

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HİPOFİZ ADENOMLU HASTALARDA
OKSİDATİF VE KROMOZOMAL DNA HASARININ
SİTOM YÖNTEMİ VE 8-OHdG ÖLÇÜMÜ İLE
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Nazmiye BİTGEN**

**Danışman
Prof.Dr.Hamiyet DÖNMEZ-ALTUNTAŞ**

Doktora Tezi

**Ağustos 2013
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**HİPOFİZ ADENOMLU HASTALARDA
OKSİDATİF VE KROMOZOMAL DNA HASARININ
SİTOM YÖNTEMİ VE 8-OHdG ÖLÇÜMÜ İLE
ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Nazmiye BİTGEN**

**Danışman
Prof.Dr.Hamiyet DÖNMEZ-ALTUNTAŞ**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TSD- 10- 3327 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Doktora Tezi

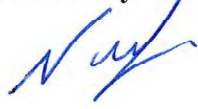
**Ağustos 2013
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

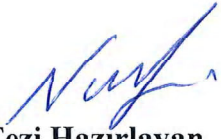
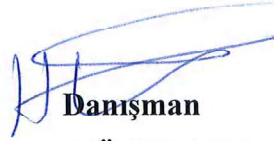
Adı-Soyadı: Nazmiye BİTGEN

İmza :



YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Hipofiz Adenomlu Hastalarda Oksidatif ve Kromozomal DNA hasarının Sitom yöntemi ve 8-OHdG ölçümü ile Araştırılması” adlı Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

**Tezi Hazırlayan****Nazmiye BİTGEN****Danışman****Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ-ALTUNTAŞ****Anabilim Dalı Başkanı****Prof. Dr. Halit CANATAN**

Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ danışmanlığında **Nazmiye BİTGEN** tarafından hazırlanan “**Hipofiz Adenomlu Hastalarda Oksidatif ve Kromozomal DNA hasarının Sitom yöntemi ve 8-OHdG ölçümü ile Araştırılması**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji** Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

12/08/ 2013

JÜRİ**İmza**

Danışman : Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ

Üye : Prof.Dr.Halit CANATAN

Üye : Prof.Dr.Fahri BAYRAM

Üye : Yrd.Doç.Dr.İzzet YELKOVAN

Üye : Yrd.Doç.Dr.Zuhal HAMURCU

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında ve akademik eğitimimde emek ve yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ-ALTUNTAŞ'a, değerli yardımlarıyla ve katkılarıyla destek olan Prof. Dr. Fahri BAYRAM' a, doktora eğitimim ve tez çalışmam boyunca ihtiyaç duyduğum her zaman bana destek olan Yrd. Doç. Dr. Zuhâl HAMURCU'ya, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki diğer tüm öğretim üyelerine, laboratuvar çalışmalarımda büyük yardımlarını gördüğüm doktora öğrencimiz Fatma ŞAHİN'e, tez çalışmam süresince manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, başta canım arkadaşım Armağan CANER olmak üzere diğer tüm arkadaşlarıma,

Ayrıca maddi ve manevi yönden emeklerini esirgemeyen, hayatım boyunca bana güç veren, bütün sıkıntılarıma katlanan ve bana her konuda destek veren, bu süreci beraber paylaştığım çok sevgili eşim Veysel BİTGEN'e, kızım Tuba BİTGEN'e ve çok değerli aileme saygı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**HİPOFİZ ADENOMLU HASTALARDA
OKSİDATİF VE KROMOZOMAL DNA HASARININ
SİTOM YÖNTEMİ VE 8-OHdG ÖLÇÜMÜ İLE ARAŞTIRILMASI**

Nazmiye BİTGEN

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi, Ağustos 2013
Danışman: Prof.Dr. Hamiyet Dönmez-ALTUNTAŞ**

KISA ÖZET

Hipofiz adenomları genellikle yavaş büyüyen iyi huylu tümörlerdir ve klinik, patolojik ve biyolojik olarak diğer beyin tümörlerinden farklılık gösterirler. Bu çalışmanın amacı en sık görülen hipofiz adenomlarından prolaktinoma, akromegali ve non fonksiyone adenomlu hastalarda, salgılanan farklı hormonların DNA hasarı üzerine etkisini Sitokinez-bloke mikronükleus sitom (Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome; CBMN cyt) ve 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) yöntemlerini kullanarak araştırmaktır.

Çalışmada, yeni teşhis konulmuş ve herhangi bir tedavi almamış 30 akromegali, 27 prolaktinoma ve 30 non-fonksiyone adenom olmak üzere 87 hasta ile hastalarla benzer yaş ve cinsiyette toplam 35 sağlıklı bireyin kan örnekleri analiz edilmiştir. Hipofiz adenomlu hastaların hepsinde de DNA hasar parametrelerinden olan mikronükleus (MN), nükleoplazmik köprü (nucleoplasmic bridges; NPB) ve nükleer tomurcuk (nuclear buds; NBUD) ile apoptotik ve nekrotik hücre frekansları kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Akromegalili ve prolaktinomali hastaların nükleer bölünme indeksi (nuclear division index; NDI) değerleri kontrollerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamazken ($p>0.05$), non-fonksiyone adenomlu hastalarda kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). Ayrıca akromegali ve prolaktinomali hastaların plazma 8-OHdG değerleri kontrollerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunurken ($p<0.005$), non-fonksiyone adenomlu hastalarda kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.001$).

Sonuç olarak, artan kromozomal ve oksidatif DNA hasarı parametreleri, hipofiz adenomlu hastalarda ileride gelişebilecek olası kanser riski ile ilişkili olabilir. Ancak hipofiz adenomu gelişimi ve karsinogenez oluşumu çok basamaklı ve multifaktöriyel bir süreçtir. Bu nedenle hipofiz adenomlu hastaların kanser riski açısından özellikle DNA hasar parametreleri ile uzun süreli olarak takip edilmesini önerebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Hipofiz adenomu, Mikronükleus, Oksidatif hasar, Sitom yöntemi.

**INVESTIGATION OF OXIDATIVE AND CHROMOSOMAL DNA DAMAGE
BY CYTOME ASSAY AND 8-OHdG MEASUREMENT
IN PATIENTS WITH PITUITARY ADENOMAS**

Nazmiye BITGEN

**Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Medical Biology
PhD. Thesis, August 2013
Supervisor: Prof. Dr. Hamiyet Donmez-ALTUNTAS**

ABSTRACT

Pituitary adenomas are generally benign and slow growing tumors with clinical, pathological and biological characteristics different from the others. However, the effects of the released pituitary hormones on the DNA damage in adenoma cells are still unknown. The aim of this study was to investigate such effects in especially prolactinoma, acromegaly and non-functional adenomas by using the latest Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome (CBMN cyt) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) assay methods.

The study was carried out using blood samples of active untreated 87 patients: 30 with acromegaly, 27 with prolactinoma and 30 with non-functional adenoma in addition to total 35 age- and sex-matched healthy controls. The DNA damage parameters (micronucleus; MN, nucleoplasmic bridges; NPBs and nuclear buds; NBUDs) and the frequency of apoptotic and necrotic cells in lymphocytes of patients with pituitary adenomas were found to be significantly higher than those in controls ($p < 0.001$). When compared with control subjects, statistically significant differences in nuclear division index (NDI) values were observed in patients with non-functional adenoma ($p < 0.001$), but no statistically significant differences in NDI values were observed in patients with acromegaly and prolactinoma ($p > 0.05$). The plasma 8-OHdG levels were found to be significantly higher ($p < 0.005$) in patients with acromegaly and prolactinoma and significantly lower ($p < 0.001$) in patients with non-functional adenoma when compared with those in controls.

In conclusion, both elevated chromosomal DNA and oxidative DNA damage can be used as potential biomarkers for predicting the increased risk of malignancy in patients with pituitary adenomas. However, the progression of pituitary adenomas and carcinogenesis are multistep and multifactorial process. Long-term follow-up of patients with pituitary adenomas would still be necessary to establish the cancer risk especially with DNA damage parameters.

Keywords : Cytome assay; Micronucleus; Oxidative damage; Pituitary adenoma.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLO LİSTESİ	x
KISALTMALAR	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.TARİHÇE	3
2.2. HİPOFİZ BEZİ ANATOMİSİ	3
2.3. HİPOFİZ BEZİ FİZYOLOJİSİ	4
2.4. HİPOFİZ ADENOMLARININ EPİDEMİYOLOJİSİ	5
2.5. HİPOFİZ ADENOMU FİZYOPATOLİJİSİ	6
2.6. HİPOFİZ ADENOMLARININ SINIFLANDIRILMASI	6
2.6.1. Histolojik sınıflandırma	6
2.6.2. Fonksiyonel sınıflandırma	6
2.6.3. İmmünohistokimyasal sınıflandırma	7
2.6.4. Radyolojik sınıflandırma	7
2.7. HİPOFİZ ADENOMLARI	7
2.7.1. Prolaktinoma	7
2.7.2. Akromegali	8
2.7.3. Non-Fonksiyone Adenom	10

	<u>Sayfa no</u>
2.8. DNA HASARI	10
2.9. SİTOKİNEZ BLOKE MİKRONUKLEUS SİTOM (CYTOME; cyt) YÖNTEMİ... 11	11
2.10. CBMN CTY YÖNTEMİ İLE HÜCRELERİ TANIMLAMA KRİTERLERİ	13
2.11. OKSİDATİF STRES	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. GEREÇLER	21
3.2. YÖNTEM.....	23
4. BULGULAR	30
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	49
6. KAYNAKLAR	56
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Oksijen Radikallerinin endojen ve eksojen kaynakları	19
Tablo 4.1. Akromegalili hasta ve kontrollere ait yaş, IGF-1 düzeyleri, hipofiz adenom büyüklükleri, CBMN cyt yöntemi parametreleri ve plazma 8-OHdG seviyeleri sonuçları (ort $\pm$ S.S.).....	32
Tablo 4.2. Akromegalili hasta ve kontrollerde CBMN cyt yöntemi parametreleri ve plazma 8-OHdG seviyeleri ile yaş, hipofiz adenom büyüklüğü ve serum IGF-1 düzeyleri arasındaki korelasyon sonuçları	33
Tablo 4.3. Prolaktinomalı hastalara ve kontrollere ait yaş, PRL seviyeleri, hipofiz adenom büyüklükleri,CBMN cyt yöntemi parametreleri ve plazma 8-OHdG seviyeleri ortalamaları (ort $\pm$ S.S.)	38
Tablo 4.4. Prolaktinomalı hasta ve kontrollerde CBMN cyt yöntemi parametreleri ve plazma 8-OHdG seviyeleri ile yaş, hipofiz adenom büyüklüğü (mm) ve PRL seviyeleri arasındaki korelasyon sonuçları.....	39
Tablo 4.5. Non-fonksiyone adenomlu hastalara ve kontrollere ait yaş, hipofiz adenom büyüklükleri, CBMN cyt yöntemi parametreleri ve plazma 8-OHdG seviyeleri sonuçları (ort $\pm$ S.S.)	43
Tablo 4.6. Non-fonksiyone adenomlu hastalarda ve kontrollerde CBMN cyt yöntemi parametreleri ve plazma 8-OHdG seviyeleri ile yaş ve hipofiz adenom büyüklüğü (mm) arasındaki korelasyon sonuçları.....	44
Şekil 2.1. Hipofiz bezi ve anatomisi.....	4
Şekil 2.2. Hormon salgılayan hücrelerin hipofiz bezi içerisinde topografik dağılımı	5
Şekil 2.3. Çeşitli sitotoksik ve genotoksik ajanlara maruz kaldıktan sonra, kültüre edilmiş sitokinez-bloke hücrelerin olası kaderi	13
Şekil 2.4. BN hücre içindeki MN'nin morfolojik görüntüsü	14
Şekil 2.5. BN hücre içindeki NPB'nin morfolojik görüntüsü	15
Şekil 2.6. BN hücre içindeki NBUD' un morfolojik görüntüsü.....	16
Şekil 2.7. Bir ve çok çekirdekli hücrelerin morfolojik görüntüsü	16
Şekil 2.8. Apoptotik hücrelerin morfolojik görüntüsü	18
Şekil 2.9. Nekrotik hücrelerin morfolojik görüntüsü	18
Şekil 2.10. Oksijen radikallerinden kaynaklanan 8-OHdG oluşumu	20
Şekil 3.1. In vitro CBMN yöntemi protokolü	25
Şekil 3.2. Standart Kalibrasyon Eğrisi.....	29
Şekil 4.1. Akromegalili hasta ve kontrollerde MN, NPB ve NBUD frekansı.....	34
Şekil 4.2. Akromegalili hastalarda artan serum IGF-1 düzeyi ile MN frekansı arasındaki korelasyon	34

Sayfa No

Şekil 4.3.	Akromegalili hasta ve kontrollerde apoptotik ve nekrotik hücre frekansı	35
Şekil 4.4.	Akromegalili hastalarda artan serum IGF-1 düzeyi ile apoptotik hücre frekansı arasındaki korelasyon	36
Şekil 4.5.	Akromegalili hasta ve kontrollerde plazma 8-OHdG seviyeleri	37
Şekil 4.6.	Prolaktinomali hastalarda ve kontrollerde MN, NPB ve NBUD frekansı.....	40
Şekil 4.7.	Prolaktinomali hastalarda artan prolaktin seviyesi ile MN frekansı arasındaki korelasyon	40
Şekil 4.8.	Prolaktinomali hastalarda artan hipofiz adenom büyüklüğü ile MN frekansı arasındaki korelasyon	41
Şekil 4.9.	Prolaktinomali hastalarda ve kontrollerde apoptotik ve nekrotik hücre frekansı	41
Şekil 4.10.	Prolaktinomali hastalarda ve kontrollerde plazma 8-OHdG seviyeleri	42
Şekil 4.11.	Non-fonksiyone adenomlu hastalarda ve kontrollerde MN, NPB ve NBUD frekansı.....	45
Şekil 4.12.	Non-fonksiyone adenomlu hastalarda ve kontrollerde apoptotik ve nekrotik hücre frekansı	46
Şekil 4.13.	Non-fonksiyone adenomlu hastalarda ve kontrollerde NDI değerleri	46
Şekil 4.14.	Non-fonksiyone adenomlu hastalarda ve kontrollerde plazma 8-OHdG seviyeleri	47
Şekil 4.15.	Hipofiz adenomlarının DNA hasarı açısından karşılaştırılması	48
Şekil 4.16.	Hipofiz adenomlarının apoptotik ve nekrotik hücre frekansları açısından karşılaştırılması.....	48
Resim 4.1.	a. Bir çekirdekli hücre; b. İki çekirdekli (BN) hücre; c. Üç çekirdekli (M3) hücre; d. Dört çekirdekli (M4) hücre; e. Bir MN'lu BN hücre; f. NPB'li BN hücre; g. NBud'lu BN hücre; h. Metafaz; i. Apoptotik hücre; j. Nekrotik Hücre	31

KISALTMALAR

CBMN	: Cytokinesis-Block Micronucleus; Sitokinez Blok Mikronükleus
CBMN Cyt	: CBMN Cytome; CBMN sitom
Cyt-B	: Sitokalazin B
8-OHdG	: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
BN	: Binükleer
NPB	: Nucleoplasmic bridges; Nükleoplazmik köprü
NBUD	: Nuclear buds; Nükleer tomurcuk
NDI	: Nuclear division index; Nükleer Bölünme İndeksi
MR	: Manyetik Rezonans
PHA	: Phytohemagglutinin; Fitohemagglutinin
TSH	: Tiroid Stimüle edici Hormon
ACTH	: Adrenokortikotropik Hormon
GH	: Growth Hormon
PRL	: Prolaktin
FIPA	: Familial Isolated Pituitary Adenoma
AIP	: Aryl hydrocarbon receptor interacting protein
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
LH	: Lütein yapıcı hormon
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
OGTT	: Oral glukoz tolerans testi
MN	: Mikronükleus
KA	: Kromozom aberasyon
KKD	: Kardeş kromatid değişimleri
M1- M4	: 1-4 çekirdek içeren hücrelerin sayısı
ELISA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Testi
RIA	: Radioimmunoassay
IRMA	: Immunoradiometric assay
DMSO	: Dimetil sülfoksit

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hipofiz adenomları, ‘sella tursika’ adı verilen kemik kompleksinin içine yerleşen, hipofiz bezinden gelişen ve gliomlar ve menenjiomlardan sonra en sık görülen primer beyin tümörleridir. Tüm primer beyin tümörlerinin % 10-15’ini oluştururlar. Klinik, patolojik, endokrinolojik ve tedavi yaklaşımları olarak hipofiz adenomları diğer intrakranial tümörlerden farklılık gösterir. Hipofiz adenomları en sık 30-50’ li yaşlarda görülür ve % 70’i hormonal olarak aktiftir (1).

Hipofiz adenomları yavaş büyüyen benin tümörler olmakla birlikte, bir kısmı sellar kaviteyi aşır optik kiazmaya, kavernöz sinüse, sfenoid sinüse ve diğer komşu bölgelere invazyon yapma eğilimi taşırlar (2). Hipofiz adenomlarından hangilerinin agresif davranış gösterebileceği veya nüks edebileceğini önceden belirleyebilecek genel ve kesin bir parametre henüz yoktur. Ancak yapılan bazı çalışmalar, hipofiz adenomlarının prognozunu hastanın yaşı, cinsiyeti, tümör boyutu, tümör tipi, bazal hormon seviyeleri, kavernöz sinüs invazyonu ve immunohistokimyasal boyanma özelliklerinin etkileyebileceğini göstermiştir (3, 4).

Sitokinez-bloke mikronukleus sitom (Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome; CBMN cyt) yöntemi, kromozomal hasarın, genomik kararsızlığın ve kanser riskinin bir belirteci olarak kullanılan genotoksisite yöntemidir. CBMN yöntemi son yıllarda, Fenech tarafından “cytome assay” olarak geliştirilmiştir. Bu yöntemle kromozom instabilitesi/genom hasarı, hücre çoğalması ve hücre ölümü eş zamanlı olarak tespit edilebilmektedir (5-10).

Oksidatif stres, farklı mekanizmalar ile DNA’da hasarlanmalara yol açmakta ve DNA’nın kararlılığını etkilemektedir (11). 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) ölçümü, DNA’daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilmekte olup oksidatif DNA hasarını belirlemek için kullanılan en yaygın yöntemdir (11-13).

Yaptığımız literatür incelemesine göre, hipofiz adenomlarının hem kromozomal DNA hasarını hem de oksidatif DNA hasarını araştıran herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır. Bundan yola çıkarak çalışmamızda, en sık görülen hipofiz adenomlarından prolaktinomalar, somatotrof adenomlar (akromegali) ve klinik olarak önemli herhangi bir hormon üretmeyen null-cell adenomlarda (non fonksiyone), hipofiz hormonlarının DNA hasarı üzerine etkisini araştırmayı planladık. Çalışmamız sonucunda bulunacak olası oksidatif ve kromozomal DNA hasarı sonuçlarına göre, hipofiz bezi kaynaklı bu adenomlar arasında karşılaştırma yapılarak, bu hastalıkların patogeneziyle ilgili literatüre yeni bilgiler kazandırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

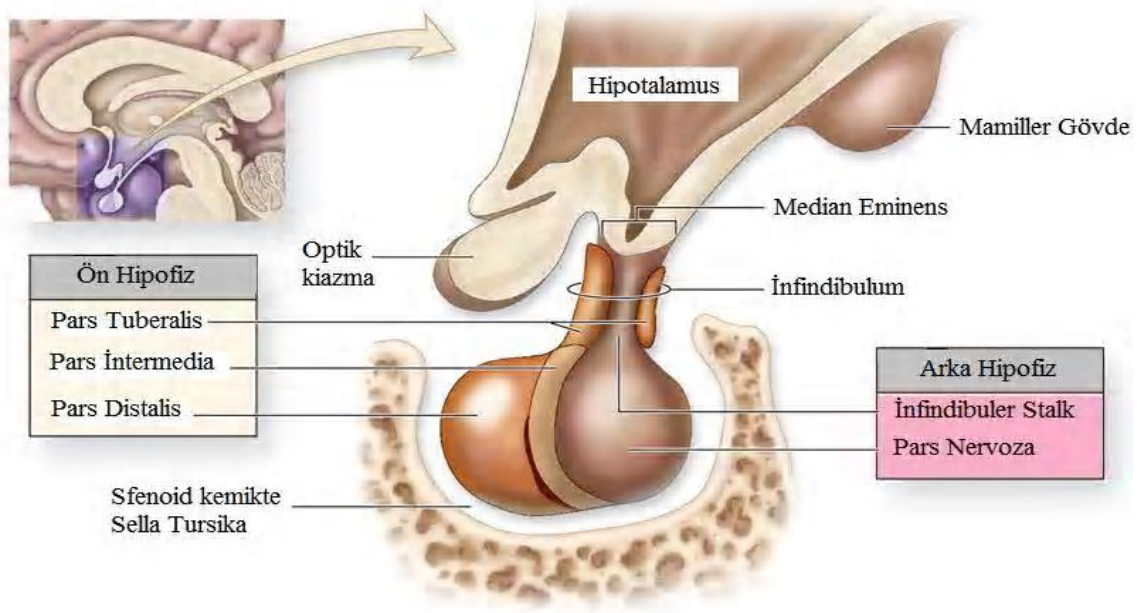
2.1. TARİHÇE

Hipofiz ile ilgili en eski tanım Galen'e aittir. Galen hipofizin beyin ile burun arasındaki phlegma (mukus) yolları üzerine yerleşmiş bir yapı olduğunu ve phlegma salgıladığını öne sürmüştür. Bu tarif yaklaşık M.S. 150 yıllarına aittir. İlginç olan, bu kavramın 18'inci yüzyıla kadar fazla bir değişikliğe uğramadan gelmiş olmasıdır. 1772 yılında Saucerotte akromegaliye değinmiş, 1838 yılında Rathke ise embriyolojisini tarif etmiştir. 20. yüzyılın başlarında ise Pierre Marie ve Harvey Williams Cushing'in öncü çalışmaları ile hipofiz hormonları izole edilmiştir (14).

2.2. HİPOFİZ BEZİ ANATOMİSİ

Hipofiz bezi ortalama 1.2-1.5 cm çapında ve erişkinlerde 0.5-0.6 gr ağırlığında olan bir yapıdır. Sella tursika içerisinde bulunur ve üzerini dura uzantısı olan diaphragma sellae örter. Diaphragma sellae'nın ortasında foramen diaphragmaticus adını alan bir açıklık mevcuttur ve buradan hipofiz sapı geçer; bu yapı genellikle orta hattın değil, dorsum sellae'ya daha yakın olacak şekilde yatık seyreder. Hipofiz bezi, diyaframın ortasındaki açıklıktan geçen hipofiz sapı ile hipotalamusa bağlıdır (15).

