

**T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ**

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ

PROJE NO: 9202029

**PROJE TÜRÜ: Yüksek Lisans Tez Projesi / Sağlık Bilimleri
Enstitüsü**

**PROJE ADI: Sigara İçen ve İçmeyen Erkek Bireylerin Ağız
İçi Mukoza Epitel Hücrelerinin Mikronükleus (MN) ve
Nükleolus Organizer Bölgeleri (NOR'lar) Üzerinde İşık
Mikroskopik Çalışmalar**

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ :

Prof. Dr. İlhami ÇELİK, Veteriner

KONYA

ÖZET

Proje No: 9202029

SİGARA İÇEN VE İÇMEYEN ERKEK BİREYLERİN AĞIZ İÇİ MUKOZA EPİTEL HÜCRELERİNİN MİKRONÜKLEUS (MN) VE NÜKLEOLUS ORGANİZER BÖLGELERİ (NOR'LAR) ÜZERİNDE İŞIK MİKROSKOBİK ÇALIŞMALAR

Proje Yürüttücsü :Prof.Dr. İlhami ÇELİK

Selçuk Üniversitesi

Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı (Vet.)

Bu çalışmada, günde bir paket sigara içen (20 adet/gün) sağlıklı gönüllü erkek bireylerden, abeslangla alınan dil ve yanak mukoza kazıntıları materyal olarak kullanıldı. Her birinde 30'ar kişi bulunan 35–45, 46–55, 56 ve üzeri olmak üzere üç yaş grubu oluşturuldu.

Havada, oda sıcaklığında (20°C) kurutulan frotilerden AgNOR boyamasında kullanılacak olanlar metanol-asetik asit karışımında (3:1), MN boyaması uygulanacaklar ise glutaraldehid-aseton tespit sıvısında 5 dakika tespit edildi. MN boyaması, May Grünwald-Giemsa boyasının modifikasyonuyla geliştirilen Wolf ve Luepke'nin (1997) uyguladığı metoda göre gerçekleştirildi. AgNOR'lar Aydın (2004) tarafından bildirilen gümüşleme boyama yöntemiyle boyandı.

Modifiye May Grünwald-Giemsayla boyanan preparatlarda toplam 1000 adet epitel hücresindeki MN sayıları belirlendi ve sonuçlar, 1000 hücre başına düşen MN olarak ifade edildi. AgNOR boyanan preparatlardaysa, dijital görüntü analiz programıyla her hücrenin çekirdek alanı, AgNOR sayısı ve AgNOR alanı belirlendi. Elde edilen verilerden, AgNOR alanının çekirdek alanı içindeki yüzdesi (nispi, % AgNOR alanı) hesaplandı.

Bu çalışma sonuçları, sigara içiminin, dil ve yanak mukoza epitel hücrelerinde genotoksik etkiye sahip olduğu hakkında daha önce ileri sürülen bulguları desteklemektedir. Sigara içenlerde, hem dil ve hem de yanak mukoza epitel hücrelerinin MN frekansında önemli artış gözlenmektedir. Nükleus büyülüklüğü ve AgNOR parametrelerinde de sigara içenlerde bazı değişiklikler meydana gelmekle birlikte, dil ve yanak mukoza epitel hücreleri arasında farklar vardır.

Anahtar sözcükler: Mikronükleus; AgNOR; Sigara; Ağzı mukozası.

ABSTRACT

Project number: 9202029

LIGHT MICROSCOPIC INVESTIGATIONS ON THE MICRONUCLEUS (MN) AND NUCLEOLUS ORGANISER REGIONS (NORs) OF ORAL MUCOSAL EPITHELIAL CELLS OF CIGARETTE SMOKERS AND NON-SMOKER MALES

Prof.Dr. İlhami ÇELİK

Selçuk University

Veterinary Faculty

Department of Histology and Embryology

In this study, lingual and buccal mucosal scrapings of healthy non smoking and smoker (20 cigarettes/day) male volunteers from three age groups (35–45 years, 46–55 years, 56 and elder), each having 30 people, were used as materials.

From each scrapings, smears were prepared, air dried at room temperature (20°C) and fixed in methanol-acetic acid (3:1, v/v) for AgNOR staining, some of them fixed in glutaraldehyde-acetone for MN staining, for 5 minutes. MNs were stained by a modified May Grünwald-Giemsa stain (Wolf and Luepke 1997). AgNORs were stained by means of a silver impregnation method reported by Aydin (2004).

In modified May Grünwald-Giemsa stained specimens, MNs were carefully counted under light microscope in 1000 epithelial cells for each sample, and the results were expressed as MN frequency, MN number/1000 cells. Digital images of AgNOR stained specimens were analysed by an image analysing software, and nuclear area, AgNOR numbers and AgNOR area of 200 cell for each sample were determined. Relative AgNOR area (% area of total AgNOR area in each nuclear area) were calculated from the data.

The results were in accordance with previous findings showing that smoking had genotoxic effects on the epithelial cells of both lingual and buccal mucosae. Smokers had increased MN frequencies in lingual and buccal epithelial cells. Nucleus size and AgNOR parameters were also affected by cigarette smoking, although there were some differences between the lingual and buccal epithelial cells.

Key words: Micronucleus; AgNOR; Cigarette; Oral mucosa.

ÖNSÖZ

Günlük hayatta sağlığını tehdit eden pek çok fiziksel ve kimyasal zararlı ajanlara maruz kalmaktayız. Bunların pek çoğu kümülatif etkilidir. Bilim ve teknolojide sağlanan gelişmeler sayesinde bu etkenlerin muhtemel zararlı etkilerinin önceden belirlenebilmesi amacıyla bazı testler geliştirilmiştir. Bunların önemli bir kısmında gelişmiş ekipman ve uzman ekibe ihtiyaç duyulurken; daha pratik, ucuz ve güvenilir sonuçlar veren bazı sitolojik testler de geliştirilmiştir. Günümüzde, mikronükleus (MN) testi ve hücre çekirdekçigindeki gümüşle boyanan proteinlerin oluşturduğu bölgelerin (AgNOR'lar) bazı parametreleri de maruz kalınan toksik ajanların genotoksik etkilerinin belirlenmesinde önemli bir yer tutmaktadır.

Sunulan bu çalışmada, sigara içen erkeklerde yassı hücreli karsinomun en fazla görüldüğü dil mukoza epители ile yanak mukoza epitel hücrelerinin MN frekansı ile bazı AgNOR parametrelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Hücre Çekirdeğinin Fonksiyonel Elektron Mikroskopik Yapısı.....	2
1.2. Nükleolustaki Gümüşle Boyanan Proteinler (AgNOR-proteinler).....	4
1.2.1. Nükleolar Proteinler, Bulundukları Bölgeler, Görevleri ve Moleküler Ağırlıkları.....	5
1.3. Nükleolus ve AgNOR'ların Sayı, Şekil ve Çekirdekteki lokalizasyonlarıyla Bunlar Üzerinde Etkili Faktörler.....	6
1.4. Mikronükleolus (MN) Oluşumu ve Bu Oluşumu Etkileyen Faktörler.....	9
1.5. MN'ların Morfolojik Özellikleri.....	12
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	13
3. MATERYAL ve METOT.....	19
3.2. MN Boyaması	19
3.3. MN Sayımı.....	20
3.4. AgNOR Boyaması ve AgNOR Parametrelerinin Belirlenmesi	21
3.5. Boyanan Frotillerin İncelenmesi ve Dijital Görüntülerin Analizi.....	21
3.6. İstatistiksel Analizler	22
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI.....	23
4.1. MN Sonuçları.....	24
4.2. AgNOR Sonuçları.....	25
5. TARTIŞMA.....	31
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	35
7. KAYNAKLAR.....	36
8. EKLER.....	41
EK. A: Bigilendirilmiş Onay Formu.....	41
EK. B: Gönüllülere Uygulanan Anket Formu.....	43

SİMGE ve KISALTMALAR

DFC	: Diffuse Fibriller Component
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EU	: European Union
FC	: Fibriller Center
GC	: Granüler Componant
ICH	: International Conference On Harmonisation
kDa	: KiloDalton
MN	: Mikronükleus
Nm	: Nanometre
NOR	: Nucleolus Organizer Region
OECD	: Organization For Economic Cooperation and Development
rDNA	: Ribozomal Deoksiribonükleik Asit
SCE	: Sister Chomatide Exchange
SSC	: Squamous Cell Carcinoma
µm	: Mikrometre

1. GİRİŞ

Dünyada yılda yaklaşık 274,000 kişi, önemli bir kısmı sigara ve tütün ürünü kullanmayla bağıntılı olan ağız içi kanserlerine yakalanmaktadır (DeMarini MD. 2004). En fazla sigara içenlerde görülen yassı hücreli karsinom (Squamous cell carcinoma, SCC), 40 yaş üzeri erkeklerde daha sık görülür ve tümörün yerleşimi çoğunlukla alt dudak, dilin kenarları ve ağız tabanıdır. Sigara dumanı, güçlü mitojenik etkileri olan pek çok toksik madde içerdiginden, sigara içimi, SCC için en önemli risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Dünyada en fazla rastlanan 10 kanser tipi arasında olan yassı hücreli *karsinom*, ağızda gelişen malignansilerin %90'ından fazlasından sorumlu olup (Remmerbach ve ark 2003), pek çok genetik bozukluğun birikimiyle (akümülasyonu) ortaya çıkar. Bu nedenle SCC'da tümör hücreleri kromozomal *delesyonlar*, *translokasyonlar* ve diğer yapısal anomalileri de içeren kompleks karyotipler sergiler. Erken teşhis oldukça önemli olup, eksfolyatif sitoloji teşhiste basit ve ucuz olması ve kantitatif değerlendirmeye imkan tanımı nedeniyle tercih edilen bir metottur. Bu nedenle, yüksek *oral* neoplastik lezyon riski olan bireylerin makroskopik lezyonlar gelişmeden de sitolojik yöntemle izlenmesi son derece önemlidir.

Ağız boşluğu tavanı, dilin *ventrolaterali*, yumuşak damak kompleksi, *vestibulum labiale* ve yanak kutan mukozayla kaplıdır. Epitel hücreleri, sağlıklı mukozada döküntü (eksfolyatif) hücreler halinde kendiliğinden atılır. Eksfolyatif *bukkal* hücreler farklılaşmanın son evresindeki hücrelerdir ve nadiren mitoz gösterirler. Mikroskopik incelemeler için *bukkal* epitel hücreleri ağızın farklı bölgelerinden alınabilir. Bu bölgeler kanserin en sık görüldüğü yanak, dilin *dorsal*, *lateral* ve *ventral* yüzleri, yumuşak ve sert damakla orofarenktir. Mukozal kazıntı örneklerinde, alınan hücrelerin hemen tamamı *bukkal* epitel hücresidir. Az sayıda da olsa yassı keratinize hücrelerle *nötrofillere* de rastlanır. Bazı durumlarda derin katman hücreleri ve alyuvarlar görülsse de bu durum agresif biçimde örnek alındığına işaret eder. Epitel hücreleri iri ve buna bağlı olarak yüksek sitoplazma/çekirdek oranına sahip olmaları, yassı ve köşeli görünümleri yanında

çekirdeklerinin merkezi yerleşime sahip olması gibi özellikleriyle kolay tanınırlar (Wu ve ark 2004).

Bazı kromozomlar veya kromozom fragmanları, mitoz bölünmenin anafaz evresinde kromatidlerin ayrılmışındaki hatalara bağlı olarak hücrenin kutuplarına çekilemez ve yeni oluşan çekirdeklerin yapısına katılmaz. Böyle yapılar hücre sitoplazmasında mikronükleuslar (MN) olarak gözlenir. Ağız mukoza epitel hücrelerindeki MN artışı, hücrelerin klastojenik bir etkiye maruz kaldıklarını gösterir.

Hücre çekirdeğini oluşturan çekirdek organize bölgeleri (Nucleolus Organiser Regions, NORs) ise interfazdaki hücre *nükleusunun nükleolus* bölgelerinde lokalize olurlar. Bu yapılar bir ışık mikroskopik gümüşleme boyama yöntemi olan AgNOR tekniğiyle yapılan boyamada, hücre çekirdeğinde lokalize olan siyah nokta/lekeler halinde görülürler. İnsanda 13, 14, 15, 21 ve 22 numaralı akrosentrik kromozomlarda AgNOR'lar bulunur. *Nükleustaki AgNOR* sayısının rRNA *transkripsiyon* seviyesi, hücre proliferasyon hızı ve DNA ploidisiyle bağıntılı olduğu tespit edilmiş ve tümör sınıflamasında yararlanılmıştır.

1.1. Hücre Çekirdeğinin Fonksiyonel Elektron Mikroskopik Yapısı

Çift birim *membrandan* (ünit *membrandan*) oluşan çekirdek zarıyla çevrili olan hücre çekirdeği; kromatin ve çekirdekçik (*nükleolus*) ile bunların arasını dolduran çekirdek sıvısından (karyolenf) oluşur. İnterfazdaki hücre çekirdeklerinde RNA ve bununla ilişkili proteinlerin lokalize oldukları, farklı sayıda *nükleolus* bulunur. *Nükleoluslar*, ribozom alt birimlerinin sentezlendiği çekirdek bölgeleridir ve rRNA genlerini (rDNA) taşıyan kromozomların ilgili bölgeleri tarafından oluşturulurlar (Schwarzacher ve Wachtler 1993). Bu nedenle de DNA'nın, rRNA genlerini taşıyan ve *nükleolusları* oluşturan bölgeleri *nükleolus* organizer bölgeler (*Nucleolar Organizer Regions, NOR*) olarak adlandırılmıştır (Aydın 2004).

Protein senteziyle direk ilişkileri olduğundan, yüksek hızda ribozom üreten hücrelerde *nükleoluslar* iri ve kompleks yapılı oldukları halde, düşük aktiviteli hücrelerde küçük ve basit yapıldırlar (Aydın 2004). Bir *nükleolusta* elektron

mikroskopuya üç temel yapısal bölge ayrıt edilir. Bu bölgeler; *fibriler* merkez (*fibrillar center*, FC), diffüz *fibriler komponent* (*diffuse fibrillar component*, DFC) ve granüler *komponent* (*granular component*, GC)'dır (Jordan 1979).

FC'ler elektron mikroskopta, düşük kontrast veren 4-8 nm kalınlığındaki ince ipliklerden kurulu bir ağdan oluşurlar. Düşük aktiviteli hücrelerde, özellikle de tek çekirdekçikli hücrelerin *nükleoluslarının* merkezinde FC bulunur. FC'ye sahip olan *nükleoluslara* “yüzük şekilli *nükleolus*” adı verilir. Yüksek aktivite gösteren ve “kompakt *nükleolus*” olarak da isimlendirilen iri çekirdekçiklere sahip olan hücrelerde, farklı büyüklükte birkaç FC bulunabilir. *Nükleolusunda* FC bulunmayan hücrelere de rastlanmaktadır (Aydın 2004). FC'ler, uygun şartlarda gümüş tuzlarıyla boyanırlar (Ellinger ve Wachtler 1980), yani argirofilik özellik gösterirler.

