztuna F, Solak ZA, Özkan M, Örsel O. Tütün kontrolü. *Toraks Dergisi*. 2006;7(1):51-64.
- 6-Kayaalp SO, Güven H. Nikotin ve diğer ganglion stimüle ediciler, sigara ve sağlık, ganglion bloke edici ilaçlar: Kayaalp Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 2.Cilt s:106-1016. Onbirinci baskı; Kayaalp SO. ed, Hacettepe-Taş, Ankara. 2005.
- 7-Mohankumar MN, Janani S, Prabhu BK, Kumar PRV, Jeevanram RK. DNA damage and integrity of UV-induced DNA repair in lymphocytes of smokers analysed by the comet assay. *Mutat Res*. 2002;520(1-2):179-87.
- 8-Neri M, Bonassi S, Knudsen LE, Sram RJ, Holland N, Ugolini D, Merlo DF. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. I. Overview and critical issues. *Mutat Res*. 2006;612(1):1-13.
- 9- Neri M, Ugolini D, Bonassi S, Fucic A, Holland N, Knudsen LE, Srám RJ, Ceppi M, Bocchini V, Merlo DF. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. II. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutat Res*. 2006;612(1):14-39.
- 10- Wu FY, Wu HD, Yang HL, Kuo HW, Ying JC, Lin CJ, Yang CC, Lin LY, Chiu TH, Lai JS. Associations among genetic susceptibility, DNA damage, and pregnancy outcomes of expectant mothers exposed to environmental tobacco smoke. *Sci Total Environ*. 2007;386(1-3):124-33.
- 11-Sardas S, Karahalil B, Akyol D, Kukner S, Karakaya AE.: The effect of smoking on sister chromatid exchange rate of newborn infants born to smoking mothers. *Mutat Res*. 1995;341(4):249-253.
- 12-Akbaş E, Çelik A, Derici E, Söylemez F. Sigara kullanımının lenfosit yaşam süresi ve genotoksik etkilerinin incelenmesi. *Geriatri* 2001;4(1):15-18.

- 13-**Türk Kardiyoloji Derneği. Türkiye Kalp Raporu 2000. İstanbul: Yenilik Basımevi: 2000.
- 14-** Satman I, Yılmaz T, Sengul A, et al. Population based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the Turkish Diabetes Epidemiology Study (TURDEP), *Diabetes Care* 2002;25:1551-6.
- 15-**WHO Report on The Global Tobacco Epidemic, p:19, 2008
<<http://www.who.int/tobacco/mpower/en/>>
- 16-**Hawamdeh A, Kasasbeh FA, Ahmad MA. Effects of passive smoking on children's health: a review. *East Mediterr Health J.* 2003;(3):441-7.
- 17-**Fracasso ME, Doria D, Franceschetti P, Perbellini L, Romeo L. DNA damage and repair capacity by comet assay in lymphocytes of white-collar active smokers and passive smokers (non- and ex-smokers) at workplace. *Toxicol Lett.* 2006;167(2): 131-41.
- 18-**Sorsa M, Husgafvel-Pursiainen, Jarventaus H, Koskimies K, Salo H, Vainio H. Cytogenetic effects of tobacco smoke exposure among involuntary smokers. *Mutat Res.* 1989;222(2):111-6.
- 19-** Ekerbicer HC, Celik M, Guler E, Davutoglu M, Kilinc M. Evaluating environmental tobacco smoke exposure in a group of Turkish primary school students and developing intervention methods for prevention. *BMC Public Health.* 2007;7(147):202.
- 20-** Janson C. The effect of passive smoking on respiratory health in children and adults. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2004 May;8(5):510-6.
- 21-**Ayata A, Çetin H, Öktem F, Akaya A, Tunç B, Örmeci AR. Pasif sigara içiminin çocuklarda solunum fonksiyonlarına etkisi. *Tıp Araştırma Dergesi* 2004;2(2):13-15.
- 22-** Jarvis MJ, Goddard E, Higgins V, Feyerabend C, Bryant A, Cook DG. Children's exposure to passive smoking in England since the 1980s: cotinine evidence from population surveys. *BMJ.* 2000;321(7257):343-5.
- 23-**Tang D, Warburton, Tannenbaum SR, et al. Molecular and genetic damage from environmental tobacco smoke in young children. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8(5):427-31.
- 24-**Tager IB. Health effects of “passive smoking” in children. *Chest* 1989;95(5): 1161-1166.
- 25-** Neri M, Bonassi S, Knudsen LE, Sram RJ, Holland N, Ugolini D, Merlo DF. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. I. Overview and critical issues. *Mutat Res.* 2006;612(1):1-13.