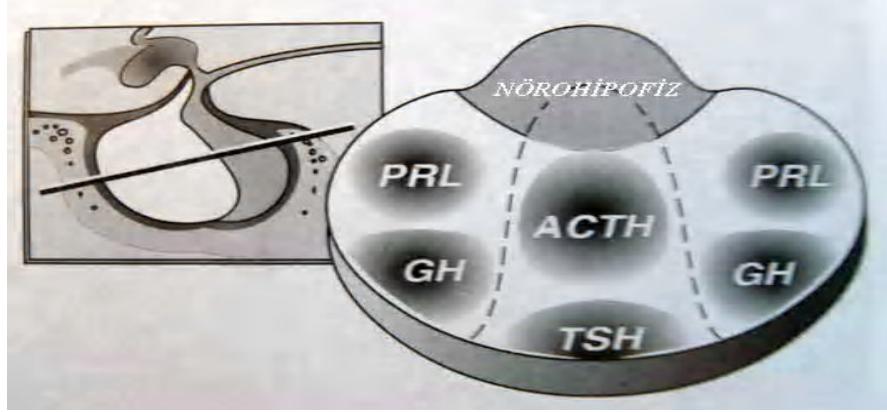
Hipofiz bezi ön hipofiz (adenohipofiz) ve arka hipofiz (nörohipofiz) olmak üzere iki bölüme ayrılır. Ön hipofiz kendi içinde 3 alt bölüme ayrılır. Bunlar, pars distalis, pars tuberalis ve pars intermedia'dır (Şekil 2.1). Arka hipofiz ise kendi içinde 3 alt bölüme ayrılır. Bunlar, pars nervosa, median eminans ve infundibular stalktır (15).



Şekil 2.1. Hipofiz bezi ve anatomisi (16)

2.3. HİPOFİZ BEZİ FİZYOLOJİSİ

Hipofizde hormon salgılayıcı hücrelerin hipofiz bezi içerisindeki dağılımı rastgele değildir. Hipofiz bezi bölgesel olarak ele alınırsa bezin, belli bir topografik düzeni vardır. Burada her hücre tipi, intrasellar olarak belli bir lokalizasyonda yoğunlaşmıştır. Ön hipofiz hücrelerinin yaklaşık % 30-40'ı büyüme hormonu salgılayan somatotroplar ve % 20 kadarı Adrenokortikotropik Hormon (ACTH) salgılayan kortikotroplardır. Diğer hücre tiplerinin her biri toplamın yalnızca % 3-5'i kadardır (17). Growth Hormon (GH) salgılayan hücreler lateralde genellikle bezin ön tarafında fazla miktarda bulunurlar. Somatotrop adenomlar genel olarak bu bölgeden çıkar. Prolaktin (PRL) salgılayan hücreler, bezin her tarafında bulunabilir, fakat daha çok lateral kanatların arka kısmında, hemen posterior loba komşu olan bölgede bulunurlar. PRL salgılayan adenomlar da bu bölgeyi tercih ederler. Kortikotroplar, adenohipofizin santral bölgesinde, posterior lobun hemen önünde bulunur. ACTH yapan tümörlerin de çoğu bu bölgede bulunur. Tirotrop hücreler, genel olarak adenohipofizin ön kısmında çok küçük bir alanı işgal etmelerinden dolayı, bu bölge muhtemel olarak Tiroid Salgılayan Hormon (TSH) adenomlarının kaynaklandığı bölgedir. Gonadotrop hücreler, anterior lob boyunca yaygın olarak dağılmışlardır. Bu şekilde gonadotrop hücrelerin stereotipik olarak kaynaklandığı bir bölge yoktur. (17). (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Hormon salgılayan hücrelerin hipofiz bezi içerisinde topografik dağılımı (18)

2.4. HİPOFİZ ADENOMLARININ EPİDEMİYOLOJİSİ

Hipofiz tümörleri tüm primer beyin tümörlerinin %10-15'ini oluştururlar. Hipofiz tümörleri, gliomlar ve menenjiomlardan sonra en sık görülen üçüncü primer tümörlerdir. Primer olarak nöroşirurji raporlarından elde edilen istatistikler gerçek hipofiz adenomu insidansından daha az olabilir. Çünkü hipofiz adenomlarına rastgele yapılan otopsi serilerinde insidansı %20'lere kadar çıkmaktadır (1). Yani hipofizin neoplastik transformasyonu sık bir olay olarak kabul edilebilir. Fakat bunların çoğu klinik olarak önemli olmayabilir. Otopsi serilerinde saptanan hipofiz adenomlarının büyük bir kısmının çapı 10 mm'nin altında ölçülmüştür. Cerrahi serilere dayanarak kadınlarda ve çocuk doğurma yaşında olanlarda daha sık olarak rastlanmaktadır. Kadınlarda daha sık olarak görülme nedeni belli değildir. Ancak otopsi serilerinde cinsler arasında eşit olarak dağılım görülmektedir (19-20).

Hipofiz tümörleri tüm yaş gruplarında görülse de 30-50' li yaşlar arasında daha yüksek insidansa sahiptir. Bu spektrumun erken yıllarında fonksiyonel adenomlar daha sık iken ilerleyen yıllarda non-fonksiyone adenomların sıklığı artmaktadır. Pediatrik çağda ise hipofiz adenomları oldukça nadirdir (1).

Adenom olgularının %3'ünde otozomal dominant olarak kalıtılan ve değişken penetrans gösteren Multipl Endokrin Neoplazi (MEN) görülür. MEN sendromlu olguların ancak % 25'inde hipofiz adenomları görülmektedir ve görülen olgular çoğunlukla PRL veya GH salgılayan hormonal aktif adenomlardır (21). Yine son yıllarda MEN sendromu dışında kalan ailesel hipofiz adenomları Familial Isolated Pituitary Adenoma (FIPA) olarak adlandırılmakta ve Aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) geni ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir (22).

2.5. HİPOFİZ ADENOMU FİZYOPATOLOJİSİ

Hipofiz adenomu oluş mekanizması olarak iki hipotez ortaya atılmıştır. Hipotalamik hipotezde, disfonksiyonel hipotalamusun aşırı trofik etkisinin kan yoluyla aşağıya doğru gelmesi ve bunun pasif etkisinden hipofiz adenomunun oluştuğu öne sürülmektedir. Buna alternatif olan hipofizer hipotezde ise, izole adenohipofiz hücresindeki primer defekt ile hipofiz adenomunun oluştuğu savunulmaktadır. Burada hipotalamusun etkisi olmadan transformasyon oluşmaktadır. Bu iki hipotezi önemli miktarda bulgu desteklemesine rağmen, hipofizer hipotez daha çok kabul edilmektedir. Çünkü hipofiz adenomu ile birlikte peritümöral hiperplazi yoktur ve hipofiz adenomlarının çoğunda cerrahi olarak çıkartılmalarından sonra tam olarak şifa sağlanmaktadır (23).

2.6. HİPOFİZ ADENOMLARININ SINIFLANDIRILMASI

Hipofiz adenomlarında adenom büyüklüklerine, radyolojik görünümlerine, endokrin fonksiyonlarına, yapısal özelliklerine, histolojik-patolojik morfoloji ve sitogeneze göre çeşitli sınıflandırma yöntemleri kullanılmaktadır (24, 25).

2.6.1. Histolojik sınıflandırma

İmmunohistokimya ve elektron mikroskopisi teknikleri gelişmeden önce kullanılan, hipofiz adenomları ile ilgili yapılan ilk sınıflandırmadır. Konvansiyonel boyalar kullanılarak hücre sitoplazmalarının boyanma özelliğine göre asidofil, bazofil ve kromofob adenomlar olarak isimlendirilirler. Günümüzde bu sınıflandırma tamamen terk edilmiştir (24, 25).

2.6.2. Fonksiyonel sınıflandırma

Fonksiyonel sınıflandırma, adenomların hormon üretimi, histolojik ve ince yapısal özellikleri ile birlikte değerlendirilip sınıflandırılması temeline dayanmaktadır. Bu sınıflandırma, hormon üretimi, prognoz ve tedaviye yanıtızsızlık gibi konularda kliniğe sağlıklı bilgiler sunulmasını sağlayan bir sınıflandırmadır (24, 25):

- GH salgılayan adenomlar (Akromegali)
- PRL salgılayan adenomlar (Prolaktinoma)
- ACTH salgılayan adenomlar (Cushing Hastalığı)
- TSH salgılayan adenomlar (TSHoma)
- FSH/LH salgılayan adenomlar (Gonadotropinoma)

- Plurihormonal adenomlar
- Hormonal fonksiyon göstermeyen adenomlar (Non-Fonksiyone Adenomlar)

2.6.3. İmmünohistokimyasal sınıflandırma

Doku antijenlerini ortaya koyan immunolojik tekniklerin gelişimi, hipofiz adenomlarının sınıflandırılmasının yeniden ele alınmasını gerekli kılmıştır. Spesifik olarak hormona karşı gelişen immünohistokimyasal reaksiyon sayesinde adenomlar hücre tipine göre de sınıflandırılmaktadır (24, 25).

2.6.4. Radyolojik sınıflandırma

Büyükliklerine göre adenomlar mikroadenom ve makroadenom olarak ayırt edilir. Çapı 10 mm'den küçük olan adenomlar mikroadenom, 10 mm'den büyük adenomlar makroadenom olarak adlandırılır. 4 cm ve üstü adenomlar ise dev adenom olarak adlandırılır (24-26).

2.7. HIPOFİZ ADENOMLARI

2.7.1. Prolaktinoma

Prolaktinomalar, en sık görülen hipofiz adenomlarını oluşturur (%40-60). Genellikle seyrek granüllü, monohormonik laktotrop adenom olarak tanımlanır. Kadınlardaki prolaktinomaların büyük bir bölümünü mikroadenomlar, erkeklerdekini ise makroadenomlar oluşturur. Makroprolaktinomalar, mikroprolaktinomalara göre daha az görülür. Prolaktinomada tümör gelişiminden sorumlu mekanizma henüz bilinmemektedir. Embriyolojik gelişim sırasında hipofizer laktotrop kök hücrelerini etkileyerek genetik mutasyonlar ve daha sonrasındaki gelişim evrelerinde çeşitli faktörlerin de etkisiyle oluşan prolaktin salgılayan hücrelerdeki kontrolsüz proliferasyonun prolaktinomaya sebep olduğu düşünülmektedir (27).

Klinik: Erkeklerde en sık rastlanan yakınma libido azalması ve/veya erektil disfonksiyondur, jinekomasti ve galaktoreye nadiren rastlanmaktadır. Kadınlarda ise en sık görülen yakınma adet düzensizliği/hiç adet görememe ve hamilelik ya da emzirme dönemi dışında olan göğüslerden süt gelmesidir. Ayrıca makroprolaktinomalarda adenom basısına bağlı baş ağrısı, görme bozukluğu ve hipopituitarizm semptomları da olabilir (26).

Tanı: Erkeklerde normal PRL değeri 20 ng/ml'nin, kadında ise gebelik ve emzirme dışında 25 ng/ml'nin altındadır. Tümör boyu ve PRL seviyeleri arasında korelasyon görülebilir. Makroadenomlarda PRL seviyeleri genellikle 200 ng/ml ve üzeridir. Eğer hipofiz manyetik rezonans (MR) görüntülemesinde tespit edilen makroadenom ile PRL seviyeleri arasında korelasyon yok ise adenom non-fonksiyone bir adenom olabilir ve bu durumda PRL yüksekliği sap basısına bağlanabilir (26).

Tedavi: Mikroprolaktinomada semptom yok ise tedavi şart değildir, hasta izlenir ve semptomatik olduklarında tedavi verilir. Makroadenomlar ise mutlaka tedavi edilmelidir. Prolaktinomalarda birinci seçenek tedavi, dopamin agonistleriyle olan tedavidir. Medikal tedavi ile PRL düzeyi 2-3 hafta içinde düşmeye başlar ve yaklaşık 1-2 ay sonra tümör çapında küçülme gözlemlenebilir. Mikroadenomlar genellikle büyümmezler (%93), uzun dönemde makroadenoma dönme ihtimalleri çok düşüktür (%5-10) ve %30'unda ise hiperprolaktinemi kendiliğinden kaybolur. Radyoterapi, dopamin agonistlerine cevap alınamayan ya da cerrahi kür sağlanamayan oldukça nadir prolaktinomalı hastalara uygulanır (28).

2.7.2. Akromegali

Akromegali, hipofiz bezinde büyüme hormonu salgılayan adenomun neden olduğu nadir görülen bir hastalıktır. İnsidansı milyonda 4-5/yıl olarak bilinir. Prevalansı ise milyonda 40 ile 70 arasında seyrederek (29-31). Akromegali, büyüme hormonunun aşırı salgılanmasının oluşturduğu metabolik etkilerle ve hipofiz adenomunun oluşturduğu direkt kitle etkisi ile morbidite ve mortalitede artış ile seyrederek. Akromegalik hastalarda kardiyovasküler hastalıklar, solunum hastalıkları ve metabolik hastalıklara bağlı olarak mortalitenin 2-4 kat kadar arttığı bilinmektedir (32-34). Ayrıca meme, prostat, tiroid ve kolon kanseri ile hematolojik hastalıklara yakalanma riskinin akromegalili hastalarda artmış olduğu gösterilmiştir (35-37). Büyüme hormon düzeylerinin tedavi ile 2.5 µg/L'den daha düşük değerlere indirilmesi sonucunda akromegalide artmış mortalite oranlarının, normal popülasyonda görülen mortalite oranlarına kadar azaldığı gösterilmiştir (32). Benzer şekilde insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) değerlerinin yaş ve cinsiyet ile uyumlu olarak normal değerlere indirilmesi de mortalite riskini azaltmaktadır (38).

Akromegali' de 2010 konsensus kriterlerine göre hastanın yaşı, cinsiyeti, tümör boyutu, bazal GH / IGF-1 seviyelerinin hormonal remisyonu etkileyen faktörler olduğu belirtilmiştir (39, 40).

Klinik: Akromegalik hastalar genel olarak yüzde kabalaşma, ekstremitelerde büyüme, başağrısı, halsizlik, aşırı terleme ve gonadal disfonksiyondan yakınırırlar. Volüm yüklenmesi ve vasküler sistemdeki yapısal değişikliklerin etkisi ile oluşan hipertansiyon akromegalik hastaların %30'unda görülür. Akromegalide genellikle kardiyak hastalıklar, hiperkinetik sendrom ile başlar. Aşıkarp kalp yetmezliği ise tedavisiz kalan hastalarda hastalığın ileri dönemlerinde görülür (41). Akromegalide premalign kolon polipi görülme sıklığı artmakta ve hastaların %30'unda tespit edilmektedir. Akromegali ve kanser riskinin değerlendirildiği bir çalışmada, gastrointestinal, beyin, tiroid ve kemik kanseri açısından akromegalik hastalarda insidansın arttığı gösterilmiştir (40, 42, 43).

Tanı: Akromegali tanısı klinik ve biyokimyasal sonuçlar eşliğinde konulmalıdır. Akromegaliden şüphelenildiği zaman, serum IGF-1 değerinin ölçümü ilk basamak olmalıdır. IGF-1 değerleri yaş, cinsiyet ve toplumsal rolleri gözönüne alınarak değerlendirilmelidir (43).

Oral glukoz tolerans testi (OGTT) sırasında GH değerlerinin ölçülmesi, akromegali tanısında standart olarak kabul edilmektedir. Bu test 75 gr glukozun oral olarak verilmesi ve glukoz ile büyüme hormonu değerlerinin 0, 30, 60, 90 ve 120. dakikalarda ölçülmesi ile yapılır. Akromegalik hastalarda OGTT sırasında, en düşük GH değeri 1 µg/L'den daha yüksek olarak tespit edilir (44). OGTT sırasında GH baskılanmasının olmaması sadece akromegali için spesifik değildir. Akromegali tanısı için OGTT sonuçları yanında mutlaka klinik bulgular ve serum IGF-1 değerleri de gözönüne alınmalıdır. GH ve IGF-1 değerleri ile klinik bulgular akromegaliyi desteklediği zaman MR ile hipofiz görüntülemesi yapılmalıdır (45).

Tedavi: Akromegalik her hastada cerrahi tedavi ilk tedavi seçeneği olarak düşünülmelidir. Görme kaybı veya çift görme gibi ciddi kitle etkisi olan hastalarda acil cerrahi tedavi gerekir. Kardiyomiyopati, kontrolsüz diabetes mellitus, ciddi hipertansiyon ve solunum yolu problemleri gibi nedenler ile anestezi riski taşıyan hastalar cerrahi tedavi için uygun durumda olmayabilirler. Cerrahi tedavi için uygun olmayan bu hastalarda ilk olarak medikal tedavi uygulanabilir. Medikal tedavinin

uygulanmasını takiben anestezi ve cerrahi riskleri azalan ve cerrahi girişim için uygun hale gelen bu hastalara cerrahi tedavi planlanabilir. Adenomun boyutu ve cerrahi tedavi öncesinde serum GH/IGF-1 değerleri cerrahi remisyonu belirleyen kriterlerdir. Cerrahi ve medikal tedavi ile remisyon sağlanamayan veya nüks eden hastalarda konvansiyonel yada stereotaksik radyoterapi uygulanır (45).

2.7.3. Non-Fonksiyone Adenomlar

Non-fonksiyone hipofiz adenomları, hipofiz tümörlerinin yaklaşık %25-30'unu oluşturur. Gonadotrop salgılayan hipofiz adenomları genellikle klinik olarak non-fonksiyone adenom olarak kabul edilirler. Erkeklerde ve postmenopozal kadınlarda non-fonksiyone adenomlar daha sık görülür (46).

Hastalarda sıklıkla baş ağrısı, görme bozuklukları ve hipopituitarizm gelişir. Görme bozuklukları en sık görülen bası semptomunu oluşturur ve yaklaşık hastaların %40-50'sinde tespit edilir. Non-fonksiyone makroadenom hastaların kitle etkisiyle %90'ında hipogonadizme neden olurken, vakaların büyük kısmında sekonder hipotiroidi ve adrenal yetmezlik yapar (47).

Tedavi için transsfenoidal adenom eksizyonu yapılır. Cerrahi tedavi öncesinde hastalarda mutlaka görme alanı, nörolojik muayene ve hipofiz fonksiyonlarının değerlendirilmesi gerekir (47).

2.8. DNA HASARI

Genetik bilgiyi taşıyarak, nesilden nesile aktarılmasını sağlayan DNA kolay zarar görebilen bir moleküldür ve üzerinde sürekli olarak hasar oluşmaktadır. Oluşan hasar DNA onarım sistemleri tarafından tamir edilmekle birlikte, hasarın çok fazla olduğu veya tamir sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda DNA üzerinde oluşan hasar, hücre ölümüne kadar varan etkilere neden olur. DNA hasarının yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, immun sistem hastalıkları, dejeneratif hastalıklar gibi doku fonksiyonlarının bozulması ile ortaya çıkan hastalıkların etyolojisinde önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir (48, 49).

Genomik DNA'nın bütünlüğü, farklı DNA hasarlarına neden olan ultraviyole, X-ışınları, kimyasal bileşikler gibi çevresel ajanlar ile de sürekli tehdit altındadır. Hücresel metabolizmanın yan ürünü olarak üretilen serbest radikaller gibi endojen ajanlar da DNA hasarına neden olmaktadır (50). Hücre tüm bu DNA hasarlarına farklı

metabolik yollar ile cevap verir. Ağır DNA hasarları hücrenin apoptoz yolunu aktive ederek hücreyi ölüme götürür. Hücre, DNA hasarlarını DNA tamir mekanizmaları ile tamir edebilir. DNA hasarı replikasyon sırasında tamir edilemezse mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa neden olur. DNA'da birçok özgün değişimi içine alan genomik kararsızlık, hem kanserin hem de yaşlanmanın önemli bir belirtisidir (51).

Canlıların DNA'larında meydana gelen hasarlar; Ames testi, *in vivo* memeli fare kemik iliği kromozom aberasyon testi, *in vivo* memeli eritrosit mikronukleus (MN) testi, *in vitro* memeli hücre gen mutasyon testi, bakteri kullanarak yapılan geri mutasyon testleri ile belirlenmektedir. Kromozom aberasyon (KA: CA) testi, kardeş kromatid değişimleri (Sister Chromatid Exchange; KKD) testi ve MN testi, *in vitro* olarak memeli hücrelerindeki DNA'da meydana gelen hasarın ve genotoksik etkilerin sitogenetik açıdan araştırılmasında kullanılan genotoksisite yöntemleridir (5, 52).

2.9. SİTOKİNEZ BLOKE MİKRONUKLEUS SİTOM (CYTOME; cyt) YÖNTEMİ

MN oluşumu ilk olarak William Henry Howell ve Justin Marie Jolly tarafından eritrositlerde tanımlanmıştır. Bu nedenle Howell-Jolly cisimciği adı da verilmektedir (53). MN testi 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde ve daha sonra Heddle ve arkadaşları tarafından kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır. Fenech ve arkadaşları tarafından da bu yöntemin lenfositlerde ve diğer hücrelerde kullanılması geliştirilmiştir (5, 8).