Diffüz *fibriler komponent* (*diffuse fibrillar component*, DFC), elektron mikroskobunda yoğun biçimde paketlenmiş ve koyu boyanan ince iplik demetleri halinde görünür ve *nükleolonema* da denen 0,05–0,1 μm 'lik bir ağ oluşturur. Yüzük şekilli çekirdekçiklerde DFC, tek bir FC'yi çevrelerken; kompakt çekirdekçiklerde her FC, aralarında uzanan DFC ağının içersine gömülü durumdadır. FC'ler her zaman düzenli olarak DFC'lerle çevrili olmadıklarıdan, sıkılıkla granüler component (GC) veya kromatinle direk temas halindedirler. Bir başka çekirdekçik tipinde ise çekirdekçığın merkezi bölgesi tamamen DFC'lerden oluşan ağa kaplıdır. FC'ler ara bölgede dağılmış haldedirler. Böyle çekirdekçikler “ağımızı (retiküler)” ya da “*nükleolonemalı*” çekirdekçikler olarak adlandırılır. DFC'ler de FC'ler gibi gümüş tuzlarıyla boyanabilirler ve bu ikisinin ışık mikroskopuya ayrimı oldukça zordur (Ellinger ve Wachtler 1980).

Granüler component (GC), 10–15 nm arasındaki çapa sahip olan granüler yapılardan oluşur. Bunlar yer yer kısa zincirler oluşturabilirler. GC, çekirdekçığın periferinde lokalize olur ve bu yüzden de çoğunlukla DFC'nin dışındadır. DFC ve GC arasında, *fibrilo-granüler komponent* olarak da tanımlanan ve bu iki *komponentin* birbirine karıştığı bir geçiş bölgesi de gözlenir. GC, gümüşleme metodıyla bazen çok zayıf boyanabilir. Öte yandan, GC'de ribonükleoproteinlerin (RNP'lerin) fazla miktarda bulunması nedeniyle, bazik boyalarla kuvvetli biçimde boyanır (Pischinger 1926). Çekirdekçikte yukarıda açıklanan yapılardan başka, kromatin

iplikleri de bulunabilir. Bu kromatin iplikleri DFC ya da FC'lerle bağlantılar oluştururlar (Ellinger ve Wachtler 1980).

Çekirdekçığın, çekirdek iskeleti (“*nukleer* matriks” veya “*nukleus* iskeleti”) ile de bağlantısı vardır. Çekirdekçikteki ipliksel yapılar (DFC ve FC) ve bunların parçaları, DNA transkripsiyonu sonucu oluşan transkriptin işlenmesini sağlayan faktörler için destekleyici rol üstlenirler. Özellikle FC’ler, çekirdek iskeletinin bir parçasıdırular ve *nukleolusun*, nükleer iskelete yapışan temel elementlerini oluşturarak bu fonksiyonu yerine getirirler. Çekirdekçikte elektron mikroskobunda 0,1–1 μ m çapında boş alanlar görülmektedir ki, bunlara çekirdekçik *vakuoller* (*nukleolar vakuoller*) adı verilmiştir. Bununla birlikte, söz konusu *vakuollerin* bölgelerin kendi başlarına bir oluşum olup olmadıkları kesin değildir (Ellinger ve Wachtler 1980).

1.2. Nukleolustaki Gümüşle Boyanan Proteinler (AgNOR-proteinler)

Gümüşleme boyama tekniği uygulanarak hazırlanan ışık mikroskopu preparatlarında, çekirdekçiklerin belli bölgeleri gümüş tuzlarıyla spesifik olarak boyanmaktadır. Bu konudaki ilk bilgiler 1889'da Ruzicka tarafından ortaya konmuştur. Elektron mikroskopik incelemelerde, gümüşle farklı derecelerde pozitif reaksiyon veren bölgelerin FC ve DFC'lerle buralardaki asidik proteinler olduğu gösterilmiştir. Bu asidik proteinlere AgNOR-proteinleri de denmektedir. Gümüş tuzları, gümüş spesifik nükleolar proteinler yanında başka proteinleri de açığa çıkarır. Ancak; gümüşleme boyaması sonuçlarıyla spesifik proteinlerin immünohistokimyasal yöntemlerle saptanan lokalizasyonları her zaman uyumlu değildir. Bunun nedeni, *nukleolusun* fonksiyonları sırasında söz konusu proteinlerin lokalizasyonlarında ortaya çıkan modifikasyonlar olabilir. Gümüş-pozitif nükleolar proteinlerin önemli bir kısmı, NOR'lara yapışık olarak bulunurlar ve mitotik kromozomlardaki AgNOR'ların gümüşle boyanmasından sorumludurlar (Aydın 2004).

Nukleolislarda rDNA'nın transkripsiyonu, işlenmesi, olgunlaştırılarak ribozom alt birimlerinin bir araya getirilmesi ve preribozomal partikülerin sitoplazmaya

transportu, spesifik nükleolar proteinlerin aracılığıyla gerçekleşir. Bu nedenle *nukleolus* proteinlerinin çoğu enzim özelliği gösterir (Tablo 1.2.1)

1.2.1. Nükleolar proteinler, bulundukları bölgeler, görevleri ve moleküler ağırlıkları

Bu konudaki bilgi aşağıdaki tabloda verilmiştir.(çizelge 1.2.1.1)

Çizelge 1.2.1.1. *Nükleolar* proteinler, bulundukları bölgeler, görevleri ve moleküler ağırlıkları (Aydın 2004'ten alınmıştır).

Protein	Kısa adı	Bulunduğu bölge	Görevi	Molekül ağırlığı
RNA Polimeraz I	RP I	FC ve DFC'ler	rRNA sentezinde	-
DNA Topoizomerazlar: Topoizomeraz I, Topoizomeraz II	Topoizome raz I Topoizome raz II	DFC ve FC	DNA sarmallarının dekondensasyonu.	Topoizo meraz II: 180 kDa
Fibrillarin	Fibrillarin	DFC, FC ve GC'ler	rRNA işlenmesi.	-
Nükleolin	C23	DFC, FC ve GC	rRNA işlenmesi ve pre-ribozom yapım hızının ayarlanması, rDNA transkripsiyonu.	-
Upstream binding factor	UBF	DFC ve FC	Transkripsiyonun hızlandırılması.	88-92 kDa
Ki-67	Ki-67	Çekirdek matriksi	Çekirdek matriksi ve perikromozomal kılıfların yapısına girmek.	-
Ribogranülin	Ribogranül in	GC	Preribozomların birleştirilmesindeki rRNA işlenmesi.	52 kDa
Numatrin	B 23	GC, FC ve FC'deki gümüşle boyanan fraksiyonlar	Preribozomal RNP yapımı ve preribozomların sitoplazmaya taşınması.	-
AgNOR proteinler	AgNOR proteinler	FC ve DFC	C23 (nükleolin), B23, AgNOR proteini RP I, rDNA	-

Gümüşleme yöntemiyle, aktif olarak transkripsiyon yapan NOR'lar ve sonuçta da rDNA (Wachtler ve ark 1986) içeren bölgeler boyanır. Bu nedenle AgNOR

sayılarının kısmen hücre ploidisini de gösterebileceği (Trent ve ark 1981) ve aktif olarak çoğalan hücrelerde NOR bölgelerindeki genlerin *ekspresyonlarında* da önemli bir artış olması nedeniyle aşırı çoğalan hücrelerde de AgNOR'ların sayılarının fazla olduğu bilinmektedir (Aydın 2004).

Yukarıdaki bilgilere dayanılarak gümüş-pozitif proteinler veya gümüş-pozitif NOR proteinleri (AgNOR'lar), rDNA transkripsiyonunda ihtiyaç duyulan faktörlerin ve rRNA oluşumunun erken safhalarındaki proteinlerin bazılarını içerdikleri sonucuna varılabilir. Bu nedenle, söz konusu proteinleri kodlayan aktif rRNA genleriyle yakın lokalizasyon gösterirler. Bu proteinlerin aktif olmayan veya aktivitesi düşük olan NOR'lara yakın bulunmaları, rRNA transkripsiyonunda ve ribozomal biyogeneziste hızlı bir şekilde aktif hale geçebilecek durumda depolandıkları şeklinde yorumlanmaktadır (Aydın 2004).

1.3. Nükleolus ve AgNOR'ların Sayı, Şekil ve Çekirdekteki Lokalizasyonlarıyla Bunlar Üzerinde Etkili Faktörler

Her *nükleolus* organizer (NOR) kromozomunun bir adet *nükleolus* şekillendirceği kabul edildiğinde, bir hücre çekirdeğinde o hücredeki NOR kromozomu sayısı kadar *nükleolusun* bulunması doğaldır. Diploid bir insan somatik hücresi çekirdeğinde 13, 14, 15, 21 ve 22 numaralı kromozom çiftlerinin her birinde 2'serden toplam 10 adet NOR kromozomu bulunduğuundan, bu hücrelerde 10 adet *nükleolus* bulunması beklenir (Henderson ve ark 1973, Goodpasture ve ark 1976, Pathak 1979, Schwarzacher ve Wachtler 1993) ise de, bu nadirenböyledir; aksine birçok insan hücresindeki *nükleolus* sayısı bunun altındadır. Bu durumun iki sebebi olabilir; ilki, bir hücrenin sahip olduğu NOR'ların tamamı aynı anda aktif durumda değildir, ikincisi de bir *nükleolusun* şekillenmesinde birden fazla NOR iş görmektedir. Her iki durum da mümkündür.

Nükleoluslar, çoğu bitki ve hayvan hücrende genellikle çekirdek zarına yakın yerleşimli ya da onunla temas halindedir. Hızlı bölünen ve fazla miktarda ribozom ihtiyacı olan hücrelerin *nükleoluslarının* lokalizasyonu bu şekildedir. *Nükleolusların* bu tarz (periferal) yerleşimi, çekirdekteki NOR kromosomlarının periferal yerleşimine

ve preribozom partiküllerinin sitoplazmaya transportunda kolaylık sağlamaya yönelik bir fonksiyonel adaptasyondur.

Türler arasında kromozom sayısı bakımından farklar olduğu gibi NOR'ları taşıyan kromozom sayısı bakımından da farklar vardır (Aydın 2004). Bir bireyin farklı doku hücrelerindeki AgNOR sayıları da farklıdır. Her ne kadar Smith ve Crocker (1988), her *nukleus* başına düşen AgNOR sayısı, AgNOR kümesi sayısı ve her kümedeki ortalama AgNOR sayısının kesin olarak belirlenebileceğini ileri sürmüştür de Giri ve ark (1989), kümelerdeki AgNOR sayısının kesin olarak tespitinin zor olduğunu ve bu nedenle de her kümenin tek bir AgNOR olarak kabul edilmesi gerektiğini ileri sürmektedirler. Özellikle, aktif olarak çoğalan tümör hücrelerinde durum böyledir. İnterfaz hücrelerinin mitotik hücrelerden daha yoğun AgNOR ağına sahip olması (Manuelidis 1984), ribozomal DNA (rDNA) transkripsiyonunun interfazda arttığını ortaya koymaktadır. Nitekim inaktif hücrelerden olan spermatozoonlarda AgNOR gözlenmemektedir.

Gümüşleme boyama yöntemiyle boyanan kesitlerdeki hücre çekirdeklerinde gözlenen gümüş-pozitif *nukleolus* materyali miktarının, hücre çoğalması ve özellikle kötü huylu tümörlerin *malignitesi* ile bağıntılı olduğu ileri sürülmüştür (Hubbell ve Hsu 1977, Reeves ve ark 1982, Arden ve ark 1989, Derenzini ve ark 1989, Kodousek ve Dusek 1991, Kanitakis ve ark 1992, Hoyo ve ark 1993). Zira bir hücredeki rDNA transkripsiyonu ile ribozomal biyogeneziste önemli rol oynayan gümüş-pozitif proteinler hücrenin ribozom sentezi aktivitesiyle bağıntılı olduğundan, bunların hücredeki miktarları, hücredeki protein sentez aktivitesinin iyi bir göstergesi olabilir.

AgNOR boyama yöntemiyle boyanan kesitlerde *nukleolusların* lekeli görünmesinin sebebi, argirofil proteinlerin FC'ler ve bunlara komşu DFC'lerde lokalize olmalarıdır. Bu nedenle gümüş-pozitif leke sayısı, aktif rRNA sayısı veya rRNA genlerinin gruplaşmalarıyla ilişkilidir. Hızlı çoğalan hücreler yavaş çoğalanlardan daha fazla ribozoma ihtiyaç duyacaklarından, gümüş pozitif proteinlerin miktarı ve gümüş lekelerinin sayısıyla hücrenin çoğalma hızı arasında da bir bağıntının olduğu kabul edilmektedir (Kanitakis ve ark 1992).

Farklı dokuları oluşturan hücrelerdeki AgNOR sayıları farklıdır. Aynı zamanda, bir hücre çekirdeğindeki AgNOR alanı ile çekirdek alanı/AgNOR alanı oranları da hücreler arasında önemli farklılıklar gösterir (Zaczek ve ark 1992, Aydın

2004). NOR sayıları, hücrenin protein sentez ihtiyacı ve çevre şartlarına bağlı olarak da değişiklik gösterir (Goodpasture ve ark 1976, Mikelsaar ve ark 1977, Alberts ve ark 1989). Tümör hücrelerinde AgNOR'ların sayıları yanında çekirdek içindeki lokalizasyonları ve şekillerinde de önemli değişiklikler ortaya çıkmaktadır. AgNOR'ların çekirdek içindeki lokalizasyonlarının değişmesi, çekirdeğin ultrastrüktüründe çok köklü değişikliklerin olduğunu ve bunun da neoplastik transformasyonun bir parçası olduğu düşünülmektedir (Raska ve ark 1983).

Schwint ve ark (1992), X-ışınlarının; Severgnini ve ark (2002) ile Garcia-Moreno ve ark (2001), kronik alkolizmin; Cancado ve ark (2001) ile Orrea ve ark (2001), sigaranın; Mateus ve Taboga (2001), açlığın; Godoy ve ark (2001) ile Leek ve ark (1991) doku yaralanması ve rejenerasyonun; Canet ve ark (2001), farklı sıcaklıkların; Khanna ve Dutta (2002), enrofloksasinin; Hara ve ark (2000), tekrarlayan mekanik uyarıların farklı doku hücrelerinin değişik AgNOR parametreleri üzerindeki etkilerini belirlemişlerdir. Su ve Delany (1998) büyümeye performanslarının geliştirilmesi yönünde geliştirilen etçi tavuk ırkları üzerinde çalışmışlardır. Aydın (2004) ise, etçi ve yumurtacı tavuk ırklarının değişik doku hücrelerinin AgNOR parametrelerinde embriyonik ve kuluçka sonrası dönemlerde oluşan farklılıklarını incelemiştir.