- 26-** Dabson R. Passive smoking increases children's risk of nasal cancer. *BMJ* 2005;331:534-535.
- 27-** Costa DL. Air Pollution. Kendall RJ, Anderson TA, Baker RJ, et al. *Ecotoxicology*. Chapter: 28 and 29. Casarett and Doull's *Toxicology The Basic Science of Poisons*. Sixth ed. Klaassen CD. Ed. McGraw-Hill NY; p:977-1046. 2001.
- 28-** Michalska J, Motykiewicz G, Pendzich J, Kalinowska E, Midro A, Chorazy M. Measurement of cytogenetic endpoints in women environmentally exposed to air pollution. *Mutat Res*. 1999;445(2):139-45.
- 29-** Vineis P, Husgafvel-Pursiainen K. Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis*. 2005;26(11):1846-55.
- 30-** Palma S, Cornetta T, Padua L, Cozzi R, Appolloni M, Ievoli E, Testa A. Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on genotoxic effects induced by tobacco smoke. *Mutat Res*. 2007; 633(1):1-12.
- 31-** Rossner P, Boffetta P, Ceppi M, Bonassi S, Smerhovsky Z, Landa K, Juzova D, Srám RJ. Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer. *Environ Health Perspect*. 2005;113(5):517-20.
- 32-** Ezzati M, Lopez AD. Estimates of global mortality attributable to smoking in 2000. *Lancet* 2003;362:847-852
- 33-** WHO. Regional Office for Europe. European strategy for tobacco control. 2002, Copenhagen, WHO.
- 34-** T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Sağlık İşleri Dairesi Başkanlığı Genelge: 4207 sayılı Kanunun Uygulanması 1996/76 .
- 35-** T.C. Resmi Gazete- Kanun: Tütün mamullerinin zararlarının önlenmesine dair kanunda değişiklik yapılması kanunu. Sayı: 26761. 19 Ocak 2008.
- 36-** Phillips D.H.: Smoking- related DNA and protein adducts in human tissues. *Carcinogenesis*. 2002;23(12):1979-2004.
- 37-** Zalata A, Yahia S, El-Bakary A, Elsheikha HM. Increased DNA damage in children caused by passive smoking as assessed by comet assay and oxidative stress. *Mutat Res*. 2007;629(2):140-7.
- 38-** Özge C, Toros F. Is there any relationship between attention deficit hyperactivity disorder and smoking during pregnancy and second hand smoking? *Akciğer Arşivi* 2006;7:49-52.
- 39-** National Toxicology Program. 10th Report on Carcinogens. Washington DC:US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program,; 2002.

40-T.C. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı Genelgesi. B100KSD0000071/3800-15. / 06 Ocak 2006.

41- Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, Hagmar L, Strömberg U, Rössner P, Boffetta P, Lindholm C, Gundy S, Lazutka J, Cebulska-Wasilewska A, Fabiánová E, Srám RJ, Knudsen LE, Barale R, Fucic A. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res.* 2006;600(1-2):37-45

42-Obe G, Vogt HJ, Madle S, Fahning A, Heller WD. Double-blind study on the effect of cigarette smoking on the chromosomes of human peripheral blood lymphocytes in vivo. *Mutat Res.* 1982;92(1-2):309-19.

43-Rowland RE, Harding KM. Increased sister chromatid exchange in the peripheral blood lymphocytes of young women who smoke cigarettes. *Hereditas.* 1999;131(2): 143-6.

44-Boyacı H, Büyükgöze B, Başığit İ, Yıldız F, Ilgazlı A, Duman C. Fetustaki sigara dumanı maruziyetinin kord kanı kotinin düzeyi ile değerlendirilmesi. *Toraks Dergisi* 2006;7(2):115-119.

45- Salonen K, Lahdetie J. No effect of maternal smoking in early pregnancy observed on chromosome aberrations in chorionic villus samples. *Mutat Res.* 1993;298(4):285-9.