MN, hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom parçalarından köken alan oluşumlardır. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iç iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunmaktadır (54, 55). Günümüzde, hızlı endüstrileşmeye bağlı olarak çevresel kirliliğin giderek artmasıyla, canlılar daha fazla fiziksel ve kimyasal ajana maruz kalmakta dolayısıyla güçlü toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik faktörlerin olumsuz etkilerini tespit etme ve önlemler alma ihtiyacı kaçınılmaz olmaktadır. Bu nedenle MN testi, sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre daha

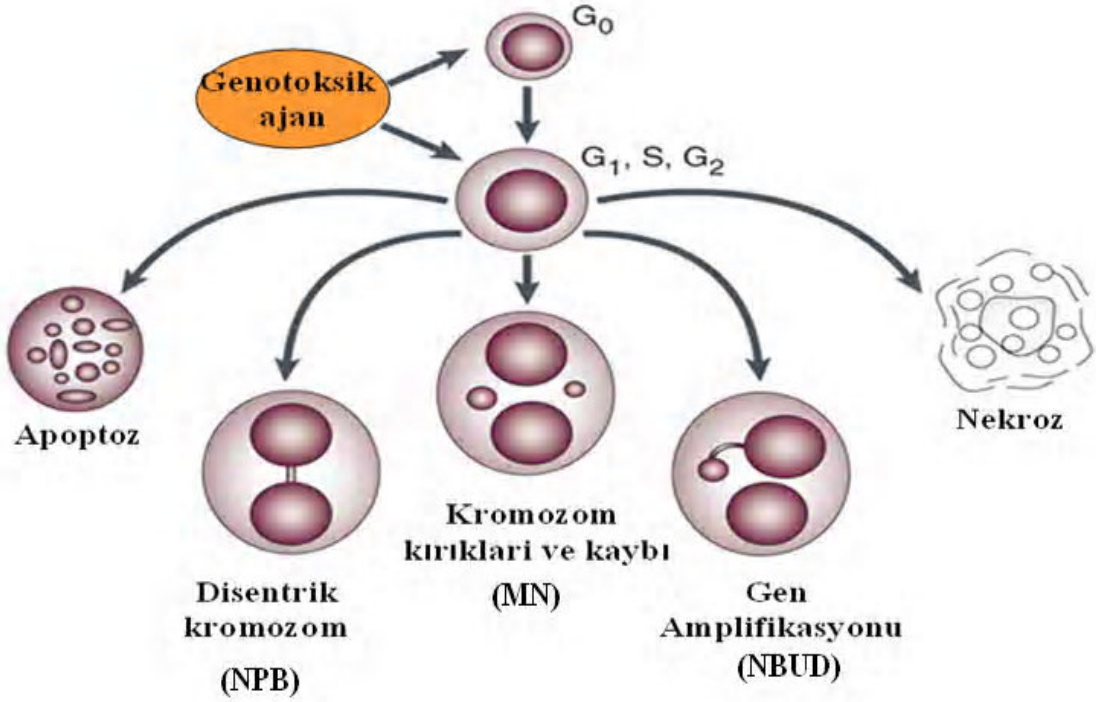
kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi avantajı ile yaygın kullanım alanı bulan bir teknik olmuştur (56-60).

Son yıllarda yapılan HUMN databaz analizi gibi çalışmalar sonucunda, MN yöntemi, doğruluğu açısından, genom hasarı gibi patolojik durumların araştırılmasında güvenilir bir yöntem olması yönüyle, periferal kan lenfositlerinde MN frekansının kanser riskinin belirlenmesinde bir biyomarkır olarak kullanılabileceği kabul edilmektedir (61, 62).

Sitokinez blok mikronükleus (CBMN) yöntemi, sitokalazin-B'nin (cytochalasin-B; cyt-B) hücre bölünmesini sitokinez evresinde durdurması özelliği temel alınarak tanımlanmıştır (63-66). Cyt-B, *Helmin dematiodeum*dan elde edilen bir ekstraktır. Cyt-B hücre bölünmesini sitokinez evresinde aktin filamentlerini etkileyerek durdurur. Bu etkisini de aktin filamentlerin ucuna bağlanarak, aktinin polimerize olmasını önleyerek gerçekleştirir (67, 68).

CBMN yöntemi, kromozomal hasarın, genomik karasızlığın ve kanser riskinin bir belirteci olarak kullanılan genotoksisite yöntemidir. CBMN yöntemi son yıllarda, Fenech tarafından CBMN sitom (CBMN cyt) yöntemi olarak geliştirilmiştir (8, 69). Bu yöntemle de eş zamanlı olarak; kromozom instabilitesi/genom hasarı, hücre çoğalması ve hücre ölümü tespit edilebilmektedir. Kısaca;

- *DNA hasarı için;* kromozom kırıkları ve/veya kromozom kayıplarını (anöploidi) gösteren MN'lar; gen amplifikasyonlarını gösteren nükleer tomurcuk (nuclear buds; NBUD)'lar; hatalı DNA tamirlerini ve/veya telomer uç birleşmelerini gösteren nükleer plazmik köprü (nucleoplasmic bridges; NPB)'ler değerlendirilir.
- *Hücre çoğalması için;* mononükleer, binükleer, multi nükleer hücreler skorlanarak, hücre çoğalma oranları hesaplanır.
- *Hücre ölümü için;* apoptotik ve nekrotik hücreler skorlanır (8, 69) (Şekil 2.3.)



Şekil 2.3. Çeşitli sitotoksik ve genotoksik ajanlara maruz kaldıktan sonra, kültüre edilmiş sitokinez-bloke hücrelerin olası kaderi (MN: mikronukleus; NPB:nükleoplazmik köprü, NBUD:nükleer bud). (8)

2.10. CBMN CTY YÖNTEMİ İLE HÜCRELERİ TANIMLAMA KRİTERLERİ

Sitokinezi bloke edilmiş binükleer (BN) hücrelerde, MN, NPB ve NBUD frekanslarını değerlendirebilmek için aşağıdaki kriterleri içermek zorundadırlar (8, 69) :

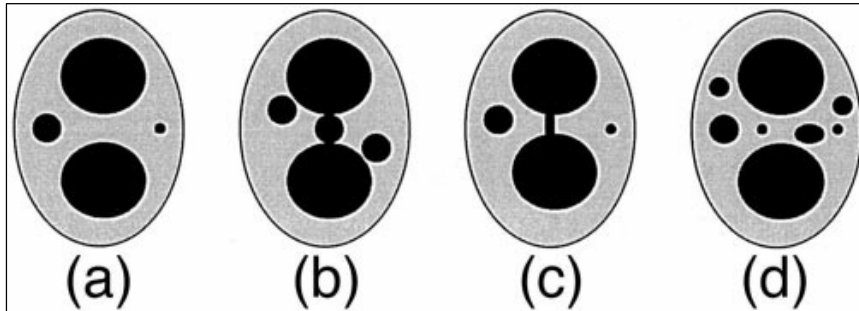
- Hücreler iki çekirdekli olmalıdır.
- BN hücredeki iki çekirdeğin boyutu yaklaşık olarak aynı olmalı ve yoğun boyanmalıdır.
- BN hücredeki iki çekirdek, nükleoplazmik bir köprü ile bağlanabilir. Bu nükleoplazmik köprü, çekirdek çapının ¼'ünden büyük olmamalıdır.
- BN hücredeki iki çekirdek birbirine temas edebilir, ancak ideal olarak birbirinin üzerine çıkmamış olmalıdır. İki çekirdeği üst üste çıkmış olan bir hücre eğer her bir çekirdeğin çekirdek sınırları ayırt edilebiliyorsa sayılmalıdır.
- BN hücrenin sitoplazmik sınırı ya da zar yapısı bozulmamış olmalı ve komşu hücrelerin sitoplazmik sınırından açıkça ayırt edilebilmelidir.

2.10.1. DNA hasarı (MN, NPB ve NBUD) için değerlendirme kriterleri;

MN sayma kriterleri

MN'lar morfolojik olarak çekirdek ile aynı ancak çekirdekten daha küçüktür. MN özellikleri aşağıda belirtilmiştir (Şekil 2.4.) (8, 69) :

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

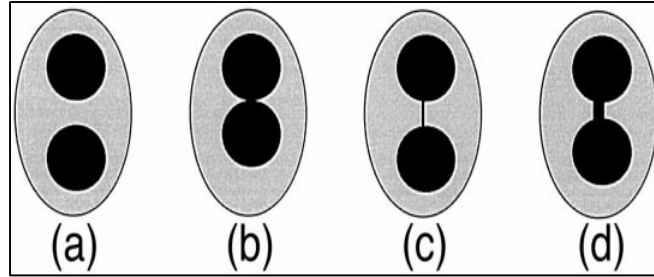


Şekil 2.4. BN hücre içindeki MN'nin morfolojik görüntüsü. (a) MN'ların çapı ana çekirdeğin ortalama çapının $1/16$ ve $1/3$ 'ü arasında değişebilir; (b) Üst üste binmemiş, BN hücreye temas eden MN'lar; (c) İki MN içeren birbirine NPB ile bağlı BN hücre; (d) Farklı boyutlarda altı MN içeren BN hücre (69).

NPB sayma kriterleri

NPB'ler, BN hücrenin içinde çekirdek ile bağlantılı ve DNA içeren bir yapıdır. NPB'ler, yanlış tamir edilmiş DNA kırıklarının veya telomer uç birleşmelerinin sonucu oluşan disentrik kromozomlardan orijin alır. Bu sentromerler anafaz boyunca karşı kutuplara çekilir. NPB' ler aşağıdaki özellikleri içerir (Şekil 2.5.) (8, 69) :

- a) NPB'lerin genişliği çok önemlidir ancak hücredeki çekirdeğin boyutunun $\frac{1}{4}$ ' ünü geçemez.
- b) NPB'ler aynı zamanda ana çekirdek ile aynı boyanma özelliklerine sahiptir.
- c) Nadiren bir BN hücrede birden fazla NPB gözlenebilir.
- d) NPB içeren bir BN hücre bir ya da daha fazla MN içerebilir.
- e) Bir yada daha fazla NPB içeren BN hücre, MN içermeyebilir.



Şekil 2.5. BN hücre içindeki NPB'nin morfolojik görüntüsü

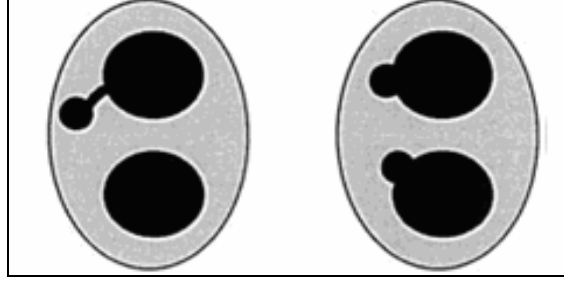
- (a) İdeal BN hücre; (b) Çekirdekleri birbirine değen BN hücre; (c) Dar bir NPB ile birbirine bağlı BN hücre; (d) Geniş bir NPB ile birbirine bağlı BN hücre (69).

NBUD sayma kriterleri

NBUD'lar, amplifiye DNA ve DNA tamir komplekslerinin eliminasyonunun işaretidir ve aşağıdaki karakteristik özellikleri içerir (8, 69) (Şekil 2.6.):

- a) NBUD'lar, MN'lara benzer görünümündedir, ancak farkı NBUD'un çapından daha dar bir köprü veya çok daha ince bir köprü ile çekirdeğe bağlı görünümde olmasıdır.
- b) NBUD'lar, genellikle MN ile aynı boyanma yoğunluğuna sahiptir.
- c) Nadiren NBUD'lar çekirdekle bitişik bir vakuol içinde yerleşmiş olarak görünebilir. Çekirdeğe değen bir MN'dan NBUD'u ayırmak zor olsa da bu NBUD olarak kabul edilir.

Çekirdekte bir nükleer materyal çıkıntısı varsa ve çekirdekten açık bir ayrımı yoksa NBUD olarak sınıflandırılmaz. Bu oluşumlara nükleer bleb (kabarcık) adı verilir. Bunun önemi bilinmemektedir.



Şekil 2.6. BN hücre içindeki NBUD' un morfolojik görüntüsü (69).

2.10.2. Sitostatik etkiler için;

Bir- (mononükleer), iki- (binükleer), üç- (trinükleer) ve dört- (tetranükleer) çekirdekli hücreleri sayma kriterleri

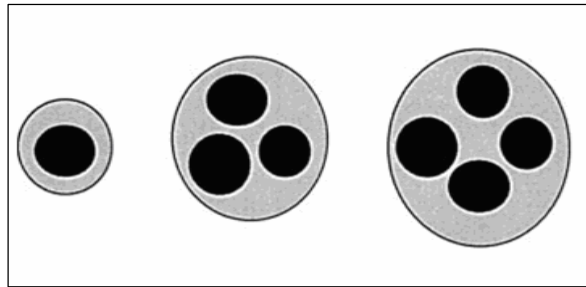
Mononükleer, binükleer, trinükleer ve tetranükleer hücrelerin frekansı, sitostatik etkileri ve mitotik bölünme oranını belirlemek için ölçülür. Nükleer bölünme oranı, nükleer bölünme indeksi (Nuclear division index; NDI) formülü ile bir ve çok çekirdekli hücre sayıları kullanılarak hesaplanabilir. Bu hücre tipleri aşağıdaki özellikleri içerir (8, 69) (Şekil 2.7.):

a) Bir-, iki-, üç- ve dört- çekirdekli hücreler, bütünlüğünü koruyan bir sitoplazma ile normal çekirdek morfolojisi gösteren canlı hücrelerdir. Bu hücreler, sırasıyla bir, iki, üç veya daha fazla çekirdek içerir.

b) Duruma göre iki çekirdekli veya çok çekirdekli hücreler bir veya daha fazla MN içerebilir veya içermeyebilir. Yine bu hücreler bir veya daha fazla NPB veya NBUD içerebilir veya içermeyebilir.

Nekrotik ve apoptotik hücreler canlı hücreler arasında sayılmazlar.

Nadir olarak, dört çekirdekten daha fazla çekirdek içeren hücreler eğer hücre döngüsü zamanı normale göre çok kısaysa veya sitokinez blok zamanı çok uzunsa gözlenebilir.



Şekil 2.7. Bir ve çok çekirdekli hücrelerin morfolojik görüntüsü (69).

NDI hesaplanması

NDI canlı hücrelerin bölünebilme durumunun ölçümünü sağlar. Bundan dolayı NDI, sitostatik etkilerin göstergesidir ve lenfositlerde aynı zamanda immün fonksiyonun belirteci olan mitojenik yanıtın ölçümünü sağlar. NDI, Eastmond ve Tucker'ın metoduna göre hesaplanır (70). 1, 2, 3 ve 4 çekirdek içeren hücrelerin frekansını belirlemek için 500/1000 canlı hücre sayılır ve formül kullanılarak NDI hesaplanır.

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

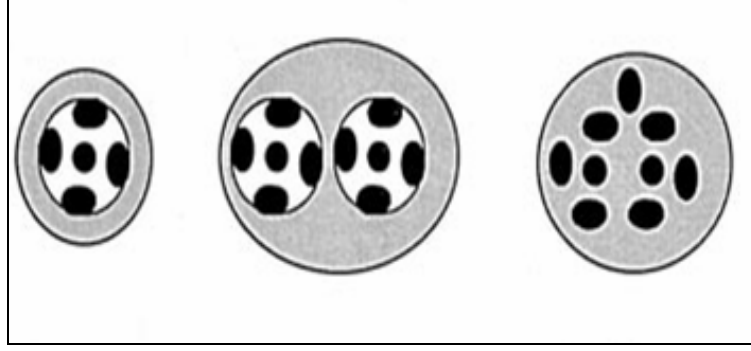
M1- M4; 1-4 çekirdek içeren hücrelerin sayısını belirtir ve N, hesaplanan toplam canlı hücre sayısını belirtir (nekrotik ve apoptotik hücreler hariç). NDI lenfositlerin mitojenik yanıtı ve çalışmada kullanılan ajanların sitostatik etkilerinin değerlendirilmesinde kullanışlı bir parametredir. En düşük NDI değeri olasılıkla 1.0'dır. Sitokinez-blok periyodu süresince bölünme başarısız olursa ve bundan dolayı tamamı mononükleer kalırsa bu durum oluşur. Eğer tüm canlı hücreler bir nükleer bölünmeyi tamamlar ve bundan dolayı hepsi binükleer olursa NDI değeri 2.0'dır. Eğer sitokinez-blok fazı boyunca birden fazla nükleer bölünmeyi tamamlayıp ve bundan dolayı 2'den fazla çekirdek içeren canlı hücrelerin oranı fazlaysa, bu durumda NDI değeri 2'den fazla olabilir (8).

2.10.3. Sitotoksosite için;

Apoptotik ve nekrotik hücreleri sayma kriterleri

Apoptotik lenfositler, programlanmış hücre ölümü geçiren hücrelerdir. Bu hücreler aşağıdaki özelliklere sahiptirler (8, 69):

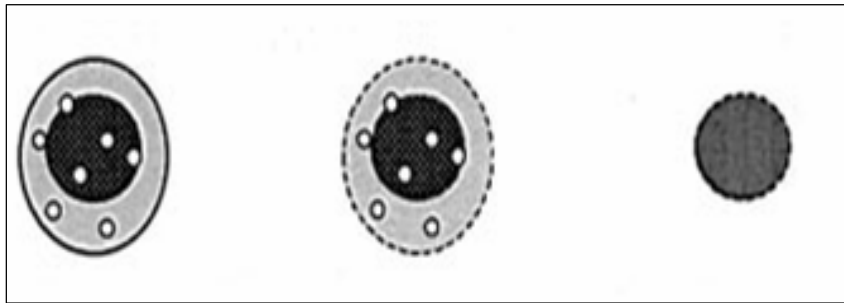
- Erken apoptotik hücreler, çekirdek içinde kromatin yoğunlaşmasının varlığı ve bütünlüğünü koruyan sitoplazma ve çekirdek membranı ile ayırt edilebilir.
- Geç apoptotik hücreler, bütünlüğünü koruyan sitoplazma ve sitoplazmik membran içinde daha küçük nükleer cisimcikleri oluştururlar.
- Her iki apoptotik hücrede bu nükleer cisimciklerin, sitoplazmanın ve çekirdeğin yoğun boyanması, diğer tüm canlı hücrelere nazaran genellikle daha çok gözlenir (Şekil 2.8.).



Şekil 2.8. Apoptotik hücrelerin morfolojik görüntüsü (69).

Nekroz alternatif bir hücre ölüm şeklidir ve hücresel membranın, organellerin ve/veya hücrenin yaşamını devam ettirebilmesi için gereken enerji metabolizması gibi kritik metabolik yolların hasarına bağlı olarak oluştuğu düşünülmektedir. Nekrotik lenfositler aşağıdaki özellikleri içerir (8, 69) :

- Erken nekrotik hücreler, soluk sitoplazmaları, çok sayıda vakuol bulunması (genellikle sitoplazma içinde ve bazen çekirdek içinde), hasarlı sitoplazmik membranının olması ve hemen hemen sağlam olan çekirdeğin bulunması ile ayırt edilebilir.
- Geç nekrotik hücreler, sitoplazma kaybı ve hasarlı/düzensiz çekirdek membranı, kısmen sağlam çekirdek yapıları ve sıklıkla çekirdek materyallerinin parçalar halinde çekirdekten çıkması ile ayırt edilebilir.
- Her iki nekrotik hücrede, çekirdek ve sitoplazmanın boyanma yoğunluğu diğer canlı hücrelere göre genellikle daha az gözlenir (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. Nekrotik hücrelerin morfolojik görüntüsü (69).

2.11. OKSİDATİF STRES

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme, bu dengenin bozulmasına neden olur. ‘Oksidatif stres’ olarak adlandırılan bu durum özetle, prooksidanlar ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki dengenin prooksidanlar lehine bozulması ile oluşur (71).

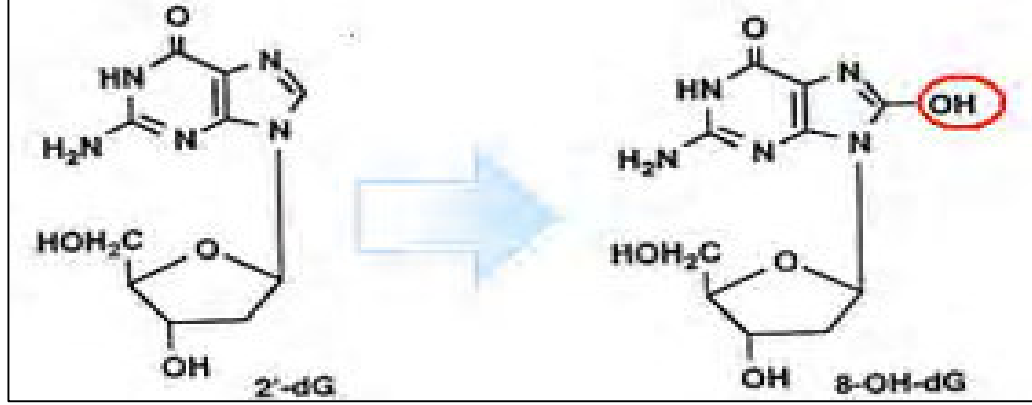
Serbest radikaller, organizmada metabolik reaksiyonlar sırasında endojen olarak meydana gelebildikleri gibi çevresel faktörlerin etkisiyle de oluşabilirler. Tablo 2.1.’de oksijen radikallerinin kaynakları listelenmiştir (72-74).

Tablo 2.1. Oksijen Radikallerinin endojen ve eksojen kaynakları (72-74)

Endojen kaynakları	Eksojen kaynakları
Stres Kronik hastalıklar ve enfeksiyon Fiziksel egzersiz ve sedanter yaşam	Diyetsel Kaynaklar Fazla kalorili beslenme Aşırı demir ve bakır alınması Az sebze ve meyve tüketilmesi Yemek pişirme yöntemlerindeki hatalar Çevresel Kaynaklar Sigara dumanı Hava kirliliği (ozon, nitrojen dioksit) Radyasyon (iyonize, ultraviyole) Çevre kirleticiler (asbest, pestisitler) İlaçlar Antikanser ilaçlar (adriamisin) Glutasyon tüketen ilaçlar (kokain)

Oksidatif stresin, farklı mekanizmalar ile DNA’da baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları (kromozom kırıkları), DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım lezyonlara neden olarak hasara yol açtığı bilinmektedir (11). Bu hasara uğrayan bazlar arasında 8-hidroksi-2’-deoksiguanozin (8-OHdG), oldukça duyarlı ve en sık karşılaşılan oksidatif DNA hasarının göstergesidir (11-13). Modifiye bir baz olan 8-hidroksi-2’-deoksiguanozin, DNA’da guaninin 8. karbon atomuna hidroksil radikalinin bağlanması sonucu oluşur (Şekil 2.10.). DNA replikasyonu sırasında, G-C’den A-T’ye dönüşüme neden olarak mutasyona eğilimi artırır (11-13) ve bu bileşiğin DNA’yı tamir edici

enzimler tarafından ortadan kaldırılması da yeni genetik hatalara sebep olur (75). Bu nedenle 8-OHdG ölçümü, DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilmekte olup oksidatif DNA hasarını belirlemek için kullanılan en yaygın yöntemdir (11-13).



Şekil 2.10. Oksijen radikallerinden kaynaklanan 8-OHdG oluşumu (76)

Oksidatif DNA hasarını doğru ve kesin ölçümüne yönelik farklı analiz yöntemleri denenmiştir. Ancak 8-OHdG'i ölçmek için sıklıkla tercih edilen iki yöntem vardır: Yüksek performanslı likit kromatografisi ve enzime bağlı immünosorban yöntemi (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay; ELISA). DNA hasar ürünlerinin spesifik tiplerinin kantitatif analizi için kullanılan immünoassay yöntemlerden ELISA ile 8-OHdG boyanması monoklonal antikorlar kullanılarak yapılır ve 8-OHdG düzeyi boyanmanın yoğunluğuna bağlı olarak değerlendirilir (77).