İnsanlarda NOR'lar üzerinde yapılan çalışmalar çoğunlukla kanser hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiştir (Hubbell ve Hsu 1977, Reeves ve ark 1982, Arden ve ark 1989, Boon ve ark 1988, Derenzini ve ark 1989, Suarez ve ark 1989, Duchrot 1990, Merot ve ark 1990, Kodousek ve Dusek 1991, Kanitakis ve ark 1992, Bülbül ve ark 1993, Hoyo ve ark 1993). Çalışma sonuçları (Hoyo ve ark 1993, Duchrot 1990, Merot ve ark 1990, Kanitakis ve ark 1992), genel olarak kötü huylu tümörlerin, iyi huylulardan ve köken aldıkları normal dokudan daha fazla AgNOR'a sahip olduklarını göstermiş olmakla birlikte; bazı uyumsuz sonuçlar da elde edilmiştir (Hoyo ve ark 1993, Hubbell ve Hsu 1977). Rosa ve ark (1990), mide kanseri ve bunun ön evrelerindeki AgNOR aktivitesi artışının kanser öncesi evrenin son dönemindeki (border-line) lezyonların değerlendirilmesinde AgNOR boyama tekniğinin yararlı olabileceğini bildirmiştir.

1.4. Mikronükleolus (MN) Oluşumu ve Bu Oluşumu Etkileyen Faktörler

Bir mikronükleus, mitoz bölünmenin metafaz/anafaz geçisi aşamasında, ya anöjenik bir olay sonucu kromozomun tamamen kaybı veya kromozom kırığına yol açan (klastojenik) bir olay sonucu oluşan asentrik (sentromersiz) bir kromozom parçasının yeni oluşan hücre çekirdeklerine dahil olamamaları sonucu şekillenir (Fenech ve ark 1999).

Sadece, telofazda yeni oluşan hücre çekirdeklerinden ayrılan asentrik parçalar (asentrik fragmanlar, AF) MN'ları oluşturabilir. Bu yüzden görülmeleri için hücre bölünmesi gerekli bir şarttır ve görülmeye frekanslarının, kromozom kırığına yol açan ajanla muameleyi takiben artması beklenir. Zira mitoz bölünmeyle gittikçe daha fazla sayıda kusurlu hücrenin oluşması beklenir. Teorik olarak; bölümeyen, ya da çok yavaş bölünen hücre popülasyonunun genotoksik bir etkene maruz kalması halinde ya da hücre bölünmesini durduran bir etkenle muamele durumunda hemen hemen hiç MN gözlenmeyecektir. AF'lar hücre siklusunun S-fazında, diğer genlerin duplikasyonuyla birlikte duplike olur ve bu da ikinci MN topluluğunu oluşturur ki, bu da MN görülmeye frekansının artmasına yol açar. Yukarıdaki nedenlerle bir hücrenin MN frekansı 4 faktörce etkilendir (Savage 2000). Bunlar; a. MN oluşumuna yol açan faktörler, b. Oluşan AF'lerin kaderi, c. Hücre kinetiği faktörleri, d. Zaman ve yer değişimi faktörleridir.

MN frekansının, gerek *in vivo* ve gerekse de *in vitro* yöntemlerle belirlenmesi, genotoksik hasarların tespitinde önemli ipuçları vermektedir. Bu sayede çeşitli mesleki ve çevresel ortamlarda, ya da yaşam stilinin bir parçası olarak genotoksik ajanlara maruz kalan insan popülasyonlarında kromozom hasarının olup olmadığı ve derecesi hakkında önemli bilgiler elde edilebilmektedir (Bonassi ve ark 2001). Ayrıca bu yöntemle mukoza epitel hücreleri de incelenebildiğinden yöntem, çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanların sitogenetik etkilerinin belirlenmesi amacıyla eksfolyatif sitolojide de yaygın biçimde uygulanan bir teknik haline gelmiştir. Yöntemi uygulayan Elavarossi ve ark (2002) mobilya endüstrisi işçilerindeki genetik hasarı belirlemek için lenfositlerde kardeş kromatidler arasındaki parça değişimi (sister chromatide exchange, SCE) frekansı ile MN frekansını tespit etmişlerdir. Bu

işçilerdeki MN frekansı %17,2 olduğu halde, sigara içmeyen ve havası temiz ortamda yaşayan kontrollerde %7,54 olarak bulunmuştur. Araştırcılar (Elavarossi ve ark 2002), MN frekansındaki değişikliklerin genetik hasarın tespitinde yararlı bir kriter olduğunu ve odun tozunun genetik hasara yol açtığını vurgulamışlardır. Levario-Carillo ve ark (2005), farklı çevrelerde yaşayan annelerin bebeklerinin göbek kordonu lenfositlerindeki MN frekanslarını belirlemiştir. Konopacka (2003) yanak mukoza hücrelerinde, sigara içenlerde MN frekansının içmeyenlerdeki 3 katı fazla olduğunu (içenlerde 1,50–0,47%, içmeyenlerde 0,55–0,32%) bildirmiştir. Yaş ve cinsiyetin MN frekansı üzerinde etkisi bulunmamıştır. Sato ve Temita (2001) sağlıklı kişilerdeki MN'lerin kromozom kırıkları ve mitoz mekiği hasarlarından kaynaklandığını bildirmiştir. Bu araştırcılara göre MN frekansı sigara içenlerde içmeyenlerin 2 katıdır. Alkol kullanımı, cinsiyet, yaş, acı ve sıcak gıda tüketimi, kırık diş, diş fırçalama, ağız içi antiseptikleri ve ağız enfeksiyonlarıyla MN frekansı arasında korelasyon bulunmamıştır. Sigara içenlerin en fazla etkilenen anatomik bölgesi ağız tabanıdır.

In vitro koşullarda perifer kan lenfositlerindeki (PBL) kromozom hasarlarının bir göstergesi olarak mikronükleus (MN) induksiyon testinden yararlanılabileceği ilk kez Countryman ve Heddle (1976) tarafından ileri sürülmüş ve takiben de karyokinezi takiben sitokinezin bloke edilmesiyle oluşan iki çekirdekli hücrelerde MN sayımı yöntemi geliştirilmiştir.

Orijinal MN induksiyon testi *in vitro* koşullarda gerçekleştirilir ve genotoksisite ile sitotoksisite hakkında önemli bilgiler sağlar. Bu teknikte dikkate alınan kriterler; kromozom kırıkları, kromozom kaybı, kromozomların iç yapılarının yeniden tertiplenmesi, gen amplifikasyonu, nekroz, apoptozis ve sitotoksisite ve/veya hücre çoğalmasıdır. MN induksiyon testi; özellikle kanser riskinin belirlenmesinde, kromozom ve genom mutasyonlarının saptanması veya genotoksik ajanların belirlenmesinde, gerek *in vivo* ve gerekse de *in vitro* olarak uygulanmaktadır. Sonuç olarak MN induksiyon testi, mitozla bölünen hücrelerde oluşan genotoksik değişikliklerin ortaya konmasında güvenle uygulanabilen bir tekniktir. MN induksiyon testi, yeni geliştirilen birçok etken maddenin pazara sunulmadan önce zararlı etkilerinin belirlenmesi amacıyla yönelik olarak geçmesi gereken test grubundaki testlerden biridir. Bu test, çevresel kirleticilerin mutajenik etkilerinin

belirlenmesi alanında çalışan laboratuarlar arasında oldukça popülerite kazanmıştır (Bonassi ve ark 2001) ve yaygınlaşmasının iki sebebi vardır: 1- PBL-MN testi kromozom kırık ve kayıpları hakkında daha az maliyetle güvenilir bilgi sağlar, 2- Sitokinezisin bloke edildiği MN testi (CBMN), hücre bölünmesinin genotoksik etkilerin belirlenmesini zorlaştıran bazı olumsuzluklarını ortadan kaldırmıştır (Bonassi ve ark 2001).

MN sayımı, lenfosit ve fibroblast kültürleri ile epitel hücresi döküntülerinde yapılabilmektedir. Hatta doku kesitlerinde de MN sayımı yapılan çalışmalar vardır. Günümüzde MN induksiyon testi, genetik toksisite belirleme (genotoksisite) çalışmalarında standart sitogenetik testlerden biri haline gelmiştir. Standart MN induksiyon testinde; etkisi incelenecək olan madde hücre kültürune ilave edilir. Takiben, mitojen (örneğin fitohemaglutinin, PHA) ilavesiyle mitoza sevk edilen hücreler, mitozun karyokinez aşamasını tamamladıktan sonraki kritik bir evrede, hücre kültür vasatına sitokinezi (kardeş hücrelerin çekirdeklerinin şekillenmesini takip eden sitoplazma bölünmesi) durduran bir maddenin (Örneğin; cyto chalacin-B, Cyt-B) ilave edilmesinden sonra iki çekirdekli (dikaryotik) hücreler oluşturulur. Böyle hücrelerde yapılan incelemeye oluşan MN'lar daha kolayca tanınabilirler. Sitogenezis blok MN (CBMN) testiyle kromozom kırıkları, kromozom kayıpları, non-disjunction, nekroz, apoptozis belirlenmektedir. Test, OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), ICH (International Conference on Harmonisation) ve EU (European Union) tarafından bilimsel bir yöntem olarak kabul edilmiştir.

1.5. MN'ların Morfolojik Özellikleri

Fenech ve ark (2003), hazırlanan preparatlardaki MN'ların tanımlanmasında bazı önemli kriterler belirlemiştir; 1. MN'un çapının ana çekirdeğin 1/4'den daha az olması gerekliyse de insan *lenfosit* MN'leri ekseriya ana çekirdeğin 1/16–1/3'ü büyülüge ve ana çekirdeğin 1/256–1/9'u arasında bir alana sahiptir. 2. MN'ler ana *nükleuslara* bağlı değildirler veya ona tutunmazlar, 3. MN'ler yuvarlak ya da oval şekillidirler, 4. MN'ler boyalı partiküllerinde olduğu gibi refraktıl değildir ve bu nedenle artefaktlardan kolayca ayrılabilirler, 5. MN ana *nükleuslara* dokunabilir fakat üstüne oturmamalıdır ve MN sınırı (zarı) ana *nükleusun* sınırlarından belirgin olarak ayrılmış olmalıdır, 6. MN'ların boyanma yoğunlukları (tonları) ana *nükleuslarinki* gibi ise de çoğulukla daha koyu boyanırlar.

Bu çalışmada, farklı yaşlardaki sigara içen ve içmeyen sağlıklı gönüllülerin yanak ve dilin *dorsal* yüz mukoza epitel hücrelerindeki MN sayıları ve bazı AgNOR parametreleri belirlenmiş ve sigara içenlerle içmeyenlerin verileri yaş grupları da dikkate alınmak suretiyle karşılaştırılarak, sigara içmenin incelenen MN ve AgNOR parametreleri üzerindeki etkileri belirlenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

- Barrera ve ark. (1998), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisi baş/boyun kanserleri üzerine etkisini sigara kullanan ve daha hiç kullanmamış denekler üzerinde çalışılmış, FISH testi sonuçları, sigara içenlerde içmeyenlerden daha fazla kromozomal hasar olduğunu ortaya koymuştur.
- Belowska ve ark. (2004), sigaranın larenks tümörüyleriyle ilişkisini incelemiş, sigara kullanan, daha önce kullanmış ve hiç kullanmamış deneklerde yanak epitelii çalışılmış, larenks tümörlü hastalarda MN frekansında artış tespit etmiştir.
- Benner ve ark. (1994), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisi, klinik veri, oral lökoplak varlığı ve alkol kullanımını incelemiştir, sigara kullanan, daha önce kullanmış ve hiç kullanmamış deneklerde özefagus epitelii üzerinde çalışılmış, normal görünen mukoza epitelyum hücrelerinde de yüksek MN frekansı tespit etmiştir. Lökoplakiyadan korunma amacıyla α -tokoferol alanlarda MN frekansını düşük tespit etmiştir.
- Besarati ve ark. (2000), Sigaranın *bukkal* hücrelere etkisi polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH)-DNA adductları üzerine, sigara kullanan ve daha önce kullanmış deneklerde çalışılmış, sigara içenlerde PAH-DNA adduct oluşumu arttığı adduct sayısı, günde içilen sigaranın katran miktarıyla bağıntılı olduğu tespit edilmiştir.
- Broberg ve ark. (2005), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisini, sigara kullanan ve daha önce hiç kullanmamış deneklerde çalışılmış, kanserlilerde *bukkal* hücrelerin telomer uzunluğu kontrollerden önemli derecede azlığı, sigara kullanımı dikkate alındığında risk 6 kat fazla bulunduğu tespit edilmiştir.
- El Ahmer ve ark. (1999), Sigaranın *bukkal* hücrelere etkisi, bakteriyel patojenler, solunum yolu enfeksiyonları üzerine, sigara kullanan ve daha önce hiç kullanmamış denekler üzerinde çalışılmış, Sigara içenlerde epitelyal bakteri tutunmasında artış görülürken, sigara dumanı ekstraktında bu etki düşük bulunduğu tespit edilmiştir.

- Elahi ve ark. (2002), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisi, DNA tamiri ve orolaringeal kanser, alkol kullanımında, sigara kullanan ve daha önce hiç kullanmamış deneklerde çalışılmış, PCR analiziyle yapılan inceleme orolaringeal kanserle sigara içimi arasında bağıntı ortaya koymamıştır.
- Elahi ve ark. (2003), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisini (polimorfizm ve orolaringeal kanser), sigara kullanan, daha önce kullanmış ve hiç kullanmamış denekler üzerinde çalışılmış, sadece 6 hiç içmeyen olduğundan varılan sonuçlar yeterli değildir.
- Gordon ve ark. (2002), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisi ve bakteri tutunması üzerine üzerinde çalışılmış, bakterilerin sigara içenlerin *bukkal* hücrelerine içmeyenlerinkinden daha fazla tutunduğu saptanmıştır. *Staphylococcus aureus*'un tutunması, içilen sigara katranyla bağıntılı olduğu, Sigaranın, ani yeni doğan ölümü sendromu için risk faktörü olduğu sonucuna varılmıştır.
- Hsu ve ark. (1997), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisi, PAH-DNA ve 4-aminobifenil adductları üzerine, sigara kullanan ve daha hiç kullanmamış denekler çalışılmış, sigara içenler, içmeyenlerin 2- 3 katı PAH-DNA ve 4-aminobifenil adductına sahip olduğu tespit edilmiştir.
- Konopacka ve ark. (2003), sigaranın bukkal hücrelere etkisini yaş ve cinsiyeti dikkate alarak incelemiş, sigara kullanan, daha önce kullanmış ve hiç kullanmamış deneklerde çalışılmış, ortalama *bukkal* MN frekansı sigara içenlerde (%1,5) içmeyenlerden (%0,5) önemli derecede yüksek bulmuş. Sigara içen bayanların MN frekansı (%1,54) içen erkeklerinkinden (%1,31) önemli derecede yüksek bulnmamıştır. Sigara içenlerde yaş ve cinsiyet MN frekansını etkilememiştir.
- Koppikar ve ark. (2005), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisi, oral kanser, virusler, çiklet çığneme ve alkol kullanımındaki etkisini, sigara kullanan ve daha önce hiç kullanmamış deneklerde, ağız mukoza dokusu üzerinde çalışılmış, ağız kanserlerini 102'sinden 32'sinde insan papilloma virusu belirlenmiştir.
- Li ve ark. (1999), Sigaranın *bukkal* hücrelere etkisi, prekanseröz lezyonlar ve tedavi üzerine, sigara kullanan deneklerde çalışılmış, Çift-kör klinik deneylerde, oral mukoza lökoplağı olanlara karışık-çay ürünü verilmiş. Sigara

içenlerde lökoplaktaki MN frekansı yüksek bulunmuş. Tedavi edilenlerde lezyon küçüldü ve MN frekansı düştüğü belirtilmiştir.