46- de la Chica RA, Ribas I, Giraldo J, Egozcue J, Fuster C. Chromosomal instability in amniocytes from fetuses of mothers who smoke. *JAMA.* 2005;293(10):1212-22.

47- Sasikala K, Rosalin FR, Jude ALC, Kumar RA, Sudha S, Devi MV, Balachandar N, Beegam KAS, Meenakshi NM, Begum A. Active and passive smokers – a haematobiochemical and cytogenetic study. *Int J Hum Genet.* 2003;3(1):29-32.

48- Pluth JM, Ramsey MJ, Tucker JD. Role of maternal exposures and newborn genotypes on newborn chromosome aberration frequencies. *Mutat Res.* 2000;465(1-2): 101-11.

49-Sardas S., Gok S., Karakaya A.E.: Increased frequency of sister chromatid exchanges in the peripheral lymphocytes of cigarette smokers. *Toxicol. In Vitro*, 1991;5: 263-265.

50-Sardas S, Walker D, Akyol D, Karakaya AE.: Assessment of smoking-induced DNA damage in lymphocytes of smoking mothers of newborn infants using the alkaline single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat Res.* 1995;335(3):213-217.

51-Debeleş-Bütüner B, Kantarcı G. Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi. *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 2006;35(2):149-170.

- 52-** Preston RJ, Hoffman GR. Genetic toxicology. Chapter:3/9. Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons. Sixth ed. Klaassen CD. Ed. McGraw-Hill NY; p:321-350. 2001.
- 53-** Hedner K, Högstedt B, Kolnig AM, Mark-Vendel E, Strömbeck B, Mitelman F. Sister chromatid exchanges and structural chromosome aberrations in relation to smoking in 91 individuals. *Hereditas*. 1983;98(1):77-81.
- 54-** Stephan G, Pressl S. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes from healthy subjects as detected in first cell division. *Mutat Res*. 1999;446(2):231-7.
- 55-** Albers AB, Siegel M, Cheng DM, Rigotti NA, Biener L. Effects of restaurant and bar smoking regulations on exposure to environmental tobacco smoke among Massachusetts adults. *Am J Public Health*. 2004;94(11):1959-64.
- 56-** Brusick D. Principles of Genetic Toxicology, second ed., Plenum Pres, NY, London 1987.
- 57-** Aitio A. Biomarkers and Their Use in Occupational Medicine, Human Monitoring After Environmental and Occupational Exposure to Chemical and Physical Agents. D. Anderson et al. Ios Pres, 12-21.2000.
- 58-** Dizdaroğlu M, Karakaya AE: Advances in DNA Damage and Repair, Plenum Pub. 181-191, 1997.
- 59-** Tucker JD, Preston RJ:Chromozome aberrations, mikronüklei, aneuploidy, sister chromotid exchanges and cancer risk assessment. *Mutation Research* 1996;365:147-159.
- 60-** Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M.Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*. 2006;88(11):1515-31.
- 61-** Hagmar L, Brogger A, Hansteen IL, Heim S, Hogstedt B, Knudsen L, Lambert B, Linnainmaa K, Mitelman F, Nordenson I. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic Study Group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res*. 1994;54(11):2919-22.
- 62-** Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*. 2004;26(3):249-61.
- 63-** Wolff S., Perry P.: Differential giemsa staining of sister chromatids and the study of SCE without autoradiography. *Chromosoma*. 1974;48: 341-353.
- 64-** Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R. Comparative studies by comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects. *Mutat Res*. 1995;343(4):201-7.

- 65-** Betti C, Davini T, Giannessi L, Loprieno N, Barale R. Microgel electrophoresis assay (comet test) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res.* 1994;307:323-333.
- 66-** Anderson D, Yu TW, Phillips BJ, Schmezer P. The effect of various antioxidants and other modifying agent on oxygen-radical generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat Res.* 1994;307:261-271.
- 67-** Schwartz J, Weiss ST. Host and environmental factors influencing the peripheral blood leukocyte count. *Am. J. Epidemiol.* 1991;134:1402-1409.
- 68-** Fairbain DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: A comprehensive review *Mutat Res.* 1995;339:37-59.