ELISA'nın avantajları şunlardır (78) :

- Kullanımının kolay olması
- Uzmanlık isteyen donanıma ihtiyaç olmaması
- Serum, plazma, idrar gibi birçok vücut sıvısında çalışılabilmesi
- Santrifüj dışında ön çalışmaya gerek olmaması
- Yüksek miktarda veri sunması.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇLER

Demirbaş Malzemeler

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

Sarf Malzemeler

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

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

3.2. YÖNTEM

Çalışma Grubu

Bu çalışma Mayıs 2010 ve Şubat 2013 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji Bölümü ile Beyin ve Sinir Cerrahisi Servisi'nde takip edilen hipofiz adenomlu hastalar üzerinde yapıldı. Çalışma öncesi Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alındı (Etik kurul karar no: 2010/97). Çalışmada, yeni teşhis konulmuş ve herhangi bir tedavi almamış 30 akromegali, 27 prolaktinoma ve 30 non-fonksiyone adenom olmak üzere toplam 87 hasta ile hastalarla benzer yaş ve cinsiyette toplam 35 sağlıklı kontrol bireyden kan örnekleri alındı.

Çalışmaya dahil edilen tüm hastaların isim, soy isim, dosya numarası, yaş, cinsiyet, yaşadığı yer, telefon numaraları, geliş şikayetleri, operasyon öncesi bazal hipofiz hormonları değerleri, Manyetik Rezonans (MR) görüntüleme sonuçları ve operasyon sonrası patoloji raporları kaydedildi.

Ayrıca hasta ve kontrol kişilerin, az miktarda (1-3 fincan) çay içen, son altı ayda şiddetli enfeksiyon yada viral hastalık geçirmeyen, herhangi bir ilaç kullanmayan, bilinen genotoksik kimyasal bir ajana maruz kalmamış olan, farklı bir beslenme alışkanlığı olmayan, hipertansiyon, diyetle regüle diyabet, kalp, kanser gibi herhangi bir hastalığı olmayan ve ailede de kanser öyküsü olmayan kişiler olmasına dikkat edildi. Çalışmaya katılan kişilere çalışmanın amacı anlatılarak, yazılı onayları alındı.

Bazal Hipofiz Hormonlarının Ölçümü

Hastaların operasyon öncesi takiplerinde bazal hipofiz hormonları ve gerekli periferik hormonlarına bakıldı. Akromegali tanısı hastaların şikayetleri, fizik muayenesi, IGF-1 değerleri, OGTT'ye GH cevabı ve hipofiz MR görüntülenmesiyle konuldu. Prolaktinoma tanısı hastaların şikayetleri, fizik muayenesi, PRL seviyeleri ve hipofiz MR görüntülenmesiyle konuldu. Non-fonksiyone adenom tanısında da yine aynı yol izlendi. Hipofizde adenomu bulunan ve hormonal fazlalığı bulunmayan hastalara da non-fonksiyone adenom tanısı konuldu. Bütün hipofiz adenomlarının değerlendirilmesi aynı endokrinolog tarafından yapıldı (FB).

Bazal hormon incelemeleri olarak; serbest T4 (0.88-1.72 ng/dL), TSH (0.57-5.6 mIU/mL), ACTH (0-46 pg/mL), kortizol (9-23 µg/dl), PRL (2-18 ng/mL), FSH [erkeklerde referans aralığı (1.9-18.9 mIU/mL), kadınlarda menstrual siklus ve menopoiz durumuna göre referans aralıkları (3-11 IU/L; foliküler faz), (4-34 IU/L; midsiklus), (2-10 IU/L; luteal faz), (24-119; postmenopozal)], LH [erkeklerde referans aralığı (1.7-9.6 mIU/mL), kadınlarda menstrual siklus ve menopoiz durumuna göre referans aralıkları (2-12 mIU/mL; foliküler faz), (9-77 mIU/mL; midsiklus), (0.7-17 mIU/mL; luteal faz), (16-55 mIU/mL; postmenopozal)], total testosteron [erkeklerde (134-625 ng/dL), kadınlarda (11-80 ng/dL)], serbest testosteron [erkeklerde (9.7-54.6 pg/mL) kadınlarda (0.3-3.2 pg/mL)], estradiol [menstrual siklus ve menopoiz durumuna göre referans aralıkları (19-247 pg/mL; foliküler faz), (35-570; midsiklus), (22-256 pg/mL; luteal faz), (14-44 pg/ml; postmenopozal) ve IGF-1 [yaşıya göre referans aralıkları (ortalama – 2 SD, ortalama + 2 SD); (197-476 ng/ml; 18-30 yıl), (100-494 ng/ml; 31-40 yıl), (101-303 ng/ml 41-50 yıl)] düzeyleri, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında rutin olarak uygulanan Radioimmunoassay (RIA), immunoradiometric assay (IRMA) veya kemilüminassay yöntemlerinden biri kullanılarak ölçüldü.

İmmünohistokimyasal Değerlendirme

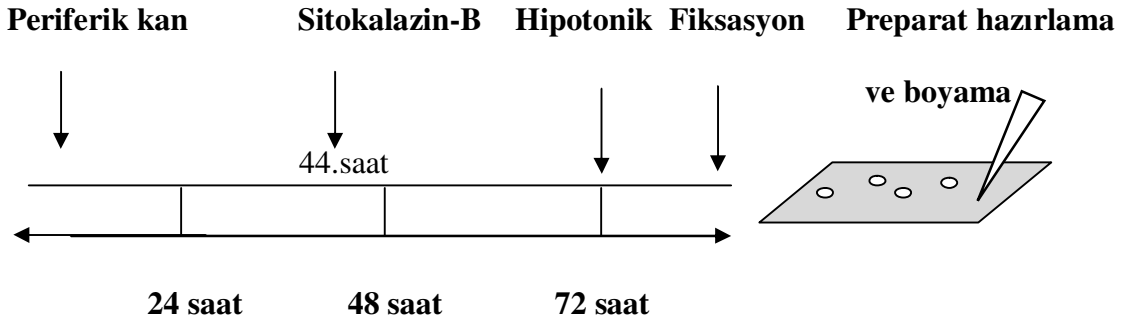
Çalışmaya dahil edilen hastalardan ameliyat olanların hipofiz biyopsisi Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji laboratuvarına gönderildi. Dokular %10 formolde 24 saat bekletildikten sonra rutin doku takip işlemine alındı. Parafine gömülen dokulara 0,4 mikronluk kesitler yapıldı. Bu kesitler hematoksilin eozin ile boyandı, mikroskopta değerlendirildi. Her olguya PRL, TSH, GH, ACTH, FSH ve LH boyası rutin olarak uygulandı. Bütün olguların patoloji sonucu, radyografik değişiklikler ile beraber değerlendirilip hipofiz adenomu olarak rapor edildi. Böylece hastalarımızın hangi tür hormon salgılayan hipofiz adenomu olduğu kesinleştirildi. Bütün immünohistokimyasal incelemeler ve patolojik değerlendirmeler aynı patolog tarafından yapıldı (FÖ).

Radyolojik Değerlendirme

Hastalara operasyon öncesi takiplerde Erciyes Üniversitesi Radyoloji Bölümünde üç boyutlu volümetrik hipofiz MR çekildi (Philips Gyroscan Intera 1.5 Tesla; 35 Best, Netherlands). MR'ların değerlendirilmesi ve raporlanması Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Bölümü tarafından yapıldı.

CBMN Yöntemi

CBMN yöntemine göre özetle, hastalardan alınan kan örnekleri hücre kültür medyumuna içeren kültür tüplerine eklendi ve 72 saatlik tam kan kültürü yapıldı. Kültürün 44. Saatinde cyt-B ilave edilerek binükleer hücrelerin oluşması sağlandı. 72 saatlik kültür sonrası kültür sonlandırılarak preparatlar hazırlandı (7, 8) (Şekil 3.1.)



Şekil 3.1. *In vitro* CBMN yöntemi protokolü.

1. Kültür Ortamının (Besiyerinin) Hazırlanması

Kullanılan malzemeler ve miktarları;

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

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

2. Kan Örneklerinin Alınması

Yeni teşhis konulmuş ve herhangi bir tedavi almamış hipofiz adenomlu hastalar ile herhangi bir sağlık problemi olmayan kontrol kişilerin yazılı onayları alındıktan sonra, heparinle yıkanmış enjektörlere 5 ml periferik kan örnekleri alındı.

3. Kültür Tekniği

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

1 mg cyt-B (Sigma, 6762), 1 ml dimetil sülfoksitte (DMSO) çözdürüldü ve total 5 ml olacak şekilde medyumla sulandırılarak hazırlandı. Çıkarımın 44. saatinde kültür tüpleri etüvden çıkartılarak steril ortamda her bir tüpe 75 µl (final konsantrasyonu: 3µg/ml) cyt-B ilave edilerek tekrar etüve konuldu.

4. Çıkarım İşlemleri

MN elde etmek için kullanılan Fenech (7, 8) metoduna göre ve bazı modifikasyonlarla (10,79) çıkarım işlemleri yapıldı.

0.1 M hipotonik solüsyonu, 1.864g KCL tartılıp distile su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

1. 72 saat inkübasyondan sonra kültür tüpleri etüvden çıkartılarak 1200 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi.
2. Dipte 0.6-0.7 ml kalıncaya kadar üstteki süpernatantlar atıldı.
3. Daha sonra tüplere laboratuvar ısısında beklemiş olan 0.1 M hipotonik solüsyonundan 6 ml eklenerek 4 dakika laboratuvar ısısında bekletildi.
4. Hücreler hipotonik solüsyonunda bekletildikten sonra 1200 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi.

5. Süpernatantları atılıp üzerine taze hazırlanmış soğuk fiksatiften 6 ml (3:1, metanol: glacial asetik asit) yavaşça damla damla ilave edilip bekletmeden 6 dakika 1200 rpm'de santrifüj edildi.
6. Süpernatantları tekrar atılıp üzerine aynı fiksatiften 6 ml ilave edilip, 6 dakika 1200 rpm'de santrifüj edildi.
7. Dipte 0.7 ml fiksatifli hücre bırakılarak süpernatantları tekrar atıldı ve bir gün buzdolabında (+4 °C) bekletildi.

5. Preparat Hazırlama

Lamlar temizlenerek içinde %70'lik metanol bulunan şaleye yerleştirilip soğuyuncaya kadar buzdolabı buzluğunda bekletildi. Daha sonra şaleden çıkarılan lamlar iyice kurulandı. Pastör pipeti ile fiksatifli hücre içeren kültür tüplerine pipetaj yapılarak hücre süspansiyonundan pastör pipeti yardımıyla lamlara yakın mesafeden (1- 2 cm yukarıdan) 9-10 damla damlatıldı. Lamlara hafifçe üflenerek hücrelerin lam üzerine iyice dağılması sağlandı ve kurumaya bırakıldı. Her bir kişi için, bir kültür tüpünden 2 tane olmak üzere toplam 4 preparat hazırlandı. Her kültür tüpü için ayrı pastör pipeti kullanılarak farklı preparatlar hazırlandı ve lamlar ayrı ayrı kodlandı.

6. Preparatların Boyanması ve Saklanması

Sorenson boya tamponu (pH=7.0):

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

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

7. Lamların İncelenmesi

Hazırlanan preparatlarda ışık mikroskopunda X40 büyütmede;

- *DNA hasarı için;* 1000 binükleer hücre sayıldı ve bulunan MN, NBUD ve NPB sayıları kaydedildi.

- *Hücre çoğalması için;* 1000 mononükleer hücre sayılırken bulunan binükleer, multi nükleer hücreler skorlandı ve NDI formülü kullanılarak nükleer bölünme indeksi hesaplandı.
- *Hücre ölümü için;* 1000 mononükleer hücre sayılırken gözlenen apoptotik ve nekrotik hücreler skorlandı.

Her bir kültür için 1000 BN hücrede MN, NPB ve NBUD sayıları kaydedilirken görülen metafaz sayıları da kaydedildi. Prometafaz ve metafaz evresindeki bir, iki, üç ve dört çekirdekli hücreler de, metafaz olarak kaydedildi.

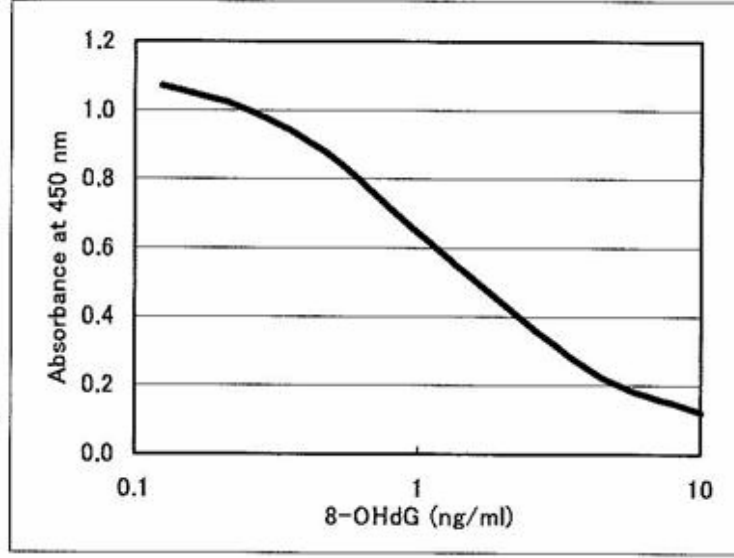
8. 8-OHdG seviyelerinin belirlenmesi

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

İşlem

Reaktiflerin tamamı oda ısısına getirildi. Plaka üzerinde standartların ve örneklerin konulacağı kuyucuklar belirlendi, 50 μL standartlardan ve örneklerden kendileri için belirlenen kuyucuklara eklendi. Blank için ayrılan kuyucuğa da 50 μL PBS eklendi. Sulandırılmış primer antikordan blank haricindeki bütün gözlere 50 μL ilave edilip, içeriğin düzgün karışmasını sağlamak için plaka hafifçe çalkalandı. Ağız kısmına kapak yapıştırılan plaka bir gece boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakıldı. İçeriği boşaltılan kuyucukların her birine 250 μL yıkama tamponu ilave edilip, yıkamadan iyi sonuç almak için plaka yavaşça sallandıktan sonra içeriği boşaltıldı ve yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. Yıkama işleminin ardından sulandırılmış sekonder antikordan her bir göze 100 μL eklenip, içeriğin karıştığından emin olmak için yavaşça çalkalandı. Yapışkan bant ile ağız kapatılan plaka oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi. Inkübasyon sonrası plaka içeriği boşaltıldı ve yıkama işlemi üç defa tekrarlandı. Plakanın her gözüne 100 μL TMB substrat eklendikten sonra hafifçe karıştırılarak karanlıkta ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Her bir göze 100 μL stop solüsyonu eklenerek 450 nm'de

absorbansı okundu. Standart eğri ELISA kiti içinde mevcut olan standardize edilmiş örneklerden elde edildi (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Standart Kalibrasyon Eğrisi

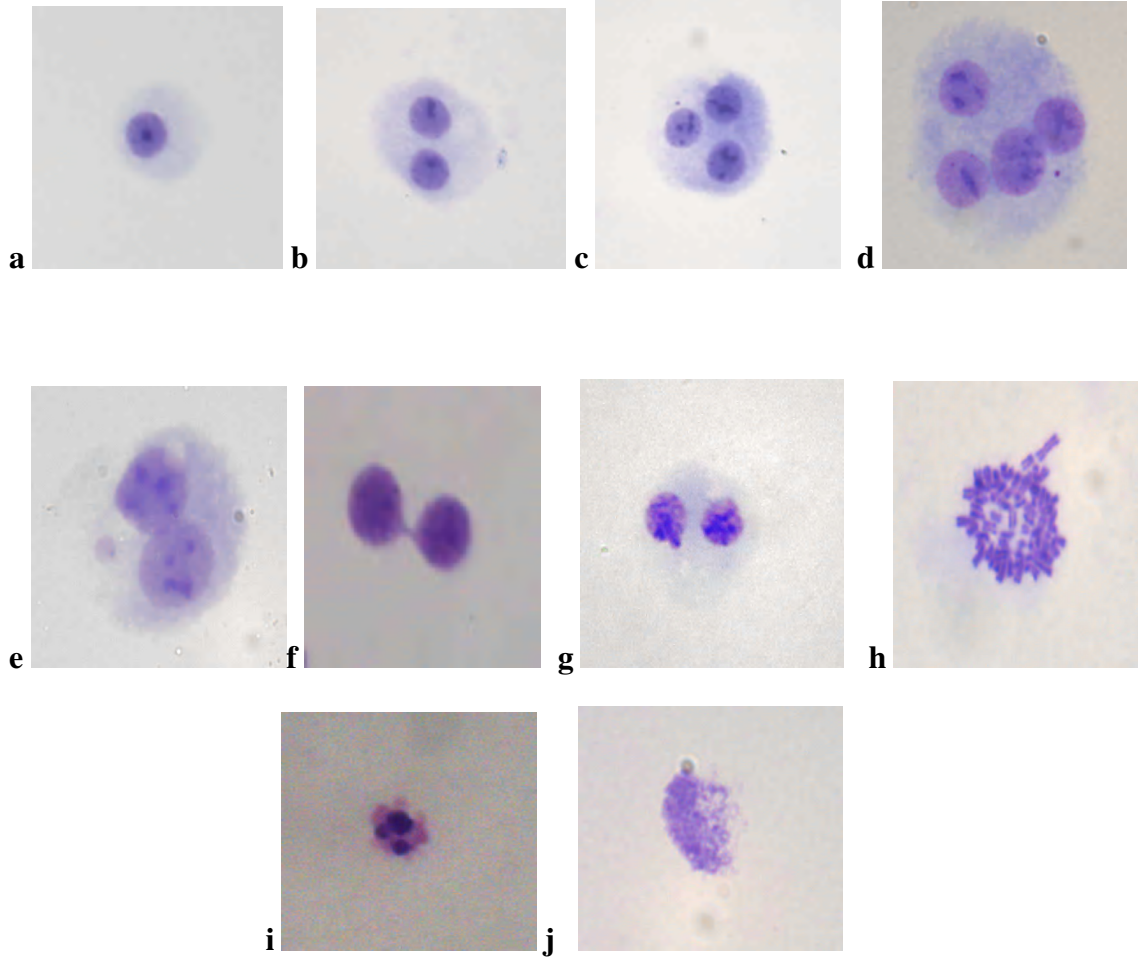
9. İstatistiksel Değerlendirme

Hipofiz adenomlu hastalara ait CBMN cyt yöntemi parametreleri ve plazma 8-OHdG seviyeleri istatistiksel olarak nonparametrik testlerden Mann-Whitney U testi ve Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı. Ayrıca hastalara ait CBMN cyt yöntemi parametreleri ve plazma 8-OHdG seviyelerinin, yaş, adenom büyüklüğü ve her bir hastalığa ilişkin hormonlar (IGF-1 ve PRL) ile ilişkisi Spearman rho korelasyon analizi ile değerlendirildi. Veriler, ortalama±standart sapma olarak verildi. P değeri < 0.05 olduğunda anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

30 Akromegali, 27 Prolaktinoma ve 30 Non-fonksiyone Adenom hasta ile toplam 35 kontrol kişi olmak üzere toplam 122 kişiden alınan kan örnekleri materyal ve metotta belirtilen yöntemlere göre kültüre edildi ve kültür sonunda hazırlanan preparatlarda ışıık mikroskobu yardımıyla CBMN cyt yöntemi parametreleri değeriendirildi. Ayrıca, hasta ve kontrol kişilere ait plazma örneklerinde 8-OHdG seviyeleri de ölçüldü.

Elde edilen preparatlar mikroskopta incelenerek, DNA hasarını belirlemek için, 1000 kadar BN hücreler sayıldı ve MN'lu, NPB'lü ve NBUD'lu BN hücreler kaydedildi. Aynı preparatlarda BN hücreler sayılırken, gözlenen metafaz sayısı da kaydedildi. Sitostatik etkileri belirlemek için, 1000 tane bir çekirdekli hücre sayılırken aynı zamanda iki çekirdekli (M2), üç çekirdekli (M3), dört çekirdekli (M4) her bir hücre skorlandı ve NDI oranları da hesaplandı. Ayrıca, sitotoksisiteyi belirlemek için, 1000 tane bir çekirdekli hücre sayılırken apoptotik ve nekrotik hücre sayıları da kaydedildi (Resim 4.1.).



Resim 4.1. a. Bir çekirdekli hücre; b. İki çekirdekli (BN) hücre; c. Üç çekirdekli (M3) hücre; d. Dört çekirdekli (M4) hücre; e. Bir MN'lu BN hücre; f. NPB'li BN hücre; g. NBUD'lu BN hücre; h. Metafaz hücresi; i. Apoptotik hücre; j. Nekrotik Hücre (100X).

AKROMEGALİLİ HASTALARA AİT BULGULAR

13'ü erkek, 17'si kadın 30 akromegalili hasta ve toplam 35 sağlıklı kontrolden hastalarla benzer yaş ve cinsiyette seçilmiş 30 sağlıklı kontrol kişiye ait yaş, IGF-1 düzeyleri, hipofiz adenom büyüklükleri, 8-OHdG seviyeleri ve CBMN cyt yöntemi parametrelerinin ortalama değerleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Akromegalili hastalar ile kontrollere ait serum IGF-1 düzeyleri karşılaştırıldığında, hastaların serum IGF-1 düzeyi kontrollere göre önemli derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Akromegalili hasta ve kontrollere ait yaş, IGF-1 düzeyleri, hipofiz adenom büyüklükleri, CBMN cyt yöntemi parametreleri ve plazma 8-OHdG seviyeleri sonuçları (ort $\pm$ S.S.)