- Liede ve ark (1998), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisi, lökoplak ve vitanminlerin üzerine çalışılmış, sigara içimiyle, *bukkal* epitel hücrelerinin β-karoten konsantrasyonu ve oral displazi arasında istatistiksel bağıntı bulunamamıştır.
- Liu ve ark. (1997), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisini incelemiş ve sigara içmenin methylguanine-DNA metiltransferazı inhibe ettiği gösterdiğini tespit etmiştir.
- Montero ve ark. (2003), sigaranın bukkal hücrelere etkisini incelemiş, sigara kullanan, daha önce kullanmış ve hiç kullanmamış deneklerde çalışılmış, düşük düzeyde sigara kullananlarda MN frekansında değişiklik olmadığını tespit etmiştir.
- Moore ve ark. (2004), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisini (polimorfizm ve idrar kesesi kanseri), sigara kullanan ve daha önce hiç kullanmamış deneklerde çalışılmış, bütün genotiplerde sigara içmenin idrar kesesi kanseri riskini artırdığı belirtilmiştir.
- Morabia ve ark. (2000), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisi, menopoza girmiş bayanlar ve meme kanseri olanlarda, sigara kullanan ve daha önce kullanmış ve hiç kullanmamış deneklerde çalışılmış, sigara içmeyle meme kanseri arasında bağıntı bulunmuştur.
- Munoz ve ark. (1987), sigaranın *özefagus* epiteline etkisi, klinik veri, *özefagus* kanseri üzerinde, sigara kullanan, daha önce kullanmış ve hiç kullanmamış deneklerde çalışılmış, çift-kör klinik deneylerde riboflavin, retinol, ve çinkonun, *özafagusun* prekanseröz lezyonlarının azaltılmasında etkili olduğu tespit edilmiştir. Uygulama öncesi ve sonrası *bukkal* epitelin Mn frekansı değişmediğini. Placebo grubunda Mn frekansı düştüğünü. Ancak, her grupta sadece 2 veya 3 sigara içen bulunduğu belirmektedir.
- Niederman ve ark. (1983), sigaranın ağız, burun ve soluk borusu epitel hücrelerine etkisini, sigara kullanan ve daha önce hiç kullanmamış denekler üzerinde, *Trachea* epitelinde çalışılmış, sigara içen ve içmeyenler arasında epitele bakteri tutunmasında fark görülmediği tespit edilmiştir.

- Oßwald ve ark. (2003), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisi, kromozom hasarı üzerine, sigara kullanan ve daha hiç kullanmamış deneklerde çalışılmıştır. Comet testiyle sigara içen ve içmeyenler arasında önemli fark tespit edilmemiştir.
- Orrellana-Bustos ve ark. (2004), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisi, patoloji ve oral hastalıklar üzerine etkisini sigara kullanan ve daha hiç kullanmamış denekler üzerinde çalışılmış, Sigara içenlerde mukoza normal görünmesine rağmen, keratinizasyon artışı ve akrosentrik kromozomlarla alakalı AgNOR aktivitesindeki artış da dahil olmak üzere önemli sitolojik değişiklikler sergilediğini tespit etmiştir.
- Piatti ve ark. (1997), Sigaranın *bukkal* hücrelere etkisi ve oral enfeksiyon üzerine, sigara kullanan ve daha önce hiç kullanmamış deneklerde çalışılmış, Sigara içenlerde epitelyal bakteri tutunmasında artış görülmüştür.
- Piyathilale ve ark. (1995), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisini yaş, cinsiyet, ırk ve gıdanın etkilerini incelemiş, sigara kullanan, daha önce kullanmış ve hiç kullanmamış deneklerde çalışılmış, sigara içenlerde MN frekansı artmıştır. Beyaz ırkta MN frekansı siyah ırkın iki katı fazla bulunmuştur. Yaş ve cinsiyet de MN frekansına etkili faktörlerdir. *Bukkal* hücre MN frekansı üzerinde gıdanın etkisi bulunmamıştır.
- Phillips (2002), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisi DNA adductları üzerine çalışmışlar, DNA'ya bağlanarak onun yapısını değiştiren maddelerle DNA'nın oluşturduğu moleküllere (DNA adducts) sigara içenlerde daha fazla rastlanmıştır.
- Romano ve arrk. (1997), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisi, DNA adducts üzerinde çalışmışlar ve sigara içenlerde DNA adduktlarının sayısının arttığını tespit etmişlerdir.
- Romano ve ark. (1999), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisi, PAH-DNA adductları üzerine, kullanan ve daha önce kullanmış deneklerde çalışılmış, günde içilen sigara sayısıyla PAH-DNA adductları arasında bağıntı tespit edilmiştir.
- Rojas ve ark. (1996), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisi baş/boyun kanserleri etkisi üzerine, sigara kullanan ve daha hiç kullanmamış deneklerde çalışılmış,

DNA kol kıırıkları sigara içenlerde içmeyenlerden önemli derecede yüksek bulunmuştur.

- Sarto ve ark. (1987), sigaranın bukkal hücreler etkisi ve alkol kullanımını, sigara kullanmadan önce ve hiç kullanmamış deneklerde üzerinde çalışılmış, sigara içenlerde kromozomal kıırıklara bağlı MN frekansı iki kat yüksek bulunmuştur.
- Suhas ve ark. (2004), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisini ve oral patolojisini incelemiş, sigara kullanan, daha önce kullanmış ve hiç kullanmamış deneklerde çalışılmış, *bukkal* mukoza ve damak epiteli MN frekansı sigara içenlerde artarken, dil epitelinde değişmiştir. Yaşıla MN frekansı değişmemiştir.
- Stone ve ark. (1995), sigara içiminin ve *bukkal* hücereler üzerindeki etkisi, mukoza örneği ve biyopsilerde DNA adductları üzerine, sigara kullanan ve daha hiç kullanmamış deneklerde çalışmışlar, sigara içenlerde adduct seviyeleri içmeyenlerden yüksek seviyede olduğunu tespit etmişlerdir.
- Stich ve ark. (1983), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisini incelemiş, sigara kullanan, daha önce kullanmış ve hiç kullanmamış deneklerde çalışılmış, dil ve yanak epitelinde Mn frekansı artışı sadece sigara ve alkolü birlikte kullananlarda artmıştır. Tek başına alkol veya sigara kullananlarda fark görülmemiştir.
- Stich ve ark. (1988), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisi üzerine çalışmışlar ve MN frekansının, değerlendirmede iyi sonuç verdiği bildirilmiştirlerdir.
- Stone ve ark. (1995), sigara içiminin ve *bukkal* hücereler üzerindeki etkisi, mukoza örneği ve biyopsilerde DNA adductları üzerine, sigara kullanan ve daha hiç kullanmamış deneklerde çalışmışlar, sigara içenlerde adduct seviyeleri içmeyenlerden yüksek seviyede olduğunu tespit etmişlerdir.
- Sweeney ve ark. (2000), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisi, polimorfizmler ve oral kanser üzerine, sigara kullanan ve daha önce hiç kullanmamış deneklerde, ağız mukozasında çalışılmış, patolojik dokularda 490 hastanın 9'unda *bukkal* hücre testleri yapılmıştır.
- Wrubel ve ark. (1961), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisini ve oral patolojisini incelemiş, sigara kullanan deneklerde çalışılmış, sadece 11 sigara içen

incelenmiş, sigarayı birkaç hafta bırakmakla ağız içi keratininde düzelmeye meydana gelmediği tespit edilmiştir.

- Wu ve ark. (2004), sigaranın bukkal hücrelere etkisini incelemiştir, sigara kullanan, daha önce kullanmış ve hiç kullanmamış deneklerde çalışılmış, MN frekansı sigara tiryakiliğiyle arttığını tespit etmiştir.
- Zhang ve ark. (1995), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisi, PAH-DNA adductları üzerine, sigara kullanan ve daha hiç kullanmamış deneklerde çalışmışlardır, sigara içenlerde PAH-DNA adduct seviyesi içmeyenlerin 3 katı olduğunu belirtmişlerdir.
- Zhang ve ark. (2002), sigaranın *bukkal* hücrelere etkisi, malondialdehit-DNA adductları üzerine, sigara kullanan ve daha önce kullanmış deneklerde çalışılmış, malondialdehitin modifiye ettiği DNA adductuna sigara içenlerde fazla miktarda rastlanmıştır.

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Ağız Mukoza Epitel Kazıntılarının Alınması ve Frotilerin Hazırlanması

Bu çalışmada, sigara içmeyen ve günde bir paket sigara içen (20 adet/gün) sağlıklı gönüllü erkek bireylerden, abeslangla alınan dil ve yanak mukoza kazıntıları materyal olarak kullanıldı. Gönüllülerin yaş, meslek ve sigara kullanım süreleri kendilerine sunulan bir anket formuyla belirlendi. Her birinde 30'ar kişi bulunan 35–45, 46–55, 56 ve üzeri olmak üzere üç yaş grubu oluşturuldu. Her bireyden, çesme suyuyla ağızlarını çalkaladıktan sonra dil ve yanak olmak üzere kazıntı örneği alındı ve her kazıntı örneğinden 4'er sürme preparat (smear, froti) hazırlandı. Havada, oda sıcaklığında (20°C) kurutulan frotilerden AgNOR boyamasında kullanılacak olanlar metanol-asetik asit karışımında (3:1, v/v) 5 dakika süreyle tespit edildi (Levario-Carillo ve ark 2005). MN boyaması uygulanacaklar ise glutaraldehid-aseton tespit sıvısında tespit edildi. Havada kurutulan frotiler boyanıncaya kadar buz dolabında muhafaza edilerek S.Ü Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Araştırma Laboratuvarına getirildi.

3.2. MN Boyaması

MN'lerin boyanması amacıyla hücre çekirdeğini boyayan ve özellikle de DNA'ya spesifik olarak bağlanan boyalı maddeleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Kan frotilerinin bu amaçla boyanmasında ise kan boyaları (Romanowsky boyaları) tercih edilmektedir. Wright boyası (Lavario-Carillo ve ark 2005) kullanıldığı gibi, modifiye May Grünwald-Giemsa boyama yöntemini tercih eden araştırmacılar (Wolf ve Luepke 1997) da bulunmaktadır. Daha detaylı çalışmalarında, acridine orange gibi flüoresan DNA boyaları ve bir DNA demonstrasyon yöntemi olan Feulgen reaksiyonu (Feulgen-fast green) yanında, bu amaç için geliştirilmiş özel problemler da kullanılmaktadır. Feulgen-fast green parafin kesitlere de uygulanabilen pratik bir

yöntemdir (Vanhauwert ve ark 2001). Bu çalışmada MN boyaması, May Grünwald-Giemsa boyasının modifikasyonuyla geliştirilen Wolf ve Luepke'nin (1997) uyguladığı metoda göre gerçekleştirildi. Önceden tespit edilen frotiller deiyonize distile suyla 3 kez yıkanarak, süzgeç kağıdından süzülen May Grünwald (Merck 1424, Germany) boyasıyla 3 dakika boyandı. Süre sonunda, frotillerin üzeri boyanmadan önce 0,1 M disodyum sitrat/NaOH tampon solüsyonuyla (pH 5,2) kaplandı. Beş dakikayı aşmayacak süre beklenerek frotillerin üzerinde metalik parıltı oluşuncaya kadar beklendi. Daha sonra lamlar üzerindeki boyanma-tampon karışımı dökülerek distile suyla 3 kez yıkanan frotiller, 0,1 M disodyum sitrat/NaOH tamponunda (pH 5,2) hazırlanan Giemsa solüsyonuyla 20 dakika süreyle boyandı. Boyama sonunda deiyonize distile suyla iyice yıkanan frotiller havada kurutuldu ve dehidrasyonu takiben ksilol serilerinden geçirilerek sentetik resinle (Entelan, Merck, Germany) lamelle kapatıldı. Sayımda, hücre zarı ve *nükleus* bütünlüğü korunan, sağlıklı hücreler sayımı dahil edildi.

3.3. MN Sayımı

Preparatlar Leitz Laborlux 12 model laboratuar mikroskopuya incelenerek, önceki araştırmacıların (Wolf ve Luepke 1997, Fenech ve ark 2003) kriterleri esas alınarak değerlendirildi (Şekil 3.1.). Tipik dil ve yanak mukoza epitel morfolojisine sahip, bütünlüğü korunmuş ve tipik nükleer kromatin dağılım paternine sahip hücreler sayımlara dahil edildi. İleri derecede dejener olmuş, *nükleusu* parçalanmış, soluk boyanmış ve piknotik hücreler sayımı dahil edilmemi. Her örnekte toplam 1000 adet epitel hücresi sayılarak, bunlardaki MN sayıları belirlendi ve sonuçlar, 1000 hücre başına düşen MN olarak ifade edildi. Gerekli görülen bölgelerin dijital görüntüleri, dijital fotoğraf makineli (Nikon DS Camera Control Unit DS-L1 with DS Camera Head DS-5M) ışık mikroskopu (Nikon Eclipse, E-400) ile kaydedildi.

3.4. AgNOR Boyaması ve AgNOR Parametrelerinin Belirlenmesi

AgNOR boyama solüsyonu hazırlanırken, önce jelatin-formik asit solüsyonu hazırlandı. Bu amaçla 2 gr jelatin (Merck) 100 ml %1'lik formik asit (Merck) içinde çözürüldü. Bu işlem, jelatinin formik asitte tamamen çözünmesini sağlamak amacıyla 58–60°C' lik etüvde gerçekleştirildi. Takiben, solüsyon oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Gümüş nitrat çözeltisi ise, 50 g kristal gümüş nitrat 100 ml distile suda çözürlerek hazırlandı. Boyama solüsyonu, taze hazırlanan jelatin-formik asit solüsyonu ile gümüş nitrat çözeltisinin kullanımdan hemen önce karıştırılmasıyla hazırlandı. Bu amaçla; 1 hacim jelatin-formik asit solüsyonuyla 2 hacim %50'lik gümüş nitrat solüsyonu karıştırıldı. Frotiller, taze hazırlanan boyama solüsyonunda, oda sıcaklığında (20°C) ve karanlıkta 30 dakika bekletildi (Aydın, 2004). Süre sonunda frotiller distile suda 3 kez yıkandı ve dehidre edilip sentetik resinle (Entelan, Merck) kapatıldı.