	Akromegali (n=30)	Kontrol (n=30)	P değeri
Yaş (yıl)	44.9 $\pm$ 14.33	42.30 $\pm$ 12.97	0.49
Serum IGF-1 düzeyi (mU/l)	811.27 $\pm$ 323.55	212.07 $\pm$ 75.06	<0.001
Adenom büyüklüğü (mm)	17.74 $\pm$ 10.14	--	--
MN frekansı (%)	1.32 $\pm$ 0.49	0.78 $\pm$ 0.45	<0.001
NPB’li BN hücre frekansı (%)	4.35 $\pm$ 3.18	1.89 $\pm$ 0.86	<0.001
NBUD’lu BN hücre frekansı (%)	1.51 $\pm$ 0.77	0.88 $\pm$ 0.45	<0.001
Apoptotik hücre sayısı (%)	1.99 $\pm$ 0.85	1.16 $\pm$ 0.71	<0.001
Nekrotik hücre sayısı (%)	6.36 $\pm$ 3.21	2.92 $\pm$ 1.21	<0.001
Nükleer bölünme indeksi (NDI)	1.26 $\pm$ 0.08	1.23 $\pm$ 0.10	0.34
8-OHdG seviyesi (ng/mL)	1.27 $\pm$ 0.81	0.67 $\pm$ 0.45	<0.005

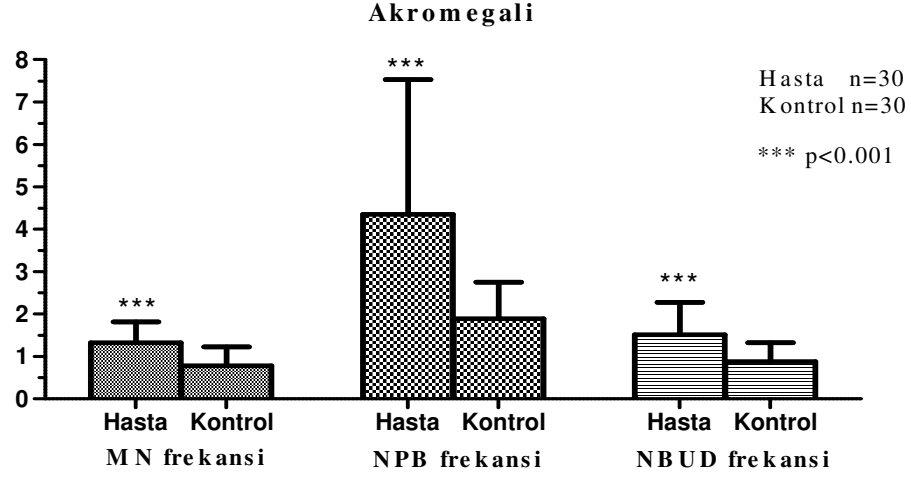
Akromegalili hasta ve kontrollerde CBMN cyt yöntemi parametreleri ve plazma 8-OHdG seviyeleri ile yaş, hipofiz adenom büyüklüğü (mm) ve serum IGF-1 düzeyleri arasındaki Spearman rho korelasyon katsayıları ve önem değerleri Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Akromegalili hasta ve kontrollerde CBMN cyt yöntemi parametreleri ve plazma 8-OHdG seviyeleri ile yaş, hipofiz adenom büyüklüğü ve serum IGF-1 düzeyleri arasındaki Spearman rho korelasyon katsayıları ve önem değerleri.

	MN frekansı (%)	NPB'li BN hücre frekansı (%)	NBUD'lu BN hücre frekansı (%)	Apoptotik hücre frekansı (%)	Nekrotik hücre frekansı (%)	NDI	8-OHdG seviyesi (ng/mL)
Akromegali hasta (n=30)							
Yaş r p	0.309 0.096	0.475** 0.008	0.288 0.123	0.414* 0.023	0.293 0.117	0.368* 0.045	-0.145 0.445
IGF-1 düzeyi (mU/l) r p	0.439* 0.015	-0.520** 0.003	-0.091 0.634	-0.401* 0.028	-0.114 0.549	-0.135 0.478	0.150 0.430
Hipofiz Adenom Büyüklüğü (mm) r p	0.021 0.914	-0.042 0.830	-0.142 0.461	-0.413* 0.026	-0.102 0.598	-0.264 0.166	-0.118 0.541
Kontrol (n=30)							
Yaş r p	0.122 0.522	0.420* 0.021	0.429* 0.018	0.014 0.941	-0.236 0.210	-0.554** 0.001	-0.175 0.355
IGF-1 düzeyi (mU/l) r p	-0.157 0.407	-0.125 0.511	-0.272 0.146	-0.264 0.159	-0.163 0.390	0.012 0.950	0.250 0.183

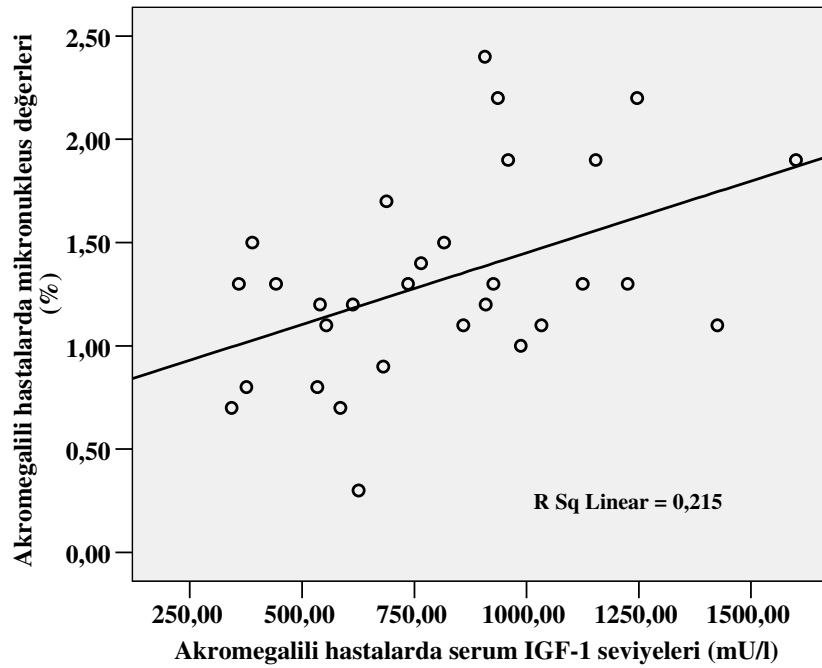
Akromegalili Hastalarda DNA Hasarı Sonuçları

Akromegalili hastaların lenfositlerindeki MN, NPB ve NBUD frekansları kontrollerle karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla; $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$; Tablo 4.1 ve Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Akromegalili hasta ve kontrollerde sırasıyla; MN (1.32 ± 0.49 ve 0.78 ± 0.45), NPB (4.35 ± 3.18 ve 1.89 ± 0.86) ve NBUD (1.51 ± 0.77 ve 0.88 ± 0.45) frekansı

Akromegalili hastalarda artan serum IGF-1 düzeyi ile NPB frekansı azalırken ($p<0.01$, $r:-0.520$), MN frekansının arttığı bulundu ($p<0.05$, $r:0.439$, Şekil 4.2.)

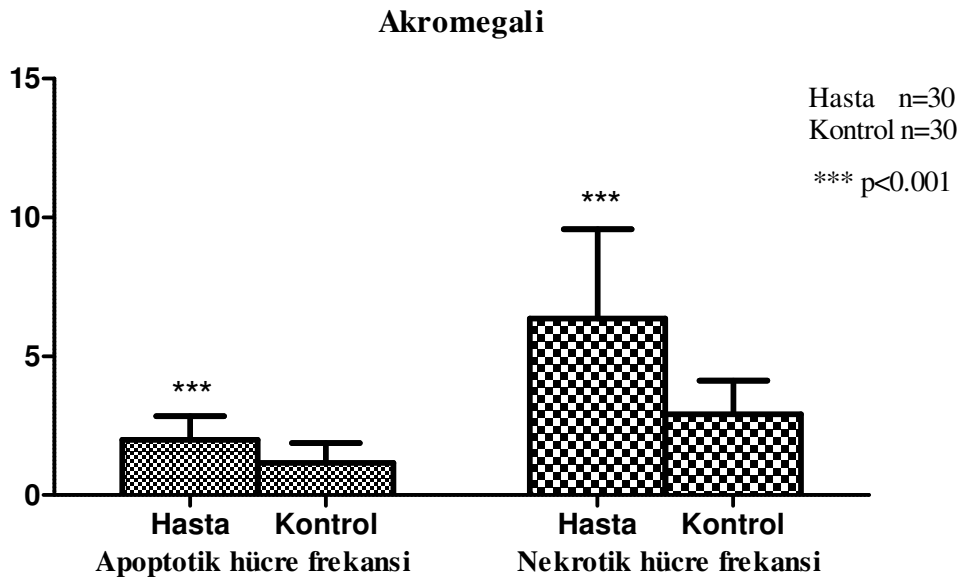


Şekil 4.2. Akromegalili hastalarda artan serum IGF-1 düzeyi ile MN frekansı arasındaki korelasyon ($p<0.05$, $r:0.439$)

Akromegalili hastalarda ve kontrollerde NPB frekansının yaş ile ilişkili olarak arttığı bulundu (sırasıyla, $p<0.01$, $r:0.475$ ve $p<0.05$, $r:0.420$). Kontrollerde yaş ile NBUD frekansında anlamlı bir artış bulunurken ($p<0.05$, $r:0.429$), akromegalili hastalarda ise anlamlı bir artış bulunamadı.

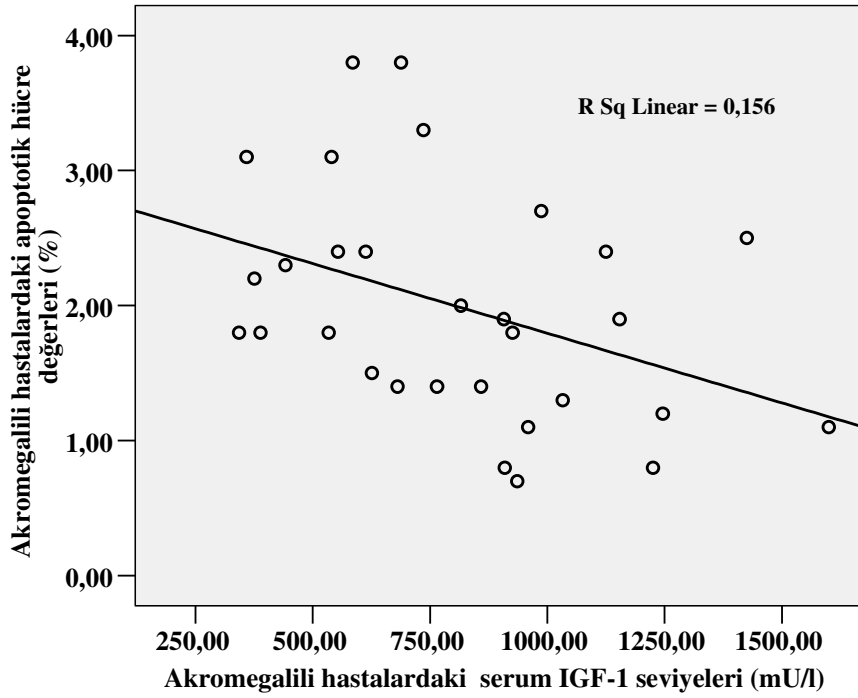
Akromegalili Hastalarda Sitotoksite Sonuçları

Akromegalili hastaların lenfositlerindeki apoptotik ve nekrotik hücre frekansının kontrollerle karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu (sırasıyla, $p<0.001$ ve $p<0.001$; Tablo 4.1 ve Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Akromegalili hasta ve kontrollerde sırasıyla: apoptotik (1.99 ± 0.85 ve 1.16 ± 0.71) ve nekrotik (6.36 ± 3.21 ve 2.92 ± 1.21) hücre frekansı

Akromegalili hastalarda artan serum IGF-1 düzeyi ile apoptotik hücre frekansının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü ($p<0.05$, $r:-0.401$, Şekil 4.4.). Akromegali hastalarda yaş ile apoptotik hücre frekansı arasında önemli bir korelasyon bulundu ($p<0.05$, $r:0.414$). Akromegali hastalarda hipofiz adenom büyüklüğü ile apoptotik hücre frekansı arasında negatif yönde bir ilişki olduğu bulundu ($p<0.05$, $r:-0.413$).



Şekil 4.4. Akromegalili hastalarda artan serum IGF-1 düzeyi ile apoptotik hücre frekansı arasındaki korelasyon ($p < 0.05$, $r = -0.401$)

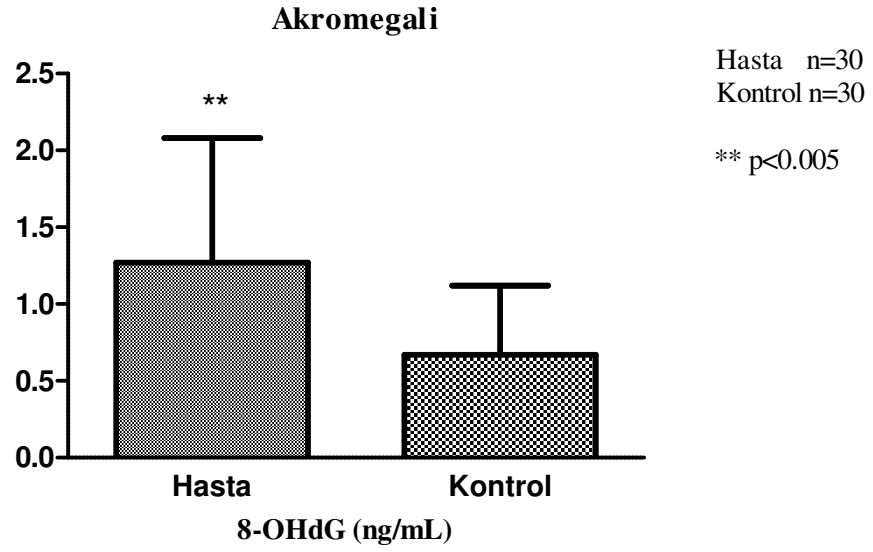
Akromegalili Hastalarda Sitostazi Sonuçları

Akromegalili hasta ve kontrollerde NDI değerleri karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0.05$; Tablo 4.1).

Akromegalili hasta ve kontrollerde yaş ile NDI değerleri arasında korelasyon olduğu bulundu (sırasıyla, $p < 0.05$, $r = 0.368$ ve $p < 0.001$, $r = -0.554$).

Akromegalili Hastalarda 8-OHdG Sonuçları

Akromegalili hastalarda plazma 8-OHdG (ng/ml) seviyelerinin kontrollere göre önemli derecede yüksek olduğu bulundu ($p < 0.005$; Tablo 4.1 ve Şekil 4.5.). Akromegalili hasta ve kontrollerde plazma 8-OHdG seviyeleri ile yaş, hipofiz adenom büyüklüğü ve serum IGF-1 düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p > 0.05$; Tablo 4.2).



Şekil 4.5. Akromegalili hasta (1.27 ± 0.81) ve kontrollerde (0.67 ± 0.45) plazma 8-OHdG seviyeleri

PROLAKTİNOMALI HASTALARA AİT BULGULAR

10'u erkek, 17'si kadın 27 prolaktinomali hasta ve toplam 35 sağlıklı kontrolden hastalarla benzer yaş ve cinsiyette seçilmiş 20 kontrol kişiye ait yaş, PRL seviyeleri, hipofiz adenom büyüklükleri, plazma 8-OHdG seviyeleri ve CBMN cyt yöntemi parametreleri ortalama değerleri Tablo 4.3'de gösterildi.

Prolaktinomali hastalar ile kontrollere ait serum PRL seviyeleri karşılaştırıldığında, hasta PRL seviyelerinin kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu ($p < 0.001$; Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Prolaktinomalı hastalara ve kontrollere ait yaş, PRL seviyeleri, hipofiz adenom büyüklükleri,CBMN cyt yöntemi parametreleri ve plazma 8-OHdG seviyeleri ortalamaları (ort $\pm$ S.S.)

	Prolaktinoma (n=27)	Kontrol (n=20)	P değeri
Yaş (yıl)	40.22 $\pm$ 9.67	38.75 $\pm$ 10.43	0.58
PRL seviyesi (ng/mL)	252.93 $\pm$ 200.42	10.59 $\pm$ 5.41	<0.001
Adenom büyüklüğü (mm)	13.24 $\pm$ 11.69	--	--
MN frekansı (%)	0.98 $\pm$ 0.39	0.74 $\pm$ 0.54	<0.05
NPB'li BN hücre frekansı (%)	4.98 $\pm$ 2.80	2.13 $\pm$ 0.96	<0.001
NBUD'lu BN hücre frekansı (%)	1.71 $\pm$ 1.16	0.79 $\pm$ 0.45	<0.005
Apoptotik hücre sayısı (%)	4.05 $\pm$ 1.94	1.23 $\pm$ 0.71	<0.001
Nekrotik hücre sayısı (%)	7.27 $\pm$ 3.74	3.49 $\pm$ 1.43	<0.001
Nükleer bölünme indeksi (NDI)	1.33 $\pm$ 0.15	1.24 $\pm$ 0.10	0.091
8-OHdG seviyesi (ng/mL)	0.90 $\pm$ 0.35	0.61 $\pm$ 0.17	<0.005

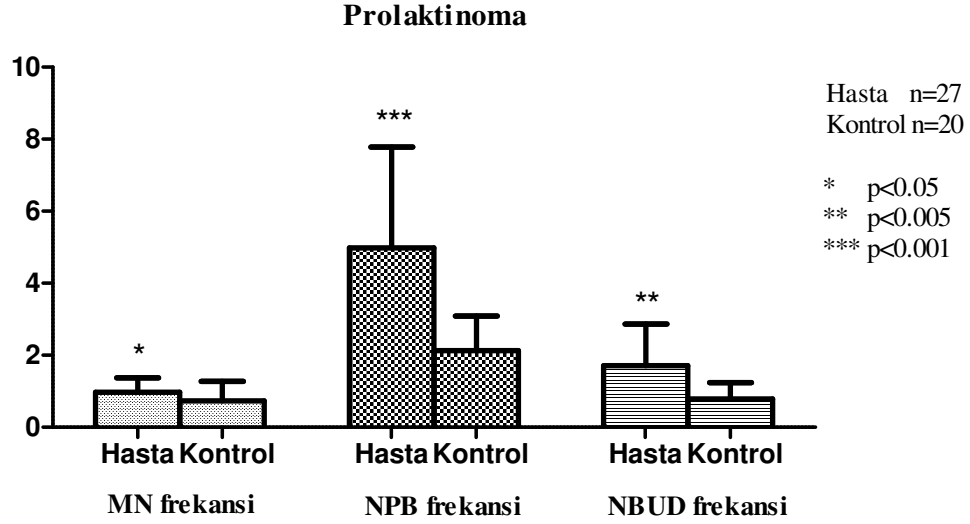
Prolaktinomalı hastalarda ve kontrollerde CBMN cyt yöntemi parametreleri ve plazma 8-OHdG seviyeleri ile yaş, hipofiz adenom büyüklüğü (mm) ve PRL seviyeleri arasındaki Spearman rho korelasyon katsayıları ve önem değerleri Tablo 4.4.'de sunulmuştur.

Tablo 4.4. Prolaktinomali hasta ve kontrollerde CBMN cyt yöntemi parametreleri ve plazma 8-OHdG seviyeleri ile yaş, hipofiz adenom büyüklüğü (mm) ve PRL seviyeleri arasındaki Spearman rho korelasyon katsayıları ve önem değerleri.

	MN frekansı (%)	NPB'li BN hücre frekansı (%)	NBUD'lu BN hücre frekansı (%)	Apoptotik hücre frekansı (%)	Nekrotik hücre frekansı (%)	NDI	8-OHdG seviyesi (ng/mL)
Prolaktinoma hasta (n=27)							
Yaş r p	0.406* 0.036	-0.119 0.554	0.125 0.534	0.290 0.142	0.207 0.301	0.034 0.868	-0.352 0.072
PRL seviyesi (ng/mL) r p	0.431* 0.025	0.016 0.937	-0.025 0.902	0.282 0.154	0.137 0.496	0.019 0.926	0.060 0.766
Hipofiz Adenom Büyüklüğü (mm) r p	0.460* 0.016	-0.052 0.796	0.023 0.909	0.313 0.111	0.128 0.524	0.133 0.509	-0.016 0.935
Kontrol (n=20)							
Yaş r p	0.382 0.096	0.047 0.843	0.173 0.467	0.023 0.922	-0.526* 0.017	-0.409 0.073	-0.048 0.840
PRL seviyesi (ng/mL) r p	-0.316 0.175	-0.244 0.300	-0.280 0.232	0.028 0.907	0.288 0.218	0.283 0.226	0.383 0.096

Prolaktinomali Hastalarda DNA Hasarı Sonuçları

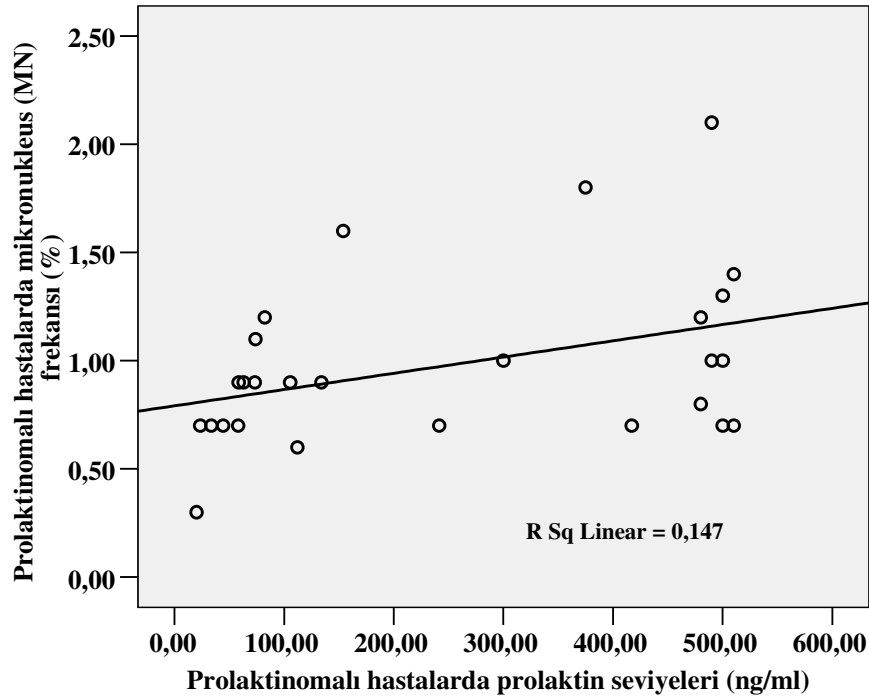
Prolaktinomali hastalara ait lenfositlerdeki MN, NPB ve NBUD frekansı kontrollerle karşılaştırıldığında, kontrollerden önemli derecede yüksek bulundu (sırasıyla; $p<0.05$, $p<0.001$, $p<0.005$; Tablo 4.3 ve Şekil 4.6).



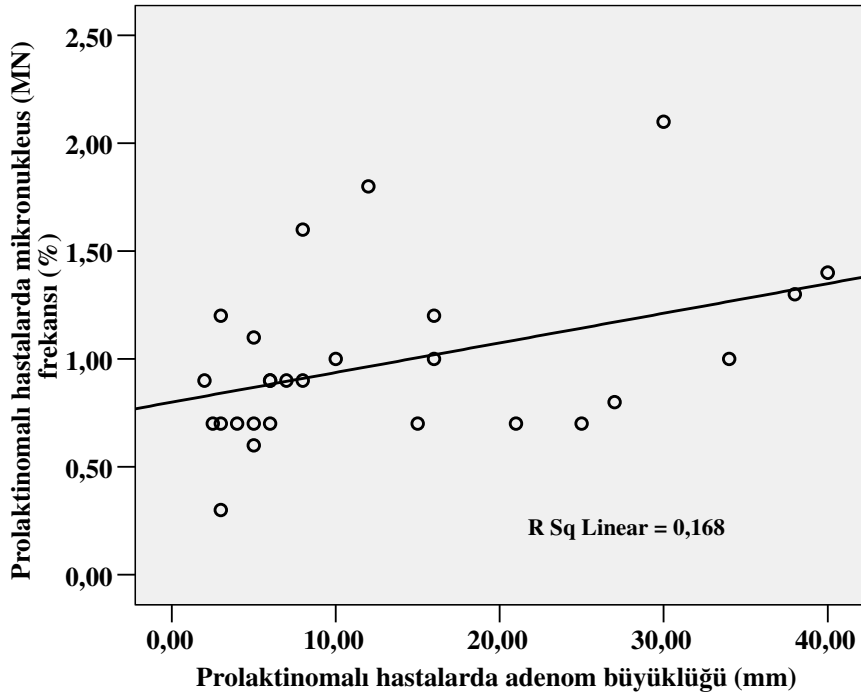
Şekil 4.6. Prolaktinomali hastalarda ve kontrollerde sırasıyla MN (0.98 ± 0.39 ve 0.74 ± 0.54), NPB (4.98 ± 2.80 ve 2.13 ± 0.96) ve NBUD (1.71 ± 1.16 ve 0.79 ± 0.45) frekansı

Prolaktinomali hastalarda artan PRL seviyesi ($p<0.05$, $r:0.431$; Tablo 4.4 ve Şekil 4.7) ve hipofiz adenom büyüklüğü ($p<0.05$, $r:0.460$; Tablo 4.4 ve Şekil 4.8.) ile MN frekansının arttığı bulundu.

Prolaktinomali hastalarda yaş ile MN frekansının arttığı bulunurken ($p<0.05$, $r:0.406$), kontrollerde yaş ile MN frekansı arasında bir korelasyon bulunamadı ($p>0.05$).



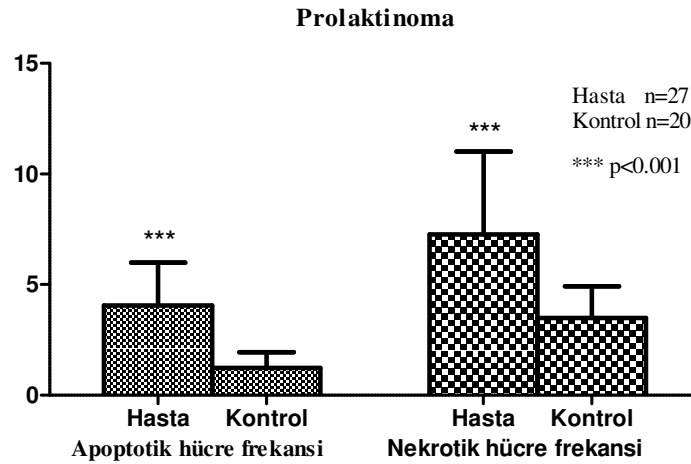
Şekil 4.7. Prolaktinomali hastalarda prolaktin seviyesi ile MN frekansı arasındaki korelasyon ($p<0.05$, $r:0.431$)



Şekil 4.8. Prolaktinomalı hastalarda hipofiz adenom büyüklüğü ile MN frekansı arasındaki korelasyon ($p < 0.05$, $r = 0.460$)

Prolaktinomalı Hastalarda Sitotoksite Sonuçları

Prolaktinomalı hastaların lenfositlerindeki apoptotik ve nekrotik hücre frekansı kontrollerle karşılaştırıldığında, kontrollerden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu (sırasıyla, $p < 0.001$ ve $p < 0.001$; Tablo 4.3 ve Şekil 4.9.).



Şekil 4.9. Prolaktinomalı hastalarda ve kontrollerde sırasıyla apoptotik (4.05 ± 1.94 ve 1.23 ± 0.71) ve nekrotik (7.27 ± 3.74 ve 3.49 ± 1.43) hücre frekansı

Prolaktinomali hastalardaki PRL seviyesi, hipofiz adenom büyüklüğü ve yaş ile apoptotik ve nekrotik hücre frekansı arasında herhangi bir korelasyon bulunamadı ($p>0.05$). Kontrollerde ise yaş ile nekrotik hücre frekansı arasında negatif yönde bir ilişki bulundu ($p<0.05$, $r:-0.526$; Tablo 4.4).

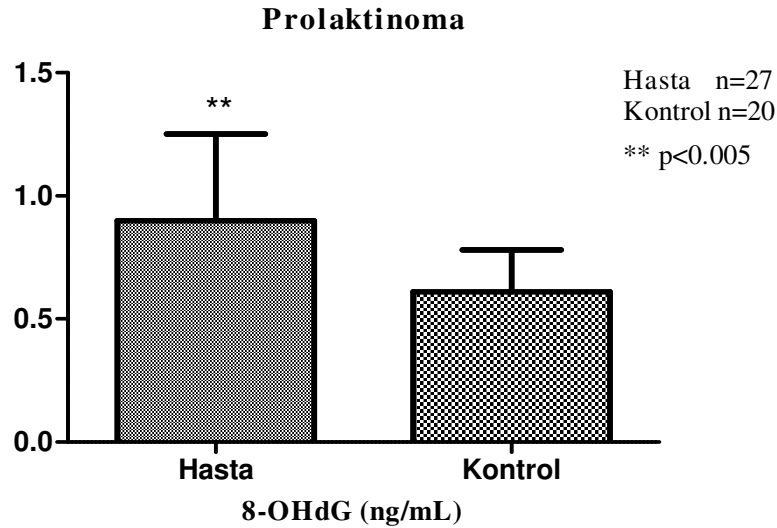
Prolaktinomali Hastalarda Sitostazi Sonuçları

Prolaktinomali hastalarda ve kontrollerde NDI değerleri karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$).

Prolaktinomali hastalarda ve kontrollerde PRL seviyesi, hipofiz adenom büyüklüğü ve yaş ile NDI değerleri arasında herhangi bir korelasyon bulunamadı ($p>0.05$; Tablo 4.4).

Prolaktinomali Hastalarda 8-OHdG Sonuçları

Prolaktinomali hastalarda plazma 8-OHdG (ng/mL) seviyeleri kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.005$, Tablo 4.3, Şekil 4.10.). Prolaktinomali hastalar ve kontrollerde plazma 8-OHdG seviyeleri ile PRL seviyeleri, hipofiz adenom büyüklüğü ve yaş arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p>0.05$; Tablo 4.4).



Şekil 4.10. Prolaktinomali hastalarda (0.90 ± 0.35) ve kontrollerde (0.61 ± 0.17) plazma 8-OHdG seviyeleri

NON-FONKSİYONE ADENOMLU HASTALARA AİT BULGULAR

13'ü kadın, 17'si erkek 30 non-fonksiyone adenomlu hasta ve toplam 35 sağlıklı kontrolden hastalarla benzer yaş ve cinsiyette seçilmiş 20 kontrol kişiye ait yaş, hipofiz adenom büyüklükleri, plazma 8-OHdG seviyeleri ve CBMN cyt yöntemi parametreleri ortalama değerleri Tablo 4.5' de gösterildi.

Tablo 4.5. Non-fonksiyone adenomlu hastalara ve kontrollere ait yaş, hipofiz adenom büyüklükleri, CBMN cyt yöntemi parametreleri ve 8-OHdG seviyeleri ortalamaları (ort $\pm$ S.S.)

	Non-fonksiyone Adenom (n=30)	Kontrol (n=20)	P değeri
Yaş (Yıl)	53.00 $\pm$ 13.39	48.95 $\pm$ 13.84	0.29
Adenom büyüklüğü (mm)	26.83 $\pm$ 10.32	--	--
MN frekansı (%)	1.82 $\pm$ 0.66	0.73 $\pm$ 0.32	<0.001
NPB'li BN hücre frekansı (%)	5.66 $\pm$ 3.04	2.01 $\pm$ 0.93	<0.001
NBUD'lu BN hücre frekansı (%)	2.83 $\pm$ 1.13	0.93 $\pm$ 0.46	<0.001
Apoptotik hücre sayısı (%)	5.70 $\pm$ 3.52	1.30 $\pm$ 0.81	<0.001
Nekrotik hücre sayısı (%)	5.09 $\pm$ 3.05	2.86 $\pm$ 1.08	<0.005
Nükleer bölünme indeksi (NDI)	1.29 $\pm$ 0.79	1.20 $\pm$ 0.87	<0.001
8-OHdG seviyesi (ng/mL)	0.43 $\pm$ 0.32	0.64 $\pm$ 0.18	<0.001

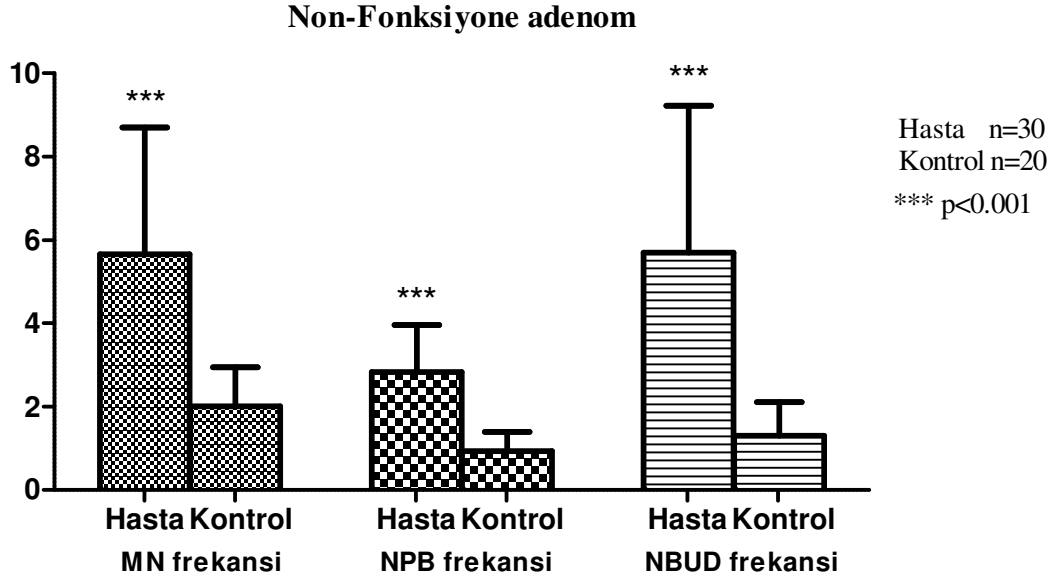
Non-fonksiyone adenomlu hastalarda ve kontrollerde CBMN cyt yöntemi parametreleri ve plazma 8-OHdG seviyeleri ile yaş ve hipofiz adenom büyüklüğü arasındaki Spearman rho korelasyon katsayıları ve önem değerleri Tablo 4.6'da gösterildi.

Tablo 4.6. Non-fonksiyone adenomlu hastalarda ve kontrollerde CBMN cyt yöntemi parametreleri ve 8-OHdG seviyeleri ile yaş ve hipofiz adenom büyüklüğü (mm) arasındaki Spearman rho korelasyon katsayıları ve önem değerleri.

	MN frekans (%)	NPB'li BN hücre frekans (%)	NBUD'lu BN hücre frekans (%)	Apoptotik hücre frekans (%)	Nekrotik hücre frekans (%)	NDI	8-OHdG seviyesi (ng/mL)
Non-fonksiyonel adenom hasta (n=30)							
Yaş	-0.133	0.103	0.161	-0.054	0.011	-0.176	0.065
r	0.482	0.590	0.396	0.776	0.954	0.352	0.732
p							
Hipofiz Adenom Büyüklüğü (mm)	-0.202	-0.280	-0.236	-0.387*	-0.408*	-0.110	-0.168
r	0.284	0.134	0.209	0.034	0.025	0.562	0.375
p							
Kontrol (n=20)							
Yaş	0.160	0.134	0.406	0.020	-0.272	-0.296	0.002
r	0.501	0.575	0.075	0.935	0.246	0.205	0.995
p							

Non-fonksiyone Adenomlu Hastalarda DNA Hasarı Sonuçları

Non-fonksiyone adenomlu hastaların lenfositlerindeki MN, NPB ve NBUD frekansının kontrollerle karşılaştırıldığında, kontrollerden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu (sırasıyla; $p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$; Tablo 4.5 ve Şekil 4.11).



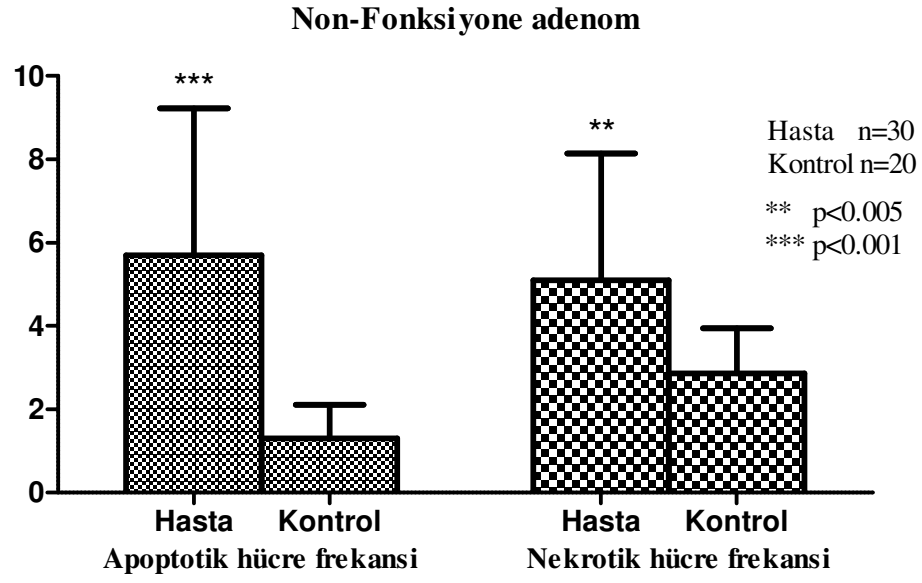
Şekil 4.11. Non-fonksiyone adenomlu hastalarda ve kontrollerde sırasıyla MN (5.66 ± 3.04 ve 2.01 ± 0.93), NPB (2.83 ± 1.13 ve 0.93 ± 0.46) ve NBUD (5.70 ± 3.52 ve 1.30 ± 0.81) frekansı

Non-fonksiyone adenomlu hastalarda ve kontrollerde, yaş ve hipofiz adenom büyüklüğü ile DNA hasarı parametreleri (MN, NPB ve NBUD frekansı) arasında herhangi bir korelasyon bulunamadı ($p > 0.05$; Tablo 4.6).

Non-fonksiyone Adenomlu Hastalarda Sitotoksite Sonuçları

Non-fonksiyone adenomlu hastaların lenfositlerindeki apoptotik ve nekrotik hücre frekansı kontrollerle karşılaştırıldığında, kontrollerden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu (sırasıyla, $p < 0.001$ ve $p < 0.005$; Tablo 4.5 ve Şekil 4.12).

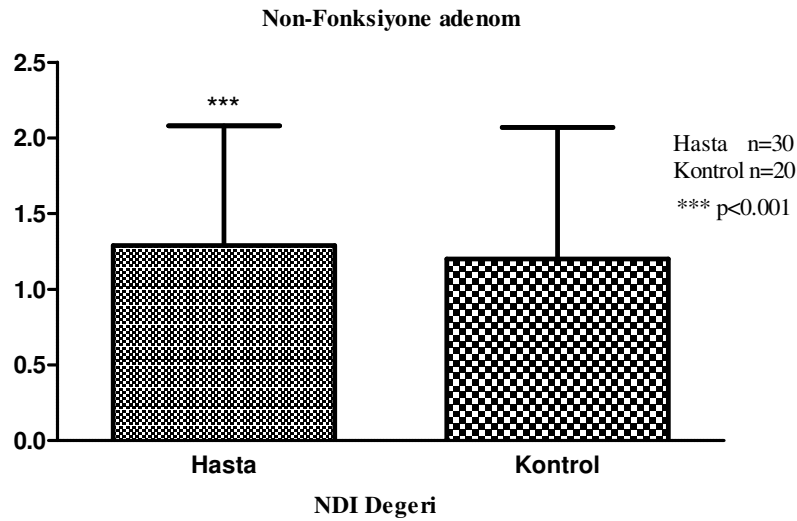
Non-fonksiyone adenomlu hastalarda hipofiz adenom büyüklüğü ile apoptotik ve nekrotik hücre frekansı arasında negatif yönde bir ilişki olduğu bulundu ($p < 0.05$, sırasıyla; $r: -0.387$, $r: -0.408$; Tablo 4.6).



Şekil 4.12. Non-fonksiyone adenomlu hastalarda ve kontrollerde sırasıyla apoptotik (5.70 ± 3.52 ve 1.30 ± 0.81) ve nekrotik (5.09 ± 3.05 ve 2.86 ± 1.08) hücre frekansı

Non-fonksiyone Adenomlu Hastalarda Sitostazi Sonuçları

Non-fonksiyone adenomlu hastaların NDI değerleri kontrollerle karşılaştırıldığında, kontrollerden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu ($p < 0.001$; Tablo 4.5 ve Şekil 4.13)



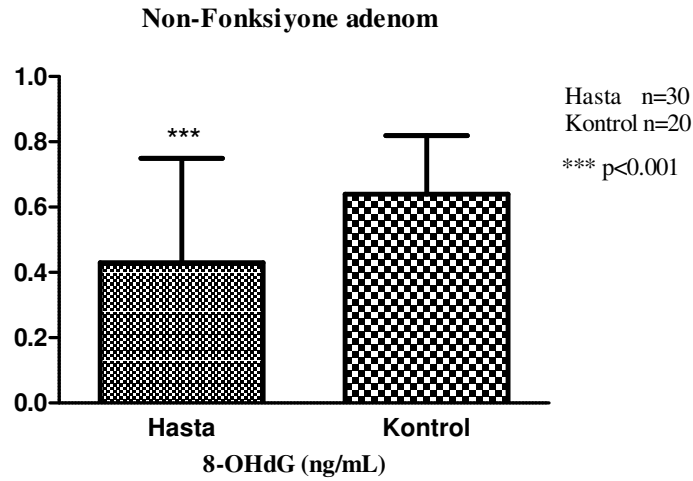
Şekil 4.13. Non-fonksiyone adenomlu hastalarda (1.29 ± 0.79) ve kontrollerde (1.20 ± 0.87) NDI değerleri

Non-fonksiyone adenomlu hastalarda ve kontrollerde, yaş ve hipofiz adenom büyüklüğü ile NDI değerleri arasında herhangi bir korelasyon bulunamadı ($p>0.05$; Tablo 4.6).

Non-fonksiyone Adenomlu Hastalarda 8-OHdG Sonuçları

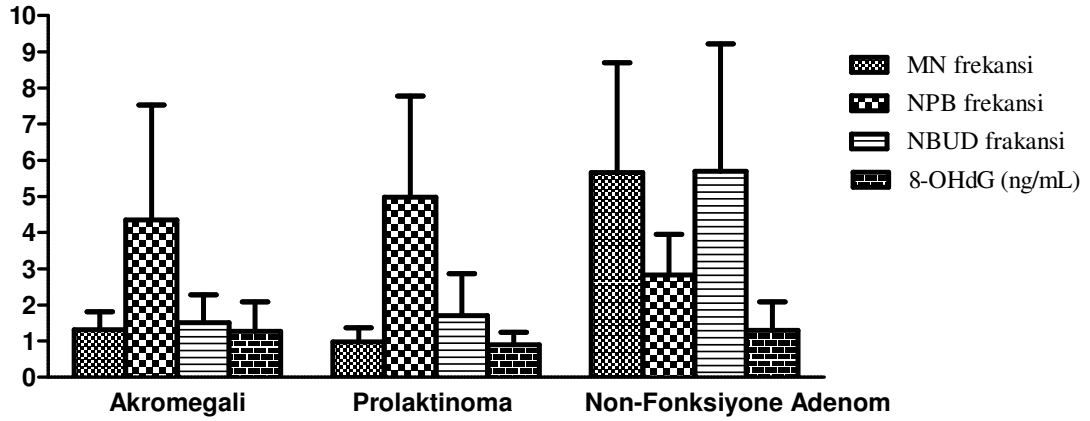
Non-fonksiyone adenomlu hastaların plazma 8-OHdG (ng/mL) seviyelerinin kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu bulundu ($p<0.001$; Tablo 4.5 ve Şekil 4.14.).

Non-fonksiyone adenomlu hastalarda ve kontrollerde plazma 8-OHdG seviyeleri ile yaş ve hipofiz adenom büyüklüğü arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı ($p>0.05$; Tablo 4.6).



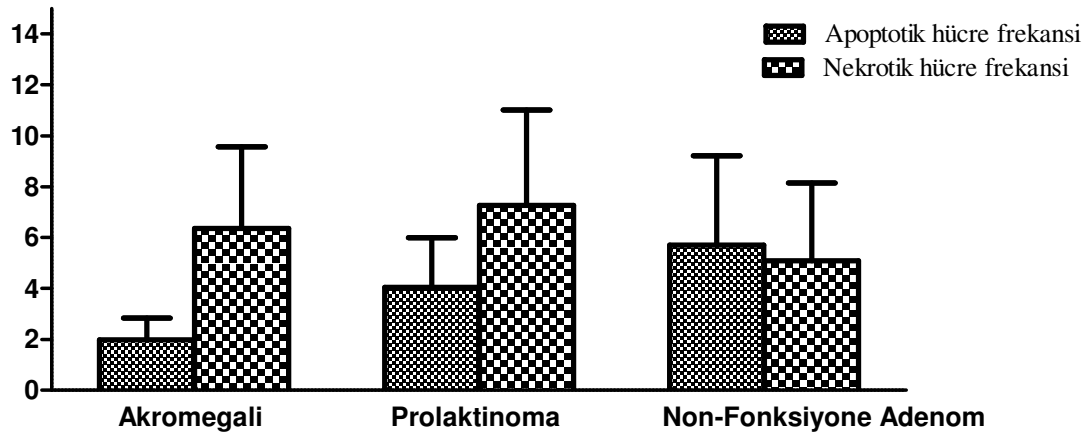
Şekil 4.14. Non-fonksiyone adenomlu hastalarda (0.43 ± 0.32) ve kontrollerde (0.64 ± 0.18) plazma 8-OHdG seviyeleri

Çalışmamızda hastalara ait DNA hasar parametreleri kontrollerden istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunduğu için, üç hipofiz adenomlu hastalara ait DNA hasar parametreleri kendi aralarında karşılaştırıldı ve en fazla kromozomal DNA hasarı non-fonksiyone adenomlu hastalarda bulunurken ($p<0.001$), en fazla oksidatif DNA hasarının akromegalili hastalarda ($p<0.001$) olduğu gözlemlendi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Hipofiz adenomlarının DNA hasarı açısından karşılaştırılması.