Hücre çekirdeğindeki farklı şekilli ve kahverengi-siyah lekeler halinde boyanan yapılar AgNOR'lar olarak kabul edildi. Her örnekte 200 epitel hücresi incelenerek her hücrenin çekirdek alanı, çekirdekteki AgNOR sayısı ve AgNOR alanı belirlendi. Elde edilen verilerden, bir çekirdekteki AgNOR alanının çekirdek alanı içindeki yüzdesi (nisbi AgNOR alanı) hesaplandı.

3.5. Boyanan Frotillerin İncelenmesi ve Dijital Görüntülerin Analizi

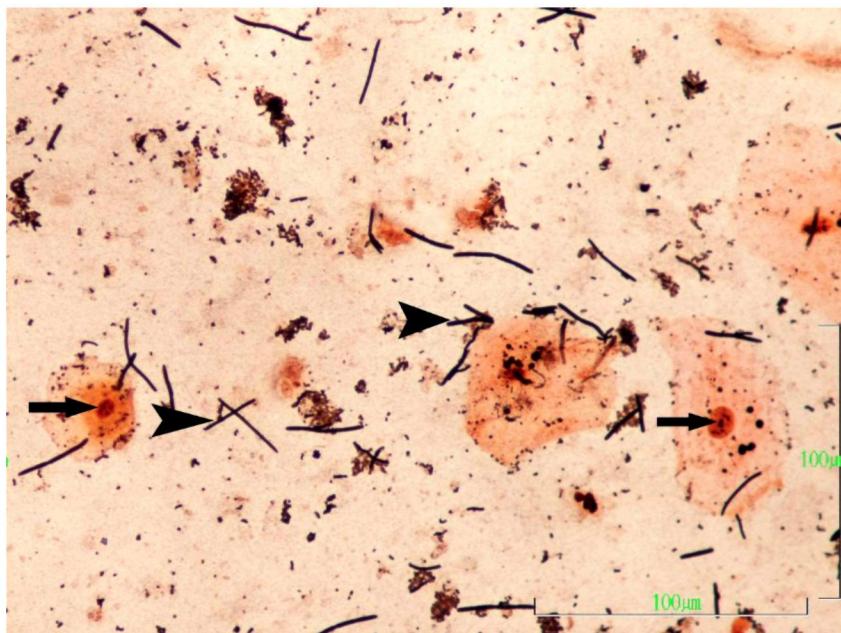
Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda X40 ve X100 büyütümlerde incelenerek, gerekli görülen bölgelerin dijital görüntüleri kaydedildi. Kaydedilen görüntülerin analizi, bir görüntü analiz programı (BS200 PRO) kullanılarak gerçekleştirildi.

3.6. İstatistiksel Analizler

Elde edilen veriler her grup için grup ortalaması \pm standart sapma ($\pm SD$) olarak ifade edildi. Veriler, SPSS 10.0 istatistik programı kullanılarak tek yönlü varyans analiziyle analiz edilerek gruplar arası farkların önem dereceleri hesaplandı ve $P<0.05$ değerleri istatistiksel yönden önemli kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

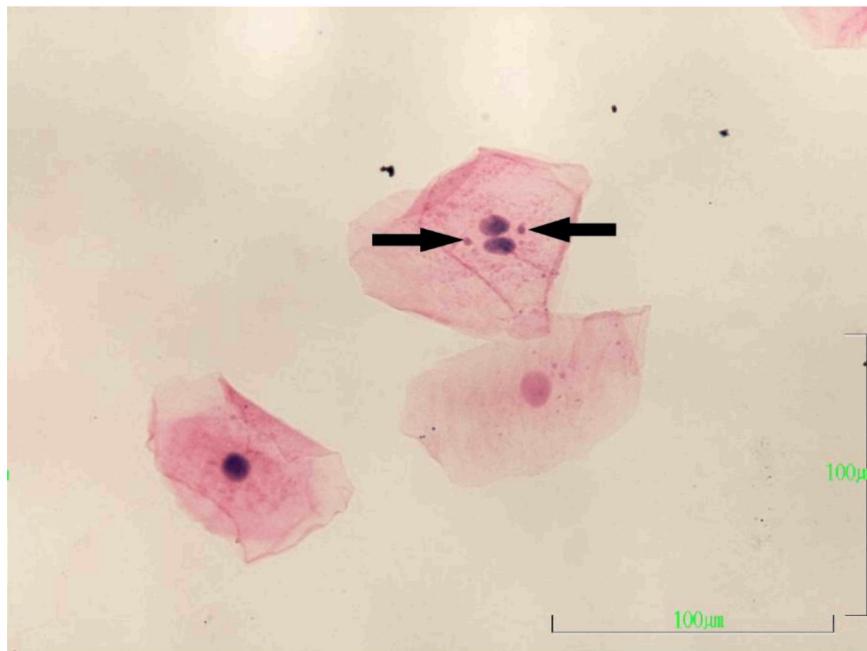
Hazırlanan preparatlarda, dil ve yanak mukozası epitel hücreleri çoğunlukla gruplar halinde bulunmakla birlikte, bireysel hücreler de gözlendi (Şekil 4.1, 4.1.1, 4.2.1 ve 4.2.2). Präparatlarda bakterilere ve bitki hücre kalıntılarına sıkılıkla rastlandı (Şekil 4.1). Alyuvar ve *nötrofillere* rastlanmadı.



Şekil 4.1. Otuz beş-kırk beş yaş grubundan bir bireyin, dil mukozası sürme preparatı. Hücre çekirdeklerinde kahverengi-siyah boyanmış farklı sayıdaki AgNOR'lar (oklar) ve çok sayıda bakteri (ok başları) görülmektedir. AgNOR boyası, Büyütme çizgisi: 100 μ m.

4.1. MN Sonuçları

Fenech ve ark'nın (2003) tanımladığı şekilde mononükleer veya binükleer epitel hücrelerinde; çapı ana çekirdeklerin çapının 1/4'ün den daha az olan, ana çekirdeklere bağlı olmayan ona tutunmamış, yuvarlak yada oval şekilli olan, refraktilite göstermeyen ve boyanma yoğunlukları (tonları) ana çekirdeklerinkile aynı veya biraz koyu boyanan yapılar MN olarak kabul edildi (Şekil 4.1.1).



Şekil 4.1.1. Otuz beş-kırk beş yaş grubundan sigara içen bir bireyin dil mukoza epitel hücreleri. Çift çekirdekli bir hücredeki 2 adet MN (oklar) dikkati çekmektedir. MN boyası, Büyütme çizgisi: 100 μ m.

Yapılan MN sayımlarına göre sigara içmeyen bireylerin hem dil ve hem de yanak mukoza epitelini MN frekansında yaşla birlikte, istatistiksel öneme sahip olmasa da belirgin bir artış gözlendi (Çizelge 4.1). Sigara içenlerin hem yanak ve hem de dudak epitelini MN frekansında çok keskin ve istatistiksel öneme ($P<0.05$) sahip bir artış tespit edildi.

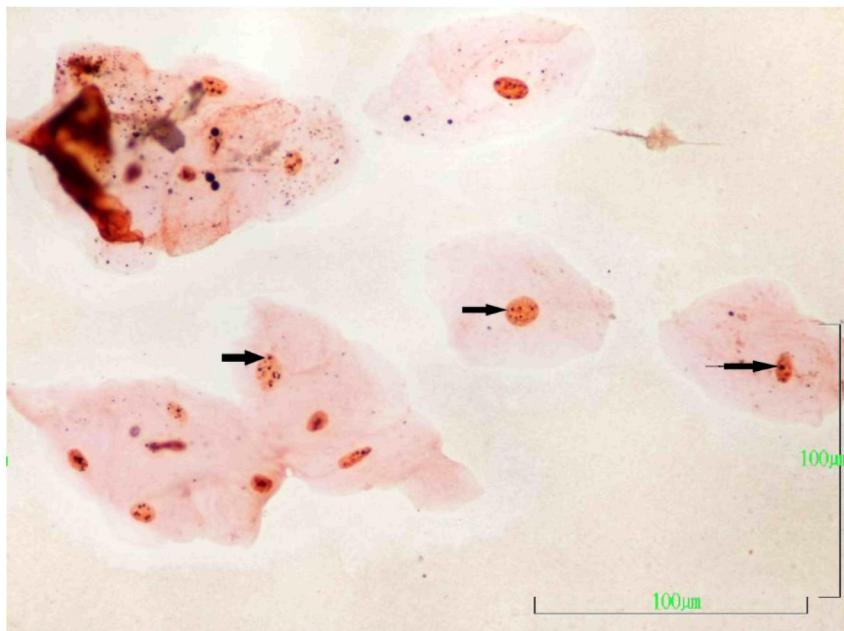
4.2. AgNOR Sonuçları

Çekirdekteki AgNOR'lar dil mukoza epitelinde sigara içmeyenlerde ortalama 4,7-6,4 adet arasında, yanak mukoza epitelindeyse biraz daha yüksek ve 5,7-6,3 arasında değişen sayıarda, genellikle eksantrik ve en az biri nükleer zarfa komşu durumda lokalize olan koyu, oval-yuvarlak şekilli, kahverengi-siyah yapılar halinde görüldü (Şekil 4.2.1). Sigara içenlerde ise dil mukoza epitelinde 10,2-15,17 ve yanak mukoza epitelinde ise 5,0-7,7 arasında değişen sayıarda AgNOR gözlandı. AgNOR'ların lokalizasyon ve boyanma özelliklerinden dil ve yanak mukoza epitel hücreleri arasında belirgin fark gözlenmedi (Şekil 4.2.1 ve 4.2.2).

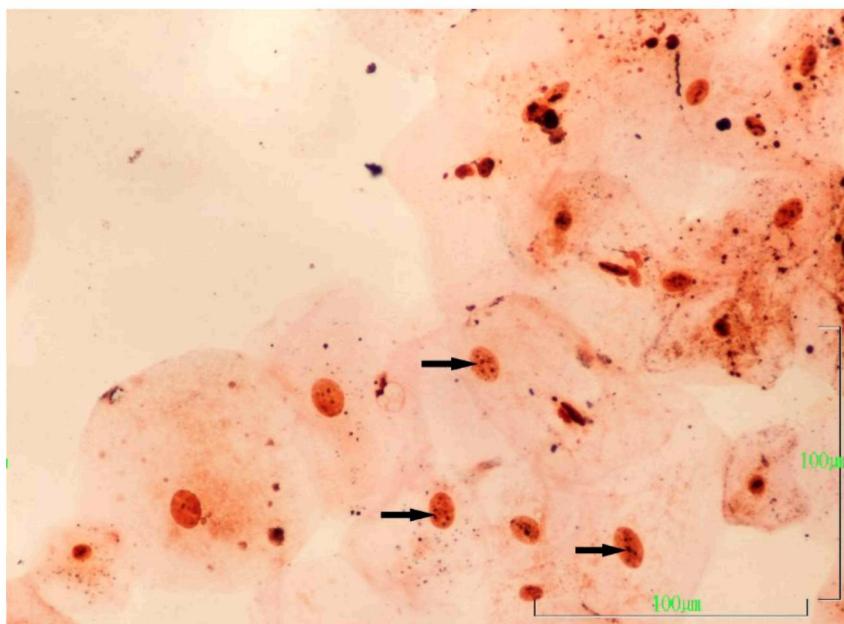
Çizelge 4.2.1. Grupların dil ve yanak mukoza epitel hücrelerinin MN frekansı (1000 hücre başına düşen MN sayısı) ve bunların istatistiksel analiz sonuçları.

Gruplar N=30	Dil mukoza epители		Yanak mukoza epители	
	Sigara içmeyen $X \pm SD$	Sigara içen $X \pm SD$	Sigara içmeyen $X \pm SD$	Sigara içen $X \pm SD$
35-45 yaş grubu	2,28±0,8	10,7±2,4*	2,72±1,8	13,82±2,9*
46-55 yaş grubu	2,45±1,2	14,6±2,2*	2,57±1,6	15,97±3,2*
56 yaş ve üzeri yaş grubu	2,88±1,6	15,5±3,7*	2,85±1,2	15,26±5,8*

* Sigara içen grupların MN frekansı içmeyenlerden önemli derecede ($P<0.05$) yüksek bulunmuştur.



Şekil 4.2.1. Otuz beş-kırk beş yaş grubundan sigara içmeyen bir bireyin dil mukoza epitel hücreleri. Hücre çekirdeğinde kahverengi-siyah boyanmış farklı sayıdaki AgNOR'lar (oklar) görülmektedir. AgNOR boyası, Büyütme çizgisi: 100 μ m.



Şekil 4.2.2. Elli altı ve üzeri yaş grubundan bir bireyin, grup halindeki yanak mukoza epitel hücreleri. Hücre çekirdeklerinde kahverengi-siyah boyanmış farklı sayıdaki AgNOR'lar (oklar) görülmektedir. AgNOR boyası, Büyütme çizgisi: 100 μ m.

Sigara içmeyenlerin dil mukoza epitel hücrelerinin çekirdek alanında tedrici fakat ömensiz ($P>0.05$) bir artış gözlenmiştir. Sigara içen 35–45 yaş grubu en düşük çekirdek alanına sahipken, bu değer 46–55 yaş grubunda en yüksek değere ulaşmış ve 56 yaş ve üzeri grupta tekrar düşmüştür. Sigara içenlerin çekirdek alanı, bütün yaş gruplarında içmeyenlerden daha düşük bulunmuştur ve fark, 35–45 yaş grubuyla 56 yaş ve üzeri grupta istatistiksel öneme sahiptir ($P<0.05$). Sigara içmeyen 35–45 ve 56 yaş ve üzeri grupların dil mukoza epitelini çekirdek alanı, sigara içenlerden önemli derecede fazla iken, 46–55 arası yaş grubunda sigara içen ve içmeyenler arasında fark bulunmamıştır. Hem sigara içen ve hem de içmeyenlerin çekirdek alanında bireysel farklılıklar belirgindir (Çizelge 4.2.1).

Sigara içmeyenlerin yanak mukoza epitel hücre çekirdek alanı 35–45 yaş grubunda en yüksek değere sahipken, 46–55 yaş grubunda azalmış ve 56 yaş ve üzeri grupta tekrar yükselmiştir. Sigara içenlerde yanak mukoza epitel hücre çekirdek alanı yaşla birlikte tedrici bir artış göstermiştir. Çekirdek alanı değerlerinde bireysel farklılıklar oldukça fazla olup, yaş grupları arasındaki farklar ömensiz bulunmuştur. Sigara içen ve içmeyenlerin yanak mukoza epitelini çekirdek alanı değerleri karşılaştırıldığında, bütün yaş gruplarında sigara içenlerin önemli derecede daha düşük çekirdek alanına sahip olduğu dikkati çekmiştir (Çizelge 4.2.2).