Çalışmamızda hastalara ait apoptotik ve nekrotik hücre frekansları kontrollerden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunduğu için, üç hipofiz adenomlu hastalara ait apoptotik ve nekrotik hücre frekansları kendi aralarında karşılaştırıldı. Apoptotik hücrelerin en fazla non-fonksiyone adenomlu hastalarda ($p < 0.001$) nekrotik hücrelerin ise en fazla prolaktinomali hastalarda ($p < 0.05$) olduğu gözlemlendi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Hipofiz adenomlarının apoptotik ve nekrotik hücre frekansları açısından karşılaştırılması

Çalışmamızda akromegalili ve prolaktinomali hastalara ait NDI değerlerinde kontrollere göre istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamazken ($p > 0.05$), sadece non-fonksiyone adenomlu hastalarda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). Bu yüzden, üç hipofiz adenomlu hastalara ait NDI değerleri arasında karşılaştırma yapılamadı.

5. TARTIşMA VE SONUÇ

Hipofiz bezi çeşitli salgı hücreleri içermektedir. Laktotroplar prolaktin, somatotroplar büyüme hormonu, kortikotroplar adrenokortikotrop hormon, tirotroplar tiroid stimülan hormon, gonadotroplar follikül stimülan hormon ve lüteinizan hormon salgırlarlar. Bu salgı hücrelerinin tümörleri farklı klinik özellikler göstermektedir. Hipofiz adenomu denildiğı zaman tek bir homojen tümör tipi olarak değeriendirilmemelidir. Salgıladıkları hormona göre farklı biyolojik davranış özellikleri, etyolojileri ve patogenezi olabir (80).

Morfolojik olarak hepsi adenom olarak tanımlanan birçok tümör farklı davranışlar göstermekte, prognozları ve tedavileri farklı olmaktadır. Hipofiz adenomlarının bu farklılıklarını anlamak ve prognozu belirleyici parametreleri tanımlayabilmek, bu tümörleri sınıflayabilmek ve böylece hipofiz adenomlarını daha etkin bir şekilde tedavi edebilmek için tümör etyopatogenezi anlamak çok önemlidir. Son yıllarda hipofiz adenomlarının tümör genezi ve proliferasyonu üzerine yoğun çalışmalar sürdürölmesine rağmen, elimizde henüz çok az kesinleşmiş bilgi vardır. Hipofiz hücresinde tümör gelişimini hangi etkenlerin başlattığı henüz tam olarak bilinmemektedir. Tümörün başlangıcından daha çok onkogenlerin aktivasyonu, progresyonundan ise ilave genetik mutasyonlar, özellikle tümör süpresör genlerdeki inaktivasyonlar sorumlu tutulmaktadır (81, 82).

Yaptığımız literatür incelemesine göre, hipofiz adenomlarında (prolaktinoma, akromegali ve non-fonksiyone adenomlar) kromozomal/oksidatif DNA hasarını araştıran herhangi bir araştırmaya rastlanmaması üzerine, çalışmamızda en sık görülen hipofiz adenomlarından prolaktinoma, akromegali ve non-fonksiyone adenomlarda hipofiz hormonlarının DNA hasarı üzerine olası etkisinin CBMN cyt ve 8-OHdG yöntemleri kullanılarak araştırılması planlandı.

Çalışmamızda kullanılan CBMN cyt yöntemi, insan periferik kan lenfositlerinde genom instabilitesi ve DNA hasarının, hücre bölünme durumunun ve hücre canlılığının aynı zamanda sitolojik olarak değerlendirilmesine imkan sağlayan bir yöntemdir. Böylece, CBMN cyt yöntemi ile eş zamanlı olarak aynı preparatlar üzerinde, DNA hasarı (MN, NPB, NBUD sayısı), sitotoksite (apoptotik ve nekrotik hücre sayıları) ve sitostazi (NDI oranları) ölçülebilmektedir (83). Ayrıca, plazmada 8-OHdG seviyeleri ile de oksidatif DNA hasarı ölçülebilmektedir (12).

MN frekansı mesleki ve çevresel maruziyet, hipertansiyon, diyabet, kalp gibi hastalıklar, farklı beslenme alışkanlıkları, egzersiz, fazla çay ve kahve tüketimi gibi faktörlere bağlı olarak artabilir (61, 62, 84). Bu nedenle, çalışmamızda da MN frekansını etkileyebilecek bu özellikleri taşıyan hasta ve kontrol kişiler çalışmaya dahil edilmedi.

Akromegalili hastalarda;

Z Hamurcu ve ark. (9) tarafından daha önce akromegalili hastalarda MN frekansının arttığı rapor edilmişti. Bu çalışmada ise akromegalili hastalarda sadece MN frekansı değil, diğer DNA hasar parametreleri de (NPB ve NBUD) değerlendirilmiştir ve Hamurcu ve ark.'nın çalışmalarını destekleyecek şekilde, tüm DNA hasar parametrelerinin (MN, NPB ve NBUD frekansları), kontrollerle karşılaştırıldığında önemli derecede arttığı bulunmuştur. Aynı zamanda, bu hastalarda oksidatif DNA hasar düzeyi de araştırılmıştır. Yapılan literatür araştırmalarına göre akromegalili hastalarda oksidatif DNA hasarını gösteren Nishizawa ve ark. (85)'nin çalışması dışında herhangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Bu çalışmada, oksidatif stres belirteci olan 8-OHdG seviyesi akromegalili hastalarda önemli derecede yüksek bulunmuştur ve bu artış ile artan IGF-1 seviyeleri arasında pozitif yönde ilişki olduğu gösterilmiştir (85). Çalışmamızda ise akromegalili hastalarda plazma 8-OHdG seviyesi kontrollerden önemli derecede yüksek bulunurken, plazma 8-OHdG seviyelerindeki artış ile IGF-1

seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamadı. Akromegalili hastalarda 8-OHdG artışı ile IGF-1 seviyeleri arasında ilişki bulunamamasının sebebi, Nishizawa ve ark. (85)'nin çalışmasındaki hasta sayısının bizim çalışmamızdaki hasta sayısından oldukça düşük olması ve 8-OHdG düzeyini ölçmek için kullandıkları kitin de bizim çalıştığımız kitten farklı olmasıyla açıklanabilir. Ancak, akromegalili hastalarda bulduğumuz 8-OHdG düzeyindeki artış, bu hastalarda kromozomal hasarın yanı sıra DNA baz düzeyinde de önemli bir hasarın olduğunu göstermektedir.

Akromegalili hastalarda serum IGF-1 düzeyi ile MN frekansı arasında pozitif korelasyon bulundu. Bu hastalarda artan serum IGF-1 düzeyi DNA replikasyonu hatalarının sayısını artırabilir ve hücre çoğalmasını uyarması nedeniyle anöploidiye neden olabilir. Dolaşımdaki serum IGF-1'in yüksek seviyelerinden kaynaklanan hücre çoğalmasının stimülasyonu, akromegalili hastalarda MN, NPB ve NBUD frekanslarının artışının sebebi olarak kabul edilebilir. Akromegalili hastalarda MN, NPB ve NBUD frekansları gibi DNA hasarı parametrelerinin yüksek bulunması, bu hastalarda gelişebilecek kanser riski ile ilişkili olabilir. Bu da IGF-1 ve kanser arasındaki ilişki için açıklayıcı ve ilişkiyi güçlendirici bir faktör olabilir.

Çalışmamızda bu hastaların uyarılmış lenfositlerinde apoptotik ve nekrotik hücre frekansının kontrollere göre oldukça yüksek olduğu bulundu. Bu sonuç, hastalarda sitotoksitenin arttığının bir göstergesi olup, hastalarda artan DNA hasarı ile paralellik göstermektedir. Bilindiği gibi hücrede oluşan DNA hasarı onarılmadığı zaman hücre programlanmış hücre ölüm mekanizması olan apoptoza girer. Dolayısıyla çalışmamızda artan serum IGF-1 düzeylerine rağmen, apoptoz oranının yüksek bulunması akromegalide genom hasarının arttığını ve artan DNA hasarının apoptozu tetiklediğini göstermektedir. Diğer taraftan, akromegalili hastalarda apoptozdaki bu artış artan IGF-1 seviyeleri ile negatif yönde ilişkilidir. Bu yüzden, apoptozdaki bu artış, artan IGF-1 seviyelerinden bağımsız olabilir.

Akromegalili hastalara ait NDI sonuçları ile çalışmamız, bu hastalarda canlı hücrelerin proliferatif durumunu ölçen literatürdeki ilk çalışmadır. IGF-1 artışına bağlı olarak NDI oranında bir artış olması beklenmesine rağmen, bulgularımıza göre akromegalili hasta ve kontroller arasında NDI değerleri açısından istatistiksel olarak herhangi bir fark bulunamadı. Ayrıca artan serum IGF-1 seviyesi ile NDI değerleri arasında da herhangi bir korelasyon da bulunamadı. Bu durumun, akromegalili hastalarda artan DNA

hasarına bağılı olarak indüklenen apoptoz ile hücre bölünmesinin dengelenmesine bağılı olabileceğini düşünebiliriz.

Akromegalili hastalarda genom instabilitesinde önemli bir artış olduğunu bu artışın hücre ölümünü tetiklediğini ve artan IGF-1 seviyelerine rağmen hücre bölünme oranında değişiklik olmadığını bu çalışmada gösterdik. Hastalarda apoptozun artması karsinogeneze karşı bir savunma mekanizması gibi düşünülebilir. Ancak akromegalili hastalarda oldukça yüksek bulunan genom hasarı, bu hastalarda kanser riskinin artışına katkı sağlayabilir.

Prolaktinomali hastalarda;

İnsan tümörlerinin çeşitli tiplerinde dolaşımdaki PRL seviyesinin tümörojenik gücü tartışmalıdır. 80'li ve 90'lı yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda dolaşımdaki PRL seviyesi ile meme kanseri arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (86). Diğer kanser türleri ile ilgili daha az çalışma bulunmaktadır. Örneğin prostat kanseri, baş ve boyun kanseri ile ilgili çalışmalarda PRL seviyesi ile kanser riski arasında herhangi bir korelasyon bulunamamıştır (87, 88). Bununla birlikte Yurkovetsky ve ark. PRL seviyesinin endometriyum kanseri için güçlü bir biyomarkır (belirteç) olabileceğini ileri sürmüşlerdir (89).

PRL'nin işlevi kadınlarda meme gelişimini ve emzirme dönemini kontrol etmektir. Bununla birlikte bir sitokin olarak hareket eder ve immün ve enflamatuvar tepkilerde de önemli rol oynar (90, 91). Buna ek olarak PRL hem hormon sirkülasyonunda hem de bir parakrin/otokrin faktör olarak, yeni kan damarlarının oluşumu ve yenilenmesini, çeşitli seviyelerde ya uyarır yada baskılar (92, 93). Yeni kan damarlarının oluşumu olan anjiyogenez, karsinogenez ve sınırsız tümör büyümesi için önemli bir süreçtir. Bu nedenle serum PRL düzeylerindeki artış endometrial ve diğer kanserlerin büyüme ve ilerlemesinde önemli rol oynayabilir. Yurkovetsky ve ark. aynı zamanda yumurtalık, pankreas ve akciğer kanserlerinde de yüksek PRL seviyelerini gözlediklerini belirtmişlerdir (89).

Çalışmamızda da prolaktinomali hastalar kontrollerle karşılaştırıldığında DNA hasar parametrelerinin (MN, NPB ve NBUD frekansları) önemli derecede arttığı bulunmuştur. Ayrıca prolaktinomali hastalarda plazma 8-OHdG seviyelerinin kontrollerden önemli derecede yüksek olduğu fakat yüksek PRL seviyesi ile ilişkili olmadığı bulundu.

Bu bulgular, prolaktinomali hastalarda genom instabilitesi ve DNA hasarının arttığını göstermektedir. Aynı zamanda çalışmamızda prolaktinomali hastalarda artan PRL seviyesi ve hipofiz adenom büyüklüğü ile MN frekansı arasında pozitif korelasyon bulundu. Sonuçlarımıza göre, prolaktinomali hastalarda MN, NPB ve NBUD frekansları gibi DNA hasar parametrelerinin yüksek bulunması ve artan PRL seviyesinin anjiyogenezi stimüle etmesi, bu hastalarda karsinogenez riskinin artabileceğine işaret edebilir.

Literatürde prolaktinomali hastalarda sitotoksiteyi gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanamadı. Bu hastalarda apoptotik ve nekrotik hücre frekansının kontrollerden önemli derecede yüksek olduğu bulundu. Prolaktinomali hastaların lenfositlerinde apoptotik ve nekrotik hücre frekansının yüksek bulunması, bu hastalarda sitotoksitenin arttığının bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Ayrıca, hastalardaki sitotoksitenin artış sebebi artan DNA hasarı olabilir.

Prolaktinomali hastalara ait NDI sonuçları ile çalışmamız, bu hastalarda canlı hücrelerin proliferatif durumunu ölçen ilk çalışma olmuştur. Fakat prolaktinomali hasta ve kontroller arasında NDI değerleri açısından istatistiksel olarak herhangi bir fark bulunamadı. NDI değerlerinde fark bulunmamasının sebebi, prolaktinomali hastalarda DNA hasarının artmasıyla indüklenen ve dengeyi sağlayan apoptozun bir sonucu olabilir.

Non-fonksiyone adenomlu hastalarda;

Non-fonksiyone adenomların büyük çoğunluğu (>%80) gonadotrop adenomlardır. Ancak LH ve FSH' in yüksek düzeyleriyle nadiren ilişkilidir. Non-fonksiyone hipofiz adenomlarında ortaya çıkan temel klinik sorunlar optik kiazmaya baskı veya kitle etkisine bağlı olarak hipofizden hormon salgılayan hücrelerin etkilenmesinden kaynaklanan hormonal yetmezliklerdir (46).

Non-fonksiyone adenomlarda spesifik bir hormonun aşırı salgılanması görülmediğinden, bu hastalara ait CBMN cyt yöntemi parametrelerinde bulunan artışları herhangi bir hormon ile ilişkilendirmek zordur. Diğer taraftan, non-fonksiyone adenomlara ilişkin olarak kanser gelişiminde önemli rol oynayan epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve folik asit reseptörü (FR) ile ilgili çalışmalar bulmak mümkündür (94-98).

Epidermal büyüme faktörü (EGF)'nin onkogenik etkisi uzun süredir bilinmektedir. EGFR de hem tümör süpresör genlerin ekspresyonunu (ifadelenmesini) downregüle ederek hem de mitojenlerin aktivasyonunu artırarak bir çok kanser tipinin gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca, EGFR, hipofiz tümörü oluşumu ve ilerlemesinde de rol oynayabilir (96). EGFR'nin, non-fonksiyone adenomların % 80'inde aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir (97).

Çalışmamızda non-fonksiyone adenomlu hastalarda DNA hasar parametrelerinde (MN, NPB ve NBUD frekansları) bulunan artışın, bu hastalarda aşırı eksprese edilen EGFR'nin bir sonucu olabileceği düşünülebilir. Bu yüzden bu hastaların EGFR'nin aşırı ekspresyonundan kaynaklanabilecek olası kanser riskine karşı takip edilmesi önerilebilir.

Ayrıca karsinogenezde önemli derecede rol aldığı ileri sürülen FR'nin de fonksiyonel adenomlarda ifade olmazken, non-fonksiyone adenomlarda önemli derecede ifade edildiği gösterilmiştir (94, 95, 98). Bizim çalışmamızda da hastalarda folik asit ve FR düzeylerine bakılmamasına rağmen, bu hastalara ait DNA hasar parametrelerinde (MN, NPB ve NBUD frekansları) bulunan artışların, FR reseptörlerinin artış sürecinin bir sonucu olabileceği de düşünülebilir. Bu hastalarda hipofiz adenom tanısının erken teşhisi ve ileride gelişebilecek olası kanser riskine karşı, FR reseptörü ve DNA hasarı parametreleri arasında ilişki kurabilecek daha ileri çalışmalara da ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda non-fonksiyone adenomlu hastalarda 8-OHdG düzeyi kontrollere göre önemli derecede düşük bulunmuştur. DNA'da oluşan baz hasarları baz eksizyon tamir mekanizmasıyla tamir edilmektedir. Bu tamir mekanizması sırasında oluşan hatalar DNA zincir kırıklarında artışa neden olur. Dolayısıyla, bu hastalarda oksidatif DNA hasarı oluşmakta ve bazlarda oluşan bu hasarların onarılıyor olabileceğini, ancak onarım sırasında oluşan hataların da MN, NPB ve NBUD frekanslarında artışa katkı sağlıyor olabileceğini düşünmekteyiz. Yapılan literatür taramalarına göre daha önce bu hastalarda plazma 8-OHdG seviyesini araştıran bir çalışmaya rastlanılmamış olup, bu sonuçların ileri çalışmalarla desteklenmesine ihtiyaç vardır.

Non-fonksiyone adenomlu hastalarda DNA hasarı sonuçlarına uygun olarak, apoptotik ve nekrotik hücre frekansı kontrollerden önemli derecede yüksek bulundu. Bu hastalarda sitotoksitenin artmasına rağmen, bu duruma ters olarak NDI oranında kontrollere göre artış bulundu. Artan genom instabilitesine bağlı olarak hücre ölümünde

artış beklenen bir durum olabilirken, NDI oranındaki artış ile non-fonksiyone adenomlarda görülen bu DNA hasarlarının tamir edildiğini ve hücrenin ölmeyip bölünmeye, çoğalmaya devam ettiğini düşünebiliriz.

Çeşitli hipofiz adenomları arasında en fazla DNA hasarının non-fonksiyone adenomlarda görülmesi, diğer adenomlardan farklı olarak NDI değerlerinde artışın olması ve oksidatif DNA hasarının azalması gibi farkların ortaya çıkması, non-fonksiyone adenomların çok geç teşhis ediliyor olması ve bu hastaların hipofiz adenom büyüklüğünün diğer adenomlardan oldukça büyük olması ile açıklanabilir. Ayrıca, non-fonksiyone adenomlarda klinik olarak önemli bir hormonun aşırı salgılanması görülmediğinden, bu sonuçlar doğrudan hastalık ile yani adenomu büyüten stimüle edici bir growth faktörle ilişkili olabilir. Bu bulgular bize non-fonksiyone adenomların farklı bir bakış açısıyla, özellikle DNA hasarı, sitostazi ve diğer durumlar açısından değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, hipofiz adenomu gelişiminin multifaktöriyel olduğu kabul edilmektedir. Bu süreçte, başlangıçta tek bir hücrede somatik nokta mutasyonun görüldüğü, ikincil mutasyonlarla olayın ilerlediği, çevresel faktörler, büyüme faktörleri, hormonlar ve reseptörlerdeki değişikliklerin tümörlerin biyolojik davranışına etki ettiği düşünülmektedir. Ancak henüz tümör gelişimindeki tüm basamaklar aydınlatılamamıştır (81).

Genel popülasyonda MN sıklığının artan kanser riski için bir ön belirteç olduğu kabul edilmektedir. Diğer taraftan, DNA hasarı parametrelerinden olan MN, NPB ve NBUD'u içeren nükleer anomalilerin oluşumu da karsinogenezin erken dönemlerinde görülebilen olaylardır (62, 83). Bu nedenle hipofiz adenomlarda MN, NPB ve NBUD gibi artan DNA hasarı parametreleri, bu hastalarda özellikle akromegalilerde gelişebilecek olası kanser riski ile ilişkili olabilir. Ancak hipofiz adenomunun gelişimi gibi karsinogenez de çok basamaklı ve multifaktöriyel bir süreçtir. Bunun için hipofiz adenomlu hastalarda ileride gelişebilecek olası kanser riski açısından özellikle DNA hasar parametreleri ile uzun süreli olarak takip edilmesini önerebiliriz.