Sigara içmeyenlerin dil mukoza epitel hücrelerinin AgNOR alanında yaşla birlikte düzenli bir artış gözlenmiş, sigara içenlerde ise tersine bir seyir tespit edilmiş ve yaşla birlikte AgNOR alanı azalmıştır. Sigara içen elli altı yaş ve üzeri grupta AgNOR alanındaki düşüş oldukça belirgindir ve bu yaş grubunda sigara içenlerin AgNOR alanındaki azalma istatistiksel öneme sahiptir (Çizelge 4.2.1).

Farklı yaş gruplarındaki sigara içmeyenlerin yanak mukoza epitel hücrelerinin AgNOR alanı birbirine yakın değerlere sahipti. Sigara içenlerden 35–45 yaş grubuyla 46–55 yaş grubunun AgNOR alanları birbirine oldukça yakınken, 56 yaş ve üzeri yaş grubunda AgNOR alanı keskin bir artış gösterdi. Sigara içmeyenlerin nispi AgNOR alanı 35–45 yaş grubunda %5,9 iken, 46–55 yaş grubunda artarak %8,5'e ulaşmış fakat 56 yaş ve üzeri yaş grubunda %7,2'ye gerilemiştir. Tüm yaş gruplarındaki sigara içenlerin yanak mukoza epitelini AgNOR alanları değerleri sigara içmeyenlerden önemli derecede ($P<0.05$) yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.2.2).

Dil mukoza epitel hücrelerinin nispi AgNOR alanı sigara içmeyenlerde tedricen artarak, 56 yaş ve üzeri grupta %8,3'e ulaştı. Bütün yaş gruplarında sigara içenlerin nispi AgNOR alanı içmeyenlerinkinden önemli derecede yüksek ($P<0.05$) bulunmuştur (Çizelge 4.2.1). Yanak mukoza epitel hücrelerinin nispi AgNOR alanı sigara içmeyen 35–45 yaş grubunda %7,2 iken, 46–55 yaş grubunda yükselterek %7,4'e çıkmış, 56 yaş ve üzeri yaş grubunda %8,3'e çıkmıştır. Sigara içenlerdeyse, 35–45 yaş grubunda %9,9 olan nispi AgNOR alanı, 56 yaş ve üzeri yaş grubunda %29,9'a çıkmıştır. Sigara içen yaş gruplarının tamamının, sigara içmeyenlerden önemli derecede ($P<0.05$) daha yüksek nispi AgNOR alanına sahip olduğu dikkati çekmiştir (Çizelge 4.2.2).

Sigara içmeyenlerin dil mukoza epitel hücrelerinin ortalama AgNOR sayısı yaşla birlikte tedricen artarak, 35–45 yaş grubunda 4,7 iken, 56 yaş ve üzeri yaş grubunda 6,4'e ulaştı. Sigara içenlerde bütün yaş gruplarının dil mukoza epitel hücrelerinin AgNOR sayısı içmeyenlerden önemli derece ($P<0.05$) yüksek bulundu (Çizelge 4.2.1). Yanak mukoza epitel hücrelerinin AgNOR sayısında sigara içmeye bağlı önemli değişiklik gözlenmemiştir (Çizelge 4.2.2).

Çizelge 4.2.1. Grupların dil mukoza epitel hücrelerinden elde edilen *nükleus* ve AgNOR verileri.

İncelenen parametre	Sigara kullanımı	Yaş grupları N: 30		
		35–45 yaş grubu	46–55 yaş grubu	56 ve üzeri yaş grubu
Çekirdek alanı μm^2	Sigara içmeyen $X \pm SD$	97479,6±25889,9*	99230,3±56572,6	106956,7±34850,2*
	Sigara içen $X \pm SD$	69429,4±32615,9	81007,0±28787,5	77788,2±42241,6
AgNOR alanı μm^2	Sigara içmeyen $X \pm SD$	7088,5±5266,6	7364,4±6281,6	8920,4±5627,6*
	Sigara içen $X \pm SD$	6883,4±5273,4	6605,9±6187,3	23271,2±27466,6
Nispi AgNOR alanı (%)	Sigara içmeyen $X \pm SD$	7,2±1,1	7,4±1,5	8,3±2,0
	Sigara içen $X \pm SD$	9,9±1,2*	8,1±1,4*	29,9±3,8*
AgNOR sayısı (Adet/çekirdek)	Sigara içmeyen $X \pm SD$	4,7±1,4	6,3±1,5	6,4±1,9
	Sigara içen $X \pm SD$	10,2±2,5*	15,0±3,8*	15,1±2,6*

- Sigara içen ve içmeyenlerin *nükleus* ve AgNOR değerleri arasındaki fark istatistiksel öneme sahiptir ($P<0.05$).

Çizelge 4.2.2. Grupların yanak mukoza epitel hücrelerinden elde edilen nükleus ve AgNOR verileri.

İncelenen parametre	Sigara kullanımı	Yaş grupları N: 30		
		35–45 yaş grubu	46–55 yaş grubu	56 ve üzeri yaş grubu
Çekirdek alanı μm^2	Sigara içmeyen $X \pm SD$	126910,0±4462,2*	83807,6±9586,1*	100190,3±5695,4*
	Sigara içen $X \pm SD$	67454,0±7286,3	76843,7±6036,8	87968,5±9657,8
AgNOR alanı μm^2	Sigara içmeyen $X \pm SD$	7548,3±7206,9	7196,8±5895,0	7311,6±5676,7
	Sigara içen $X \pm SD$	9864,8±8106,0*	9870,1±8014,8*	20012,2±3468,0*
Nispi AgNOR alanı (%)	Sigara içmeyen $X \pm SD$	5,9±0,9	8,5±2,2	7,2±1,9
	Sigara içen $X \pm SD$	11,0±2,6*	12,8±3,0*	22,7±4,8*
AgNOR sayısı (Adet/çekirdek)	Sigara içmeyen $X \pm SD$	6,1±2,4	6,3±3,0	5,7±1,9
	Sigara içen $X \pm SD$	5,0±0,9	5,7±2,1	7,7±3,5

* Sigara içen ve içmeyenlerin *nükleus* ve AgNOR değerleri arasındaki fark istatistiksel öneme sahiptir ($P<0.05$).

5. TARTIŞMA

MN frekansının gerek *in vivo* ve gerekse de *in vitro* yöntemlerle belirlenmesi, genotoksik hasarların tespitinde önemli ipuçları vermektedir. Bu sayede çeşitli mesleki ve çevresel ortamlarda, ya da yaşam stilinin bir parçası olarak genotoksik ajanlara maruz kalan insan popülasyonlarında kromozom hasarının olup olmadığı ve derecesi hakkında önemli bilgiler elde edilebilmektedir (Bonassi ve ark 2001). Ayrıca bu yöntemle mukoza epitel hücreleri de incelenebildiğinden yöntem, çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanların sitogenetik etkilerinin belirlenmesi amacıyla eksfolyatif sitolojide de yaygın biçimde uygulanan bir teknik haline gelmiştir.

Literatür taramasında sağlıklı kişilerin MN frekansı değerleri hakkında oldukça farklı bildirimlere rastlanmıştır. Bolognesi ve ark. (1999), sağlıklı kişi lenfositlerindeki MN frekansının %2,7–4,0 arasında değiştiğini bildirmiştir. Martinez ve ark'nın (2005), kontrol grubu bireyler için verdiği değer Bolognesi ve ark'nın (1999) bildirimine yakındır ve bu araştırcılar (Martinez ve ark 2005), sağlıklı bireylerde MN frekansını 2,74/1000 hücre olarak tespit etmiş, Arsenikle kontamine su içenlerde ise artarak 3,14/1000 hücreye ulaştığını bildirmiştir. Neri ve ark (2005) 12 kontrol laboratuvarının perifer kan *lenfositleri* için bildirdiği kontrol grubu (baseline) MN frekansı ortalamasının 4,48–5,70 MN/1000 hücre arasında değiştiğini bildirmiştir. Çavuşoğlu ve ark (2008) ise sigara içmeyenlerin yanak mukoza epitel hücrelerinde ortalama MN frekansını erkeklerde 2,60 bayanlarda ise 2,65 olarak bildirmiştir, erkek ve bayan MN frekansları arasındaki farkın istatistiksel öneme sahip olmadığını ($P>0.05$) vurgulamışlardır. Sunulan bu çalışmada, sigara içmeyenlerin dil mukoza epители MN frekansı 2,2–2,88/1000 hücre, yanak mukoza epitelinde ise 2,57–2,85/1000 hücre arasında bulundu. Yaşa birlikte MN frekansı artsa da artışın istatistiksel öneme sahip olmadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar yukarıdaki araştırcıların bulgularıyla uyumludur. Bununla birlikte, Joseph ve ark (2004) perifer kan *lenfositlerindeki* genel popülasyon MN frekansını erkeklerde 8,7/1000 hücre, bayanlardaysa 8,3/1000 hücre gibi oldukça yüksek düzeylerde olduğunu bildirmiştir. Lewijska ve ark (2007), bakır eritme işçileri üzerinde

yaptıkları çalışmada, kontrol grubunun perifer kan *lenfositlerindeki* MN frekansını 0,50/1000 olarak bildirmiştirlerdir.

Farklı genotoksik etkenlere maruz kalan hücrelerde MN frekansında önemli değişiklerin ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Bu konuda çalışan araştırmacılarından Elavarossi ve ark (2002) mobilya endüstrisi işçilerindeki genetik hasar belirlemek için lenfositlerde kardeş kromatidler arasındaki parça değişimi (sister chromatide exchange, SCE) frekansı ile MN frekansını tespit etmişlerdir. Bu işçilerdeki MN frekansının %17,2 olduğu halde, sigara içmeyen ve havası temiz ortamda yaşayan kontrollerde %7,54 olarak bulunmuştur. Araştırmacılar (Elavarossi ve ark 2002), MN frekansındaki değişikliklerin genetik hasarın tespitimde yararlı bir kriter olduğunu ve odun tozunun genetik hasara yol açtığını vurgulamışlardır. Levario-Carillo ve ark (2005), farklı çevrelerde yaşayan annelerin bebeklerinin göbek kordonu *lenfositlerindeki* MN frekanslarını belirlemiştir. Çavuşoğlu ve ark (2008) sigara içen erkeklerin yanak mukoza epitel hücresi MN frekansını 15,90, bayanlarındını ise 15,95 olarak bildirmiştir. Sigara içenlerin MN frekansı içmeyenlerden önemli derecede ($P<0.05$) yüksek bulunmuştur. Joseph ve ark (2004), sigara içenlerdeki MN frekansını içmeyenlerinkinden oldukça yüksek olduğunu (9/1000 hücre) tespit etmiştir. Lewijska ve ark'nın (2007) bulguları da sigara içen bakır işçilerinin perifer kan lenfositlerinin MN frekansının daha yüksek olduğunu (0,99/1000 hücre) ortaya koymaktadır. Konopacka (2003), sigara içenlerde MN frekansının içmeyenlerdekinin 3 katı fazla olduğunu (içenlerde 1,50–0,47%, içmeyenlerde 0,55–0,32%) bildirmiştir. Yaş ve cinsiyetin MN frekansı üzerinde etkisi bulunmamıştır. Sato ve Temita (2001) sağlıklı kişilerdeki MN'lerin kromozom kırıkları ve mitoz mekiği hasarlarından kaynaklandığını bildirmiştirlerdir. Bu araştırmacılara göre MN frekansı sigara içenlerde içmeyenlerin 2 katıdır. Alkol kullanımı, cinsiyet, yaş, acı ve sıcak gıda tüketimi, kırık diş, diş fırçalama, ağız içi antiseptikleri ve ağız enfeksiyonlarıyla MN frekansı arasında korelasyon bulunmamıştır. Sigara içenlerin en fazla etkilenen anatomik bölgesi ağız tabanıdır. Sunulan bu çalışmada yukarıdaki çalışma sonuçlarıyla uyumlu biçimde sigara içenlerin hem yanak ve hem de yanak epiteli MN frekansında çok keskin ve istatistiksel öneme ($P<0.05$) sahip artışlar tespit edilmiştir. Dil ve yanak mukoza epiteli MN frekansları arasında önemli fark yoktur. Bu sonuçlar da sigara dumanında bulunan pek çok genotoksik maddenin dil ve yanak

mukoza epitel hücresi genomunda önemli hasarlara yol açtığını ve bu durumun da MN frekansındaki artışla tespit edilebileceğini göstermektedir. Fenech ve ark (2007) MN testinin non-invaziv tabiatının, bu testi popülasyon veya bireysel bazda gerçekleştirilecek biyo-izleme çalışmalarında popüler bir test haline gelmesini sağladığını bildirmișlerdir. Bununla birlikte, boyamada dikkat edilmesi gereken çok önemli noktalar vardır; keratohiyalin granülleri, hücre zarına tutunan bakteriler yanlış sonuçlara neden olabilmektedir. Spesifik DNA boyalarının kullanılması, keratohiyalin granüllerinin boyanmasını engellese de bakterilerde de DNA bulunması, özellikle koklar söz konusu olduğunda, durumu zorlaştırmaktadır. Bununda ötesinde sayımın sadece basal hücre katmanlarında mı yapılması gerektiği, yoksa yüzlek hücrelerin de sayıma dahil edilip edilmemesi hususu açıklığa kavuşmamıştır.

Bu çalışmada, sigara içmeyen 35–45 ve 56 yaş ve üzeri grupların dil mukoza epitelî çekirdek alanı, sigara içenlerden önemli derecede fazla iken, 46–55 arası yaş grubunda sigara içen ve içmeyenler arasında fark bulunmamıştır. Sigara içen ve içmeyenlerin yanak mukoza epitelî çekirdek alanı değerleri karşılaştırıldığında ise, bütün yaş gruplarında sigara içenlerin önemli derecede ($P<0.05$) daha düşük çekirdek alanına sahip olduğu dikkati çekmiştir. Dil mukoza epitel hücresi AgNOR alanı sigara içenlerde azalmıştır. Sigara içen elli altı yaş ve üzeri grubun AgNOR alanında önemli derecede düşüş ($P<0.05$) ortaya çıkmıştır. Sigara içenlerin yaş gruplarının tamamının dil mukoza epitel hücrelerinin nispi AgNOR alanı ve AgNOR sayısı içmeyenlerden önemli derecede yüksek bulunmuştur. Bütün yaş gruplarında sigara içenlerin yanak mukoza epitel hücrelerinin AgNOR alanı ve nispi AgNOR alanı önemli derece artarken, AgNOR sayısında sigara içen ve içmeyenler arasındaki fark önemsizdir. Paiva ve ark (2004) sigara içenlerin ağız tabanı epitel hücre çekirdeklerinin ortalama AgNOR alanının dil kenarları ve alt dudağınıyle karşılaştırıldığında daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. SCC'un ağız tabanında sık görülmesi nedeniyle örneklerin ağız tabanından alınmasının daha uygun olduğunu ileri süren Usta ve ark (2008), parafin kesitlerde tespit edilen AgNOR sayılarının smearlardakinden daha düşük olabileceğine dikkati çekmişlerdir. Cançado ve ark (2004) dil kenarı mukoza epitel hücrelerinde *nükleus* başına AgNOR sayısını 1,94; ağız tavası mukoza epitelinde ise ortalama 2,07 AgNOR bulmuşlardır. Sigara

içenlerde anatomik bölgeler arasında çekirdek başına ortalama AgNOR sayısında önemli farklar bulunmuştur (Cançado ve ark 2004). Sigara içen grupta çekirdek başına 3 adetten fazla AgNOR'a sahip birey sayısı % 14–53 arasında, üç ve daha fazla AgNOR bulunan çekirdeklerin nispi AgNOR alanı dil kenarında %25,16, ağız tavanında %30,51'dir (Cançado ve ark (2004)). Sunulan bu çalışmada da görüldüğü gibi nispi AgNOR alanı da bölgeler arasında önemli faklar göstermektedir (Cançado ve ark 2004). Günde içilen sigara adedinin, dilin yan yüz mukoza epitelinin AgNOR sayısı ve nispi AgNOR alanı üzerinde önemli etkisi bulunmamıştır (Cançado ve ark 2004). Araştırcılar (Cançado ve ark 2004), dil kenarı ve ağız tavanı bölgelerindeki AgNOR sayısıyla, içilen sigara sayısı arasında bağıntı bulunmamakla birlikte; içilen sigara sayısıyla ağız tavanı bölgesi AgNOR miktarı arasında sıkı bağıntı bulunduğu sonucuna varmışlardır.

Dil mukoza epitel hücrelerinin çekirdek alanı, sigara içen 35–45 ve 56 ve üzeri yaş gruplarında önemli derecede artarken; yanak mukoza epitel hücrelerinde sigara içen yaş gruplarının tamamında önemli derecede artmaktadır. Sigara içenlerde hem dil ve hem de yanak mukoza epitel hücrelerinin MN frekansı, sigara içmeyenlerle karşılaştırıldığında, önemli derecede yükselmektedir. Yanak mukoza epitel hücrelerinde de benzer durum gözlenmektedir. AgNOR parametreleri dikkate alındığında ise, dil mukoza epitel hücrelerinin nispi AgNOR alanı ve AgNOR sayısı sigara içenlerde önemli derecede yüksek iken; yanak mukoza epitel hücrelerinde AgNOR alanı ve nispi AgNOR alanı sigara içenlerde önemli derecede yüksek bulunmuştur.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma sonuçları, sigara içmenin dil ve yanak mukoza epitel hücrelerinde genotoksik etkiye sahip olduğunu bildiren bulguları desteklemektedir. Sigara içenlerde, hem dil ve hem de yanak mukoza epitel hücrelerinin MN frekansında önemli artış gözlenmektedir. *Nükleus* büyülüğu ve AgNOR parametrelerinde sigara içenlerde bazı değişiklikler meydana gelmekle birlikte, dil ve yanak mukoza epitel hücreleri arasında farklar vardır.

Yukarıdaki bulgulara rağmen, bir hücredeki AgNOR sayısı, AgNOR büyülüğu ve bunların yapılarıyla, hücrenin çoğalma özellikleri arasında kesin bağıntı olduğu hakkında genel bir yargıya varmanın iki sakıncası vardır: 1- Çekirdekçiklerdeki AgNOR'ların yapı ve büyülükleri, yani gümüş-pozitif lekelerin büyülüklük ve sayıları, sadece ribozom biyogenezisinin aktivite düzeyi hakkında bilgi verebilir. Çok hücre, yüksek oranda ribozoma ihtiyaçları olmasına rağmen yavaş bölünür veya hiç bölünmezler (örneğin; sinir ve bez epitel hücreleri). Bu hücrelerin gümüş-pozitif materyali de kapsayan çekirdekçikleri, ribozom miktarındaki artışı paralel olarak son derece irileşir ve sayıları da artar. Diğer bir örnek ise bölünmeleri engellenen uyarılmış lenfositlerdir. 2-Gümüş-pozitif proteinler rRNA genlerinden farklı ya da inaktif, yani transkripte edilmeyen genlere de bağlı olabilirler. Bu duruma rRNA genleri içermeyen MN'ler, uyarılmamış lenfositlerdeki gümüş-pozitif *nükleoluslar* ve mitoz sırasında kromozomlara tutunan gümüş-pozitif nükleolar materyal örnek verilebilir. Bunun da ötesinde sadece malignant ve hızlı çoğalan hücreler yanında malignant olmayan, normal çoğalan hücreler de benzer çekirdekçik irileşmeleri ve gümüş-pozitif nükleer materyal artışı sergileyebilirler. Bu yüzden gümüşleme yöntemiyle boyanan preparatlardaki çekirdekçik morfolojisinin yorumlanmasıının dikkatle yapılması gerekmektedir. Bu yapıldığı takdirde iyi bilinen hücre popülasyonları ya da tümörlerde gümüşleme boyaması; çekirdekçiklerin morfolojisi, büyülüğu ve sayılarının incelenmesinde oldukça yararlı bir yardımcı bir metottur (Aydın 2004). AgNOR bulgularının MN frekansındaki değişikliklerle birlikte dikkate alınması sonuçların güvenilirliğini artırabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K and Watson JD. 1989. Molecular Biology of the Cell. 355-362, Garland Publishing. Newyork. London.
2. Arden KC., Johnston DA., Cork A and Pathak S 1989. Differential Nucleolus Organizer Activity in Normal and Leukemic Bone Marrow. Am. J. of Hematology, 30:164-173.
3. Aydin MF. 2004. Yumurta ve Et Tavuklarının Farklı Dokularında Gümüşleme Metoduyla Boyanan Nükleolus Organizer (AgNOR) Bölgelerin Dağılımının Belirlenmesi. Doktora Tezi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
4. Barrera JE, Ai H, Pan Z, Meyers AD, Varella-Garcia M. 1998. Malignancy detection by molecular cytogenetics in clinically normal mucosa adjacent to head and neck tumors. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 124:847-51.
5. Belowska J, Fraczek A, Ral M. 2004. Preliminary study on the frequency of micronuclei in buccal mucosa cells sampled from patients with tumors of the larynx [in Polish]. Prezgl Lek 61:248-50.
6. Benner SE, Wargovich MJ, Lippman SM, et al. 1994. Reduction in oral mucosa micronuclei frequency following α -tocopherol treatment in oral leukoplakia. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 3:73-6.
7. Besarati Nia A, Van Straaten HWM, Godschalk RWL, et al. 2000. Immunoperoxidase detection of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in mouth floor and buccal mucosa cells of smokers and nonsmokers. Environ Mol Mutagen 36:127-33.
8. Bonassi S., Fenech M., Cecilia L, et al. 2001. 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. 37:31-455.
9. Bolognesi C., Lando C., Forni A., Landini E., Scarpato R., Migliore L and Bonassi S. 1999. Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes 5:393-397.
10. Boon ME, Schleicher A., Wijsman-Grootendorst A., Lyon H and Kok LP. 1988. Staining of the Nucleolus with Protein and RNA stains for Automatic Measurement of Nucleolar Size in Paraffin Sections. Stain Tech. 63(5):289-297.
11. Bülbül Dilek, Bakır G., Çamlıbel S. 1993. Preoperatif Kemoterapi Uygulanan Meme Karsinomlu Hastaların Biyopsi ve Mastektomi Materyallerindeki AgNOR Sayılarının Karşılaştırılması. Ankara Patoloji Bülteni 10(1) : 55-57.
12. Broberg K, Bjork J, Paulsson K, Hoglund M, Albin M. 2005. Constitutional short telomeres are strong genetic susceptibility markers for bladder cancer. Carcinogenesis 26:1263-71.
13. Cancado RP., Yurgel LS., Sant'Anna M. 2001. Evaluation of the nucleolar organiser region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa. Effect of smoking. Oral Oncology 7(5) : 446-454.
14. Cancado, RP., Yurgel LS., Filho M. Sant'A. 2004. Comparative Analyses Between the Smoking Habit Frequency and the Nucleolar Organizer Region Associated Proteins in Exfoliative Cytology of Smokers' Normal Buccal Mucosa. Tobacco Induced Diseases Vol. 1:43-49.
15. Canet V., Montmasson MP., Usson Y., Giroud F., Brugal G. 2001 Correlation between silver-stained nucleolar organiser region area and cell cycle time. Cytometry, 43:110-11611.
16. Countryman RI., Heedle JA. 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. Mutat. Res., 41:321-332.
17. Çavuşoğlu K, Yapar K. ve Yalçın E. 2008. Sigara İçenlerde Yanak Mukozası Epitel Hücrelerindeki Toksisitenin Belirlenmesi. Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 1(2):26-29.
18. DeMarini MD. 2004. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. Mutat Res. 74:447-567.
19. Derenzini M., Pession A., Farabegoli F., Trete D., Badiali M. and Dehan P. 1989. Relationship Between Interphasic Nucleolar Organizer Regions and Growth Rate in Two Neuroblastoma Cell Lines. Am. J. Path. 134(4):925-932.
20. Duchrot P. 1990. Etude des organisateurs nucleolaires (AgNOR) dans les tumeurs melanocytaires benignes, dysplasiques et malignes. Reims, France: Université de Reims Champagne-Ardenne. Thesis, 203.

21. El Ahmer OR, Essery SD, Saadia AT, et al. 1996. The effect of cigarette smoke on adherence of respiratory pathogens to buccal epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 23:27–36.
22. Elavarosi D., Ramakrishnan V., Subramemam R.H., Cherian KM. and Emanuel C. 2002. Chemotoxicity study in lymphocytes of markers in wooden furniture industry. *Current sience*. 82(7):68 – 87.
23. Elahi A, Zhong Z, Park J, Eyring K, McCaffery T, Lazarus P. 2002. The human OGG1 DNA repair enzyme and its association with orolaryngeal cancer risk. *Carcinogenesis* 23:1229–34.
24. Elahi A, Bendaly J, Zheng Z, et al. 2003. Detection of UGT1A10 polymorphisms and their association with orolaryngeal carcinoma risk. *Cancer* 98:872–80.
25. Ellinger A. and Wachtler F. 1980. Über eine Methode zur Darstellung des Nucleolus im Licht- und Electronmikroskop, *Mikroskopie* 36, 330-335.
26. Fenech M., Crott J., Turner J. and Brown S. 1999. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis* 14(6):605–612.
27. Fenech M., Chang W.P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S., Zeiger E. 2003. Human Micronucleus Project. HUMN Project : Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis – block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* 534(1-2):65-75.
28. Fenech M., Bolognesi C., Kirsch M., Bonassi S., Zeiger E., Knasmu S. and Holland N. 2007. Harmonisation Of The Micronucleus Assay In Human Buccal Cells a Human Micronucleus (Humn) Project (www.humn.org) Initiative Commencing in. 10:1056-1093.
30. Garcia-Moreno LM., Conejo NM., Pardo HG., Gomez M., Martin FR., Alonso MJ., Arias JL. 2001. Hippocampal AgNOR activity after chronic alcohol consumption and alcohol deprivation in rats. *Physiol and Behav*, 72 (1-2):115-121.
31. Godoy APR., Godoy MR., Meissner C., Oehmichen M. 2001. Proliferative activity of epidermal basal cells after wounding - AgNOR counts compared with bromodeoxyuridine reactivity in rats. *Experimental And Toxicologic Pathology*, 53 (1):65-69.
32. Gordon AE, El Ahmer OR, Chan R, et al. 2002. Why is smoking a risk factor for sudden infant death syndrome? *Child Care Health Dev* 28:23–5.
33. Goodpasture C., Bloom SE., Hsu TC. and Arrighi FE. 1976. Human Nucleolus Organizers: The Satellites or the Stalks? *Am. J. Hum. Genet.* 28 : 559-566.
34. Giri DD., Nottingham JF., Lawry J., Dundas SAC and Underwood JCE 1989. Silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in benign and malignant breast lesions: correlations with ploidy and growth phase by DNA flow cytometry. *Journal of Pathology*, 157:307-313.
35. Hara T., Sato T., Mori S., Shirai H., Maruo Y. ve Minagi S. 2000. Argyrophilic nucleolar organiser regions (AgNOR) in mucosal epithelium under experimental denture bases in rats. *J Oral Pathol.* 29:33-38.
36. Henderson AS., Warburton D. and Atwood KC. 1973. Ribosomal DNA Connectives between Human Acrocentric Chromosomes. *Nature*, 245(14) : 95-97.
37. Hoyo E., Kanitakis J., Euvrard S. and Thivolet J. 1993. Proliferation characteristic of cutaneous squamous cell carcinomas developing in organ graft recipients. *Arch Dermatol.* 129:324-327.
38. Hubbell HR. and Hsu TC. 1977. Identification nucleolus organizer regions (NOR) in normal and neoplastic human cells by the silver staining technique. *Cytogenet Cell Genet*, 19:185-196.
39. Hsu TM, Zhang YJ, Stantella R. 1997. Immunoperoxidase quantitation of 4-aminobiphenyl- and polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in exfoliated oral and urothelial cells of smokers and nonsmokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6:193–9.
40. Jordan EG. 1979. The nucleolus at Weimar, *Nature*, 281:529-530.
41. Joseph L.J., Patwardhan UN. and Samuel AM. 2004. Frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes from subjects occupationally exposed to low levels of ionizing radiation 564:83-88.
42. Kanitakis J., Hoyo E., Hermier C., Chouvet B. and Thivolet J. 1992. Nucleolar organiser region (AgNOR) enumeration in keratoacanthomas and squamous cell carcinomas of the skin. *Cancer* 69:2937-2941.
43. Khanna A., Dutta J. 2002. Effect of enrofloxacin on AgNOR counts in chick bone marrow nuclei. *Indian J Exp Biol*, 40(3):345-348.