6. KAYNAKLAR

1. Erbaş T. Hipofiz Adenomlarının Fizyolojik Değerlendirilmesi, Hipofiz Adenomları. Hacettepe Üniversitesi Yayınları 2008; 138-164
2. Saeger W, Lüdecke DK, Buchfelder M, et al. Pathohistological classification of pituitary tumors: 10 years of experience with the German Pituitary Tumor Registry. Eur J Endocrinol 2007; 156:203-216
3. Asa SL. Practical pituitary pathology: what does the pathologist need to know? Arch Pathol Lab Med 2008; 132:1231-1240
4. Roelfsema F, Biermasz NR, Pereira AM. Clinical factors involved in the recurrence of pituitary adenomas after surgical remission: a structured review and meta-analysis. Pituitary 2012; 15:71-83
5. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutat Res 1985; 147: 29-36
6. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. Mutat Res 1993; 285: 35-44
7. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. Mutat Res 2000; 455: 81-95
8. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nature Protocols 2007; 2: 1084-1104

9. Hamurcu Z, Cakir I, Donmez-Altuntas H, et al. Micronucleus evaluation in mitogen-stimulated lymphocytes of patients with acromegaly. *Metabolism* 2011; 60:1620-1626
10. Donmez-Altuntas H, Bitgen N. Evaluation of the genotoxicity and cytotoxicity in the general population in Turkey by use of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutat Res* 2012; 748: 1-7
11. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 2003; 17:1195-1214
12. Chen HI, Liou SH, Ho SF, et al. Oxidative DNA damage estimated by plasma 8-hydroxyguanosine (8-OHdG): Influence of 4, 4'-methylenebis (2-chloroaniline) exposure and smoking. *J Occup Health* 2007; 49: 389-398
13. Dincer Y, Erzin Y, Himmetoglu S, et al. Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 1636-1641
14. Wu W, Rosenfeld MG. "Development of Pituitary" in *Endocrinology*. Editors: DeGroot LJ, Jameson JL, V. Edition, Philadelphia, Elsevier Saunders 2006;11:686-699
15. Standring S. *Gray's Anatomy, The Anatomical Basis of Clinical Practice*, 39th ed Edinburgh: Elsevier, Churchill-Livingstone. 2005; p:381-383
16. <http://emedicalppt.blogspot.com/2011/07/anterior-pituitary-masses-and.html> (07.15.2013)
17. Guyton AC, Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*, IX. Edition, Ch 75, W.B.Saunders Company, 1996; p:933-935.
18. <https://sites.google.com/site/moreanatomy/home/histology/pituitary-gland> (06.20.2013)
19. Chong BW, Kucharczyk W, Singer W, et al. Pituitary Gland MR: a comparative study of healthy volunteers and patients with microadenomas. *AJNR Am J Neuroradiology*, 1994; 15: 675-679
20. Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, et al. The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer*, 2004; 101:613-619
21. Pamir N. Temel Nöroşirürji: Hipofiz Adenomları. *Türk Nöroşirürji Derneği Yayınları* 2005; 75:750-751
22. Leontiou CA, Gueorguiev M, Van Der Spu et al. The Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor Interacting Protein Gene in Familial and Sporadic Pituitary Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:2390-2400

23. Thapar K, Kovacs K, Scheithauer BW, et al. Classification and pathology of sellar and parasellar tumors. *The Practice of Neurosurgery* Tindall GT, Cooper PR, Barrow BL 1995; p:1021-1065.
24. DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, et al. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs. Lyon, IARC Press 2004; pp:10-47
25. Al-Shraim M, Asa SL. The 2004 World Health Organization classification of pituitary tumours: What is new? *Acta neuropathol* 2006; 111:1-7.
26. Shlomo M, Felipe FC, Andrew RH, et al. WASS Diagnosis & Treatment of Hyperprolactinemia: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:273-288
27. Spada A, Mantovani G, Lania A. Pathogenesis of prolactinomas. *Pituitary* 2005; 8:7-15
28. Colao A, Di Sarno A, Guerra E, et al. Drug insight: Cabergoline and bromocriptine in the treatment of hyperprolactinemia in men and women. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006; 2:200-210
29. Holdaway IM. Epidemiology of acromegaly. *Pituitary* 1999; 2: 29-41
30. Beckers A. Higher prevalence of clinically relevant pituitary adenomas confirmed. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2010; 72: 290-291
31. Lugo G, Pena L, Cordido F. Clinical Manifestations and Diagnosis of Acromegaly. *Int J Endocrinol* 2012;540398. doi:10.1155/2012/540398
32. Holdaway IM, Rajasoorya RC & Gamble GD. Factors influencing mortality in acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 667-674
33. Renehan AG, Brennan BM. Acromegaly, growth hormone and cancer risk. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008; 22: 639-657
34. Chanson P, Salenave S. Acromegaly. *Orphanet J Rare Dis* 2008; 25: 3-17
35. Loeper S, Ezzat S. Acromegaly: re-thinking the cancer risk. *Rev Endocr Metab Disord* 2008; 9: 41-58.
36. Kurimoto M, Fukuda I, Hizuka N, et al. The prevalence of benign and malignant tumors in patients with acromegaly at a single institute. *Endocr J* 2008; 55: 67-71
37. Sekizawa N, Hayakawa E, Tsuchiya K, et al. Acromegaly associated with multiple tumors. *Intern Med* 2009; 48:1273-1278

38. Strasburger CJ. IGF-I and mortality in patients with acromegaly. *J Endocrinol Invest* 2005; 28:78-80
39. Giustina A, Chanson P, Bronstein MD, et al. Acromegaly Consensus Group 2010 A consensus on criteria for cure of acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:3141-3148
40. Wang YY, Higham C, Kearney T, et al. Acromegaly surgery in Manchester revisited--the impact of reducing surgeon numbers and the 2010 consensus guidelines for disease remission. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012; 76:399-406
41. Lombardi G, Galdiero M, Auriemma RS, et al. Acromegaly and the cardiovascular system. *Neuroendocrinology* 2006; 83:211-217
42. Baris D, Gridley G, Ron E, et al. Acromegaly and cancer risk: a cohort study in Sweden and Denmark. *Cancer Causes Control* 2002; 13:395-400
43. Bayram F, Gedik VT, Demir Ö, et al. Epidemiologic survey: reference ranges of serum insulin-like growth factor 1 levels in Caucasian adult population with immunoradiometric assay. *Endocrine* 2011; 40:304-309
44. Tzanela M. Dynamic tests and basal values for defining active acromegaly. *Neuroendocrinology* 2006; 83:200-204
45. Shlomo M. Medical progress: Acromegaly. *N Engl J Med* 2006; 355:2558-2573
46. Chanson P, Brochier S. Non-functioning pituitary adenomas. *Endocrinol Invest* 2005; 28:93-99
47. Minniti G, Jaffrain-Rea ML, Osti M, et al. Radiotherapy for nonfunctioning pituitary adenomas: from conventional to modern stereotactic radiation techniques. *Neurosurg Rev* 2007; 30:167-175
48. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2002; 33:110 – 118
49. Fidan AF. DNA hasar tespitinde tek hücre jel elektroforezi. *Afyon Kocatepe University Journal of Science (Fen Bilimleri Dergisi)*; 2008; 8: 53-64
50. De Boer J, Hoeijmakers J. Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 2000; 21: 453-460
51. Bohr VA. DNA repair fine structure and its relations to genomic instability. *Carcinogenesis* 1995; 16: 2885-2892
52. Gökalp FD. Kültürü Yapılan İnsan Lenfositlerinde Triasulfuron'un Genotoksik Etkileri. Doktora Tezi. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Edirne, 2006; 9-12

53. http://tr.wikipedia.org/wiki/Howell-Jolly_cisimci%C4%9Fi (07.09.2013)
54. Vanparys P, Vermeiren F, Sysmans M, et al. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutat Res* 1990; 244:95-103
55. Demirel S, Zamani A. MN tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi* 2002; 12:123-127
56. Labay K, Ould-Elhkim M, Kles V, et al. Effects of griseofulvin in medium-term liver carcinogenesis assay and peripheral blood micronucleus test in rat. *Teratog Carcinog Mutagen* 2001; 21:441-451
57. Majer BJ, Laky B, Knasmüller S, et al. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutat Res* 2001; 489:147-172
58. Pastor S, Gutierrez S, Creus A, et al. Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis* 2001;16:539-545
59. Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res* 2001; 80:1615-1620
60. Hessel H, Radon K, Pethran A, et al. The genotoxic risk of hospital, pharmacy and medical personnel occupationally exposed to cytostatic drugs evaluation by the micronucleus assay. *Mutat Res* 2001; 497:101-109
61. Bonassi S, Fenech M, Lando C, et al. HUMAN MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen* 2001; 37:31-45
62. Fenech M, Holland N, Zeiger E, et al. The HUMN and HUMN_{XL} international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells-past, present and future. *Mutagenesis* 2011; 26:239-245
63. Thomas P, Holland N, Bolognesi C, et al. Buccal micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2009; 4:825-837
64. M. Fenech, Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death, *Mutat. Res.* 600 2006:58-66

65. Wu J, Lyons GH, Graham RD, et al. The effect of selenium, as selenomethionine, on genome stability and cytotoxicity in human lymphocytes measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutat Res* 2009; 24:225-232
66. Fenech M. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Phys* 2010; 98: 234-243
67. Umegaki K, Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay in WILZ-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis* 2000; 15:261-269
68. Tawn EJ, Whitehouse CA. Frequencies of chromosome aberrations in a control population determined by G banding. *Mutat Res.* 2001; 490:171-177
69. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, et al. HUMN Project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 2003; 534:65-75
70. Eastmond DA, Tucker JD. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen* 1989; 13:34-43
71. Serafini M, Baynes JW, Del Rio D. Role of oxidative stress in development of Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Report* 2004; 9:145-152
72. Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Alcohol Research & Health* 2003; 27:277-284
73. Opara EC. Oxidative Stress. *Disease-a-Month* 2006; 52:183-198
74. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39:44-84
75. Luan Y, Suzuki T, Palanisamy R, et al. Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells. *Mutat Res* 2007; 619:113-123
76. <http://www.biopcr.com/Shop/UploadPhotos/201012/2010122216193893.png> (06.19.2013)
77. Yokuş B, Çakır DÜ. İn vivo Oksidatif DNA Hasarı Biyomarkırı; 8-Hydroxy- 2'-deoxyguanosine. *T Klin J Med Sci* 2002; 22:535-543
78. Cooke MS, Olinski R, Loft S. Measurement and Meaning of Oxidatively Modified DNA Lesions in Urine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17:3-14

79. Donmez-Altuntas H, Sut Z, Ferahbas A, et al. Increased micronucleus frequency in phytohemagglutinin-stimulated blood cell of patients with vitiligo. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2008; 22:162-170
80. Osamura RY, Kajiya H, Takei M, et al. Pathology of the human pituitary adenomas. *Histochem Cell Biol* 2008; 130:495-507
81. Gazioğlu N. Hipofiz adenomlarının moleküler genetik özellikleri. *Türk Nöroşirürji Dergisi* 2006; 16:18-19
82. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular biology of the cell*. Fifth edition, 2007; 4:1313-1326
83. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 2007; 28:625-631
84. Kirsch-Volders M, Plas G, Elhajouji A, et al. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Arch Toxicol* 2011; 85: 873-899
85. Nishizawa H, Handayaningsih AE, Iguchi G, et al. Enhanced oxidative stress in GH-transgenic rat and acromegaly in humans. *Growth Horm IGF Res* 2012; 22: 64-68
86. Tworoger SS, Hankinson SE. Prolactin and breast cancer risk. *Cancer Lett* 2006; 243:160-169
87. Stattin P, Rinaldi S, Stenman UH, et al. Plasma prolactin and prostate cancer risk: A prospective study. *Int J Cancer* 2001; 92:463-465
88. Meyer F, Samson E, Douville P, et al. Serum prognostic markers in head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16:1008-1015
89. Yurkovetsky Z, Ta'asan S, Skates S, et al. Development of multimarker panel for early detection of endometrial cancer. High diagnostic power of prolactin. *Gynecol Oncol* 2007; 107: 58-65
90. Yu-Lee LY. Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57:435-455
91. Brand JM, Frohn C, Cziupka K, et al. Prolactin triggers proinflammatory immune responses in peripheral immune cells. *Eur Cytokine Netw* 2004;15:99-104
92. Clapp C, Lopez-Gomez FJ, Nava G, et al. Expression of prolactin mRNA and of prolactinlike proteins in endothelial cells: evidence for autocrine effects. *J Endocrinol* 1998; 158:137-144

93. Corbacho AM, Martinez De La Escalera G, Clapp C. Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J Endocrinol* 2002;173:219-238
94. Evans CO, Young AN, Brown MR, et al. Novel patterns of gene expression in pituitary adenomas identified by complementary deoxyribonucleic acid microarrays and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:3097-3107
95. Evans CO, Reddy P, Brat DJ, et al. Differential expression of folate receptor in pituitary adenomas. *Cancer Res.* 2003; 63:4218-4224
96. Theodoropoulou M, Arzberger T, Gruebler Y, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in neoplastic pituitary cells: evidence for a role in corticotropinoma cells. *Journal of Endocrinology* 2004; 183:385-394
97. Carlos SM, Chheng-Orn E, Xianquan Z, et al. Novel Molecular Signaling and Classification of Human Clinically Nonfunctional Pituitary Adenomas Identified by Gene Expression Profiling and Proteomic Analyses. *Cancer Res* 2005; 65:10214-10222
98. F. Leung, A. Dimitromanolakis, H. Kobayashi, E.P. Diamandis, V. Kulasingam. Folate-receptor 1 (FOLR1) protein is elevated in the serum of ovarian cancer patients. *Clin Biochem* 2013; pii: S0009-9120: 00103-3

E.Ü. TIP FAKÜLTESİ ETİK BAŞVURUSU DEĞERLENDİRME FORMU

ETİK KURULUN ADI	: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Değerlendirme Komisyonu
AÇIK ADRES	: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Melikgazi/KAYSERİ
TELEFON	: 0 352 437 49 10 - 11
FAKS	: 0 352 437 52 85
E-POSTA	: byancar@erciyes.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Hipofiz Adenomlu Hastalarda Oksidatif ve Kromozomal DNA hasarının Sitom yöntemi ve 8-OHdG ölçümü ile araştırılması							
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜNÜN KODU								
EUDRACT NUMARASI								
SORUMLU ARAŞTIRMACININ ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr. Hamiyet Dönmez Altuntaş							
SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji							
KOORDİNATÖRÜN ÜNVANI/ADI/SOYADI								
KOORDİNATÖRÜN UZMANLIK ALANI								
ARAŞTIRMA MERKEZİ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı							
ARAŞTIRMA MERKEZİNİN AÇIK ADRESİ	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı							
BAŞVURULAN ETİK KURULUN ADI	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Değerlendirme Komisyonu							
DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ								
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ								
UZMANLIK TEZİ/ AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ	☒	AKADEMİK AMAÇLI					
ARAŞTIRMA FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐						
	FAZ 2	☐						
	FAZ 3	☐						
	FAZ 4	☐						
	BE/BY	☐						
	DİĞER	☐	Diğer ise belirtiniz					
	İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA	☐	Belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEKMERKEZ	☒	ÇOKMERKEZ	☐	ULUSAL	☐	ULUSLARARASI	☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER

BELGE ADI	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER

BELGE ADI	Açıklama
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	
SIGORTA	
HASTA KARTI/GÜNLÜKLERİ	
İLAN	
YILLIK BİLDİRİM	
SONUÇ RAPORU	
GÜVENLİK BİLDİRİMLERİ	
DİĞER	


Bahri YANCAR
Fakülte Şefi

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2010/97	Karar Tarihi : 16.09.2010
	Fakültemiz Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Hamiyet Dönmez Altuntaş'un sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve kurulumuz kararının başvuru sahibine ve dekanlık makamına arzına toplantıya katılan etik değerlendirme komisyonu üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI

ETİK DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI : Prof. Dr. Kader KÖSE

ETİK DEĞERLENDİRME KOMİSYONU ÜYELERİ

Ünvanı / Adı Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Kader KÖSE	Biyokimya	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒ X	E ☐ H ☒ X	E ☒ X ☐ H ☐	
Prof. Dr. Halit MADENOĞLU	Anest. ve Rean.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ X ☐ H ☐	
Prof. Dr. Olgun KONTAŞ	Patoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ X ☐ H ☐	
Prof.Dr. Duran ARSLAN	Çocuk Sağ. ve Hast.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ X ☐ H ☐	
Doç. Dr. İrfan ÖZYAZGAN	Plastik ve Rek. Cer.	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ X ☐ H ☐	
Doç. Dr. H.Basri ULUSOY	Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ X ☐ H ☐	
Doç. Dr. Mehmet Güngör KAYA	Kardiyoloji	E.Ü. Tıp Fak.	E ☒ X ☐ K ☐	E ☐ H ☒ X	E ☒ X ☐ H ☐	
Öğr. Gör. Dr. Ferhan ELMALI	Tıp Bilişimi ve Biyostatistik	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒ X	E ☐ H ☒ X	E ☒ X ☐ H ☐	
Av. Zübeyde ÇELEBİ	Avukat	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒ X	E ☐ H ☒ X	E ☒ X ☐ H ☐	
Ecz. Nuran YOZGAT	Eczacı	E.Ü. Tıp Fak.	E ☐ K ☒ X	E ☐ H ☒ X	E ☐ H ☒ X	
Sevtap KOÇER	Sivil Toplum Tems.		E ☐ K ☒ X	E ☐ H ☒ X	E ☐ H ☒ X	

ASLI GİBİDİR

Bahri YANCAR
Fakülte Şefi

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Nazmiye BİTGEN
Uyruğu: Türkiye (TC)
Doğum Tarihi ve Yeri: 23.01.1980, Kayseri
Medeni Durumu: Evli
e-mail: nazmiyebitgen@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	2013
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	2007
Tezsiz Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Öğretmenliği	2004
Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fak. Kimya Bölümü	2002

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2007-Halen	Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biy. Anabilim Dalı	Araştırma Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler (SCI ve SCI-E):

- Hatice Karaman, Ahmet Karaman, Hamiyet Dönmez, **Nazmiye Bitgen**, Zuhul Hamurcu, Arzu Oğuz, Çiğdem Karakükcü. Investigation of Genome Instability in Patients with Non-Alcoholic Steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology* doi:10.3748/wjg.w19.i32.5295. (2013).
- Hamiyet Donmez-Altuntas, Perihan Gokalp-Yildiz, **Nazmiye Bitgen** & Zuhul Hamurcu. Evaluation of genotoxicity, cytotoxicity and cytostasis in human lymphocytes exposed to

patulin by using the cytokinesis-block micronucleus cytome (CBMN cyt) assay. *Mycotoxin Res.* 29:63-70 (2013). doi: 10.1007/s12550-012-0153-8.

3. Donmez-Altuntas H, **Bitgen N**. Evaluation of the genotoxicity and cytotoxicity in the general population in Turkey by use of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutat Res.* 748: 1– 7 (2012).
4. A. Karaman, Z. Hamurcu, H. Donmez, **N. Bitken**, H. Karaman, M. Baskol, S. Gursay, K. Guven, O. Ozbakir and M. Yucesoy. Investigation of Genome Instability in Exfoliated Colonic Epithelial Cells and in Mitogen-Stimulated Lymphocytes of Patients with Ulcerative Colitis. *Digestion* 85(3):228-235 PMID 22472630 (2012).
5. Z. Hamurcu, I. Cakir, H. Donmez-Altuntas, **N. Bitgen**, Z. Karaca, G. Elbuen, F.Bayram. Micronucleus evaluation in mitogen-stimulated lymphocytes of patients with acromegaly. *Metabolism* 60 (11):1620-1626. (2011).

B. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler (EBSCO):

1. **Nazmiye Bitgen**, Hamiyet Donmez-Altuntaş, Zuhall Hamurcu, Halil Demirtaş, Figen Ozturk. Comparative Studies of the AgNORS Motifs in Phytohemagglutinin-Stimulated Human T-Lymphocytes with T-Lymphocyte Subgroups. *Erciyes Med J (Erciyes Tıp Dergisi)*; 34(3): 132-136 • DOI: 10.5152/etd.2012.38 (2012).

C. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler :

1. Fahri Bayram, **Nazmiye Bitgen**, Hamiyet Donmez-Altuntas, İlkay Cakir, Zuhall Hamurcu, Ali Kurtsoy, Fatma Sahin, Yasin Simsek, Halit Diri, Züleyha Cihan Karaca, Gulden Baskol. Increased genom instability and oxidative DNA damage in active Acromegalic patients. *The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo, Endo 2013*, June 15-18 San Francisco (2013).
2. **N. Bitgen**, H. Donmez-Altuntas, Z. Hamurcu, H. Demirtas, F. Ozturk. A relation between the AgNORs motifs and T lymphocyte subgroups in phytohemagglutinin-stimulated human T lymphocytes. Current Opinion in Biotechnology, Volume22, Supplement1, Page, S115. *European Biotechnology Congress 2011*, September 28-October 1 İstanbul, TURKEY, (K29) (2011)
3. Halit Canatan, Seçil Yılmaz, **Nazmiye Bitgen**, Hilal Akalın, Servet Özcan, Mustafa Çetin, Yusuf Özkul, Karim Nayernia. Investigation of the role of PIWIL2 in transition of human prostate epithelial cells in a LNCaP cell line. *1st International Conference/Workshop on Stem Cell Research and Applications*. October 7-9, 2011, Kayseri, Turkey (2011)
4. İlkay Cakir, Zuhall Hamurcu, Hamiyet Donmez-Altuntas, **Nazmiye Bitgen**, Zuleyha

Karaca, Gulsah Elbuken, Fahri Bayram. Micronucleus evaluation in mitogen-stimulated lymphocytes of patients with acromegaly. *European Congress of Endocrinology 2010*. Prague, Czech Republic. European Society of Endocrinology. 24 April 2010 - 28 April 2010 (2010)

D. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler :

1. Fahri Bayram, Fatma Şahin, Hamiyet Dönmez-Altuntaş, **Nazmiye Bitgen**, Kürşat Gündoğan, Sülbiye Arıbaş, Meral Mert, Zuhale Hamurcu, Halit Diri. Obez Hastalarda Artan DNA Hasarının Malignite Riski Açısından Önemi. *35. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Kongresi* 15-19 Mayıs 2013, Antalya. P 166 (2013)
2. F. Bayram, **N. Bitgen**, H. Donmez-Altuntas, G. Başkol, Z. Hamurcu, I. Cakır, B. Tucer, Y. Şimşek, A. Candan-Durak, F. Sahin, A. Kurtsoy. Akromegalili hastalarda oksidatif DNA hasarı ve sitotoksitenin değerlendirilmesi. *34. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Kongresi* 11-15 Nisan 2012, Antalya. (Sözlü sunum) S-14 (2012)
3. **N. Bitgen**, F. Bayram, İ. Cakır, Z. Hamurcu, F. Sahin, A. Kurtsoy, H. Dönmez-Altuntaş. Akromegalili Hastaların Lenfositlerinde Artan Apoptotik ve Nekrotik Hücre Değerleri. *XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi* 27-30 Ekim 2011, Antalya. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri dergisi Supp.S102-103 (2011).
4. İ. Çakır, **N. Bitgen**, H. Dönmez-Altuntaş, Z. Hamurcu, M. Mert, A. Kurtsoy, F. Şahin, Y. Şimşek, Bülent Tucer, F. Bayram. Prolaktinomali hastaların mitojenle uyarılmış lenfositlerinde DNA hasarının kanser riski açısından araştırılması. *33. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Kongresi* 12-16 Ekim 2011, Antalya. PS-184 (2011).
5. **N. Bitgen**, F. Bayram, İ. Çakır, Z. Hamurcu, M. Mert, F. Şahin, Y. Şimşek, G. Elbükem, A. Kurtsoy, H. Dönmez-Altuntaş. Akromegali hastalarında kanser riski açısından genom instabilitesinin araştırılması. *33. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Kongresi* 12-16 Ekim 2011, Antalya. (Sözlü sunum) SS-03 (2011)
6. H. Dönmez-Altuntaş, **N. Bitgen**. Sağlıklı Kişilerdeki DNA Hasarının Sigara Kullanma, Yaş ve Cinsiyete Göre Araştırılması. *XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi* 27-30 Ekim 2011, Antalya. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi Supp.S 142 (2011).