44. Kodousek R., Dusek J. 1991. Demonstration of the nucleolar organiser region by silver staining (AgNOR method) in research and in histopathological practice. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med.* 131:9-37.
45. Konopacka M. 2003. Effect of smoking and aging on micronucleus frequencies in human exfoliated buccal cells. *Neoplasma* 50 :380-2.
46. Koppikar P, deVilliers E-M, Mulherkar R. 2005. Identification of human papillomaviruses in tumors of the oral cavity in an Indian community. *Int J Cancer* 113:946-50.
47. Leek RD., Alison MR. and Sarraf CE. 1991. Variations in the occurrence of silver-staining nucleolar organizer regions (AgNORs) in non-proliferating and proliferating tissues. *J Pathol.* 165(1):43-51.
48. Levario-Carrillo M., Sordo M., Rocha F., Gonzalez-Horta C., Amato, D., Ostrosky-Wegman P. 2005. Micronucleus frequency in human umbilical cord lymphocytes. *Mutat Res.* 586(1):68-75.
49. Lewiska D., Palus j., Stdpnik M., Dziubaitowska E., Beck J., Rydzyski K., Natarajan A.T. and Nilsson R. 2007. Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and buccal mucosa cells of copper smelter workers, with special regard to arsenic exposure, *Int Arch Occup Environ Health*, 80:371-380.
50. Li N, Sun Z, Han C, Chen J. 1999. The chemopreventive effects of tea on human oral precancerous mucosa lesions. *Proc Soc Exp Biol Med* 220:218-24.
51. Liede KE, Alfthan G, Hietanen JHP, Haukka JK, Saxen LM, Heinonen OP. 1998. β -Carotene concentration in buccal mucosal cells with and without dysplastic oral leukoplakia after long term β -carotene supplementation in male smokers. *Eur J Clin Nutr* 52:872-6.
52. Liu Y, Egyhazi S, Hansson J, Bhide SV, Kulkarni PS, Grafstrom RC. 1997. O^6 -methylguanine-DNA methyltransferase activity in human buccal mucosal tissue and cell cultures. Complex mixtures related to habitual use of tobacco and betel quid inhibit the activity *in vitro*. *Carcinogenesis* 18:1889-95.
53. Manuelidis L. 1984. Active nucleolus organiser regions are precisely positioned in adult central nervous system cell but not in neuroectodermal tumour cells. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 43(3):225-241.
54. Martínez V., Creusa A., Venegabs W., Arroyoc A., Beckd JP., Gebele TW., Surrallés J. and Marcosa R. 2005. Micronuclei assessment in buccal cells of people environmentally exposed to arsenic in northern Chile. 155(2):319-327.
55. Mateus RP. and Taboga SR. 2001. Long-term starvation effects on *Mus musculus* hepatocyte nuclear phenotypes. *Caryologia*, 54 (1):73-81.
56. Merot Y., Durgnati A. and Frenk E. 1990. Nucleolar Organiser Regions in fibrohistiocytic tumours of the skin. *J Cutan Pathol.* 17:122-126.
57. Montero R, Serrano L, Davila V. 2003. Metabolic polymorphisms and the micronucleus frequency in buccal epithelium of adolescents living in an urban environment. *Environ Mol Mutagen* 42:216-22.
58. Moore LE, Wiencke JK, Bates MN, Zheng S, Rey OA, Smith AH. 2004. Investigation of genetic polymorphisms and smoking in a bladder cancer case-control study in Argentina. *Cancer Lett* 211:199-207.
59. Morabia A, Bernstein MS, Bouchardy I, Kurtz J, Morris MA. 2000. Breast cancer and active and passive smoking: the role of the *N*-acetyltransferase 2 genotype. *Am J Epidemiol* 152:226-32.
60. Munoz N, Hayashi M, Bang LJ, Wahrendorf J, Crespi M, Bosch FX. 1987. Effect of riboflavin, retinol and zinc on micronuclei of buccal mucosa and of esophagus: a randomized double-blind intervention study in China. *J Natl Cancer Inst* 79:687-91.
61. Mikelsaar AV., Schmid M., Krone W., Schwarzacher HG. and Schnedl W. 1977. Frequency of Ag-Stained Nucleolus Organizer Regions in the Acrocentric Chromosomes of Man. *Hum Genet*, 37:73-77.
62. Neri M., Ceppi M., Knudsen EL., Merlo FD., Barale R., Puntoni R. and Bonassi S. 2005. Baseline Micronuclei Frequency in Children: Estimates From Meta and Pooled Analyses. *Environ Health Perspect*, 113(9):1226-1229.
63. Nicole K. Proia., Geraldine M. 2006. Paszkiewicz, Maureen A. Sullivan Nasca, Gail E. Franke, and John L. Pauly. Smoking and Smokeless Tobacco-Associated Human Buccal Cell Mutations and Their Association with Oral Cancer 15(6):1061-1077.

64. Niederman MS, Rafferty TD, Sasaki CT, Merrill WW, Matthay RA, Reynolds HY. 1983. Comparison of bacterial adherence to ciliated and squamous epithelial cells obtained from the human respiratory tract. *Am Rev Respir Dis* 127:85–90.
65. Oßwald K, Mittas A, Glei M, Pool-Zobel BL. 2003. New revival of an old biomarker: characterization of buccal cells and determination of genetic damage in the isolated fraction of viable leucocytes. *Mutat Res* 544:321–9.
66. Orellana-Bustos AI, Espinoza-Santander IL, Franco-Martinez E, Lobos-James-Freyre N, Ortega-Pinto AV. 2004. Evaluation of keratinization and AgNORs count in exfoliative cytology of normal oral mucosa from smokers and non-smokers. *Med Oral* 9:197–203.
67. Orrea SC, Tomasi VH, Schwint AE, Itoiz ME. 2001. Modified silver staining of nucleolar organiser regions to improve the accuracy of image analysis. *Biotechnic & Histochemistry*, 276 (2):67-73.
68. Pathak S. 1979. Cytogenetic Research Techniques in Humans and Laboratory Animals that can be Applied most Profitably to Livestock. *J.Dairy Sci*, 62:836-843.
69. Paiva RL, Sant'Ana Filho M, Bohrer PL, Lauxen Ida S, Rados PV. 2004. AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol. A cytopathologic study. *Anal Quant Cytol Histol*, 26:175-80.
70. Piatti G, Gazzola T, Allegra L. 1997. Bacterial adherence in smokers and non-smokers. *Pharm Res* 36:481–4.
71. Pischinger A. 1926. Die Lage des isoelektrischen Punktes histologischer Elemente als Ursache ihrer verschiedenen Färbbarkeit, *Z Zellforsch Mikrosk Anat*, 3:167-197.
72. Piyathilake CJ, Macaluso M, Hine RJ, Vinter DW, Richards EW, Krundieck CL. 1995. Cigarette smoking, intracellular vitamin deficiency, and occurrence of micronuclei in epithelial cells of the buccal mucosa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4:751–8.
73. Phillips DH. 2002. Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues. *Carcinogenesis* 23:1979–2004.
74. Raska I., Rychter Z. and Smetana K. 1983. Fibrillar centres and condensed nucleolar chromatin in resting and stimulated human lymphocytes. *Z Mikrosk Anat Leipzig*, 97(1):15-32.
75. Reeves BR., Casey G. and Harris H. 1982. Variations in the activity of nucleolar organisers in different tissues, demonstrated by silver staining of human normal and leukaemic cells. *Cancer Genet Cytogenet*, 6:223-230.
76. Remmerbach TW., Weidenbach H., Müller C., Hemprich A., Pomjanski N., Buckstegge B. 2003. Diagnostic value of nucleolar organizer regions (AgNORs) in brush biopsies of suspicious lesions of the oral cavity. *Anal Cell Pathol*, 25:139-46.
77. Romano G, Mancini R, Fedele P, et al. 1997. Immunohistochemical analysis of 4-aminobiphenyl-DNA adducts in oral mucosa cells of smokers and nonsmokers. *Anticancer Res* 17:2827–30.
78. Romano G, Sgambato A, Boninsegna AG, et al. 1999. Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in exfoliated oral cells by an immunohistochemical assay. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8:91–6.
79. Rosa J., Mehta A. and Filipe MI. 1990. Nucleolar Organiser regions in gastric carcinoma and its precursor stages. *Histopathology*, 16:265-269.
80. Rojas E, Valverde M, Sordo M, Ostrosky-Wegman P. 1996. DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* 370:115–20.
81. Ruzicka V. 1989. Zur Geschichte und Kenntnis der feineren Struktur der Nucleolen centraler Nervenzellen. *Anat Anz*, 16:557-563.
82. Sarto F, Finotto S, Giacomelli L, Mazzotti D, Tomanin R, Levis AG. 1987. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis* 2:11–7.
83. Sato S. and Temita I. 2001. Short-term screening method for the prediction of carcinogenicity of chemical substances: current status and problems of an in vivo rodent micronucleus assay. *Journal of Health science*, 47(1):1–8.
84. Savage R.K. 2000. Micronuclei: Pitfalls and problems *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.* http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Deep/Micronuclei_ID20016.html.
85. Schwarzscher HG. and Wachtler F. 1993. The Nucleolus. *Anat Embryol*, 188:515-536.
86. Schwint AE., Gomez E., Itoiz ME. and Cabrini RL. 1992. Nucleolar organiser regions as markers of incipient cellular alterations in squamous epithelium. *J Dent Res*, 72(8):1233-1236.

87. Severgnini M., Ferraris ME., Carranza M. 2002. Nucleolar organiser regions (NORs) evaluation of lingual salivary glands of chronic alcoholics. *J Oral Pathology and Medicine*, 31(10):585-589.
88. Smith R. and Crocker J. 1988. Evaluation of nucleolar region-associated proteins in breast malignancy. *Histopathology*, 12:113-125.
89. Suarez V., Newman J., Hiley C., Crocker J. and Collins M. 1989. The Value of NOR Numbers in Neoplastic and Non-neoplastic Epithelium of the Stomach. *Histopathology*, 14 : 61-66.
90. Su MH. and Delany ME. 1998. Ribosomal RNA gene copy number and nucleolar size polymorphisms within and among chicken lines selected for enhanced growth. *Poult Sci*, 77(12):1748-1754.
91. Suhas S, Ganapathy KS, Gayatri Devi M, Ramesh C. 2004. Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high risk group for oral cancer. *Mutat Res* 651:15–21.
92. Stone J, Jones N, McGregor A, Waters R. 1995. Development of a human biomonitoring assay using buccal mucosa: comparison of smoking-related DNA adducts in mucosa versus biopsies. *Cancer Res* 55:1267–70.
93. Stich HF, Rosin P. 1983. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *Int J Cancer* 31:305–8.
94. Stich HF, Dunn BP. 1988. DNA adducts, micronuclei and leukoplakias as intermediate endpoints in intervention trials. *IARC Sci Publ* 89:137–45.
95. Spivack SD, Hurteau GJ, Jain R, et al. 2004. Gene-environment interaction signatures by quantitative mRNA profiling in exfoliated buccal mucosal cells. *Cancer Res* 64:6805–13.
96. Sweeney C, Farrow DC, Schwartz SM, Eaton DL, Checkoway H, Vaughan TL. 2000. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms as risk factors for renal cell carcinoma: a case control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:449–54.
97. Trent JM., Carlin DA. and Davies JR. 1981. Expression of silver stained nucleolar organising regions (ag-nors) in human cancer. *Cytogenet Cell Genet*, 32:31-38.
98. Usta U., Berberoğlu U., Helvacı E., Altaner Ş., Süt N. and Özdemir Ç. 2008. Evaluation of Cytological Alteration in Normal-Appearing Oral Mucosal Epithelia of Smokers and Non-Smokers Via AgNOR Counts and Nuclear Morphometry, 25(2):110-116.
99. Vanhauwaert A., Vanparry P., Kirsch-Volders M. 2001. The in vivo gut micronucleus test detects clastogens and aneugens given by gavage mutagenesis, 16(1):39-50.
100. Zaczek M., Maciejowski J., Gil K., Szot W., Chlap Z. 1992. Silver-binding nucleolar organiser regions (AgNORs) in the normal epithelium of different parts of the digestive tract in rats. *Acta Pathol Jpn*, 42(8):573-8.
101. Zhang Y, Hsu TM, Santella R. 1995. Immunoperoxidase detection of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in oral mucosa cells of smokers and nonsmokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4:133–8.
102. Zhang Y, Chen SY, Hsu T, Santella R. 2002. Immunohistochemical detection of malondialdehyde-DNA adducts in human oral mucosa cells. *Carcinogenesis* 23:207–11.
103. Wachtler F., Hopman AHN., Wiegant J. and Schwarzacher HG. 1986. On the position of nucleolus organiser regions (nors) in interphase Nuclei. *Exp Cell Res*, 167 : 227-240.
104. Wolf T. and Luerke NP. 1997. Formation of Micronuclei in Incubated Hen's Eggs as a Measure of Genotoxicity. *Mutat. Res*, 394:163-175.
105. Wu PA., Loh CH., Hsieh LL., Liu TY., Chen CJ., Liou SH. 2004. Clastogenic effect for cigarette smoking but not areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosa cells. *Mutat Res*, 562:27–38.
106. Wrubel JW, Scopp IW. 1961. A study of the exfoliative cytology of the hard palate and buccal mucosa following cessation of smoking in previous smokers. *J Dent Res* 40:341–5.

8. EKLER

EK. A: BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAY FORMU

Aşağıdaki konularda hastaya gerekli tüm bilgiler verilmelidir. Hazırlanacak olan HASTA ONAY FORMUNUZ ayrıntılı olarak aşağıdaki sıralamaya ve çalışmanızın niteliğine uygun bir şekilde hazırlanarak çalışma dosyanıza konulacaktır.

- a- Araştırmmanın amacı, gerekçesi, uygulanacak yöntemler, yararlar, varsa riskler ve araştırma ile ilgili her türlü bilgi,
 - b- Yerleşmiş standart alternatif tedaviler,
 - c- Araştırma süresi,
 - d- Yapılacak tetkik ve tahlillerin hastaya herhangi bir mali yük getirmeyeceği bilgisi,
 - e- Kimliğin gizli tutulacağı ancak bilgiler ve bulguların kullanılabileceği,
 - f- Sağlık Bakanlığından izin alınması gerekli olan yeni ilaç araştırmaları için oluşabilecek zararların tazmin şekli,
 - g- Araştırmada yer alacak gönüllü sayısı,
 - h- Çalışma süreci içinde herhangi bir nedenle başvurulacak doktorun, adı-soyadı, telefon numarası,
 - i- Araştırıcının hangi koşullarda gönüllüyü araştırma dışı bırakabileceğini,
 - j- Gönüllünün katılmayı reddetme veya herhangi bir zamanda ayrılma/vazgeçme hakkına sahip olduğu,
 - j- Gebelikle ilgili çalışmalarda eşin onayının alınması,
-

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu Klinik Araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Tarih

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

Gönüllünün Adı soyadı, İmzası, Adresi (varsayı telefon/faks no.):

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasının:

Adı soyadı, imzası (varsayı telefon/faks no.):

Açıklamaları yapan araştırcının Adı soyadı, İmzası:

Sağlık Memuru Ferhat Doğan

Herhangi bir nedenle başvurulacak doktorun Adı soyadı, İmzası (varsayı telefon/faks no.)

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kişinin.

Adı soyadı, İmzası, Görevi:

EK. B: GÖNÜLLÜLERE UYGULANAN ANKET FORMU

1. Aşağıdaki hangi yaş grubundasınız?

- a) 35 - 45
- b) 46 - 55
- c) 55 ve üzeri

2. Mesleğiniz nedir?

.....

3. Hayatınızın herhangi bir evresinde kanser teşhisi konuldu mu?

- a) Evet.....
- b) Hayır

5. Diş fırçalama sikliğiniz nedir?

- a) Günde 1-3 defa
- b) Haftada birkaç defa
- c) Ayda birkaç defa

6) Kaç yıldır sigara kullanıyorsunuz?

- a) 5 – 10
- b) 11 – 20
- c) 21 ve üzeri

7) Günlük tükettiğiniz çay miktarı ne kadar?

- a) 1 - 10
- b) 11 - 20
- c) 20 ve üzeri

KATILDIĞINIZ İÇİN TEŞEKKÜR EDERİM