



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜRKİYE'DE SİGARA KULLANAN GENÇ BİREYLERİN  
BUKKAL HÜCRELERİNDE GENOTOKSİK HASARIN  
MİKROÇEKİRDEK YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ:  
PROSPEKTİF RANDOMİZE KONTROLLÜ ÇALIŞMA**

Güls Cansu DÖKMECİ  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Yrd. Doç. Ayfer BECEREN

İSTANBUL - 2017

## TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Programın seviyesi : Yüksek Lisans  
Anabilim Dalı : Farmasotik Toksikoloji Anabilim Dalı  
Tez Sahibi : Gülis Cansu Dökmeci  
Tez Başlığı : Türkiye'de Sigara Kullanan Genç Bireylerin Bukkal Hücrelerinde  
Genotoksik Hasarın Mikroçekirdek Yöntemi ile Belirlenmesi: Prospektif Randomize  
Kontrollü Çalışma  
Sınav Yeri : Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Haydarpaşa Kampüsü  
Sınav Tarihi : 08/12/2017

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

### Danışman

Yrd.Doç.Dr.Ayfer BECEREN

### Kurumu

Marmara Üniversitesi Eczacılık  
Fakültesi, Toksikoloji Anabilim Dalı

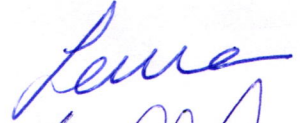
### İmza



### Sınav Jüri Üyeleri

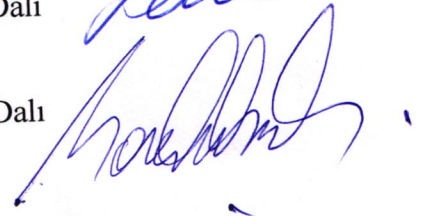
Prof. Dr. Semra ŞARDAŞ

Marmara Üniversitesi Eczacılık  
Fakültesi, Toksikoloji Anabilim Dalı



Doç. Dr. Gonca ÇAKMAK  
DEMİRCİGİL

Gazi Üniversitesi Eczacılık  
Fakültesi, Toksikoloji Anabilim Dalı



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 21./12./2017 tarih ve 24 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Göksel ŞENER  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

08.12.2017

G lis Cansu D KMEC 





Yüksek Lisans çalışması Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Komisyonu Başkanlığı (SAG-C-YLP-120917-0508) tarafından projelendirilmiştir.



## TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında değerli tecrübe ve bilgileriyle beni yönlendiren, hayatını eğitime adanmış Çok Değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Semra ŞARDAŞ'a

Bilgisiyle ve öğretme coşkusuyla her an yanımda olan Tez Danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayfer BECEREN'e,

Çalışmamda deney prosedürlerimin oturtulması aşamasında bana yardım ve desteğini esirgemeyen Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Sema BURGAZ ve Doç. Dr. Gonca ÇAKMAK DEMİRCİGİL'e,

Erasmus programı ile Almanya'ya gitmemde bana destek olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Gülden OMURTAG'a,

Bölümde bilimsel ve insani yardımlarını her zaman hissettiğim diğer hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Ayrıca bilimsel formasyonuma büyük katkıları bulunan Bonn Üniversitesinden Sayın Prof. Dr. Christa E. MÜLLER, Dr. rer. nat. Meryem KÖSE ve Dr. Elisabetta De FİLIPPO'a,

Daima yanımda olan ve beni her konuda destekleyen sevgili aileme,

Tez aşamamda gösterdiği sonsuz sabır, hoşgörü ve anlayış için sevgili Oğuz KIZILKAYA'ya,

*TEŞEKKÜR EDERİM.*

Gülis Cansu DÖKMECİ

# İÇİNDEKİLER

|                                                                                   |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>TEŞEKKÜR .....</b>                                                             | <b>i</b>   |
| <b>İÇİNDEKİLER .....</b>                                                          | <b>ii</b>  |
| <b>KISALTMALAR VE SİMGELER .....</b>                                              | <b>iv</b>  |
| <b>ŞEKİLLER LİSTESİ.....</b>                                                      | <b>vi</b>  |
| <b>TABLolar LİSTESİ.....</b>                                                      | <b>vii</b> |
| <b>1.ÖZET.....</b>                                                                | <b>1</b>   |
| <b>2.SUMMARY .....</b>                                                            | <b>2</b>   |
| <b>3.GİRİŞ ve AMAÇ .....</b>                                                      | <b>3</b>   |
| <b>4.GENEL BİLGİLER.....</b>                                                      | <b>6</b>   |
| 4.1.Sigara Hakkında Genel Bilgi .....                                             | 6          |
| 4.2.Sigara Kullanımı .....                                                        | 10         |
| 4.2.1.Dünya genelinde sigara kullanımı.....                                       | 10         |
| 4.2.2.Türkiye'de sigara kullanımı.....                                            | 15         |
| 4.2.3.Gençlerde sigara kullanımı .....                                            | 17         |
| 4.3.Sigaranın biyotransformasyonu .....                                           | 19         |
| 4.4.SigaraKullanımının Üst Solunum Yollarına Etkisi.....                          | 21         |
| 4.5.Sigara ve Akciğer Kanseri Arasındaki İlişki.....                              | 21         |
| 4.6.Biyogöstergeler .....                                                         | 23         |
| 4.6.1.DNA/Protein katımları .....                                                 | 25         |
| 4.7.Genotoksisite Testlerinin Moleküler Epidemiyoloji Çalışmalarındaki Yeri ..... | 26         |
| 4.8.Mikroçekirdek Testi .....                                                     | 32         |
| 4.8.1.Mikroçekirdek testi tarihsel gelişimi.....                                  | 33         |
| 4.8.2.Mikroçekirdek formasyonu .....                                              | 35         |
| 4.8.3.Bukkal mikroçekirdek .....                                                  | 40         |
| 4.8.3.1.Mikroçekirdekler ve Köprüler.....                                         | 43         |
| <b>5.GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>                                                     | <b>44</b>  |
| 5.1.Çalışma ve Kontrol Grupları.....                                              | 44         |
| 5.1.1.Çalışmaya dahil edilme kriterleri .....                                     | 45         |
| 5.1.2.Çalışmadan çıkarılma kriterleri.....                                        | 45         |
| 5.2.Yanak Epiteli Hücrelerinde Mikroçekirdek Yöntemi .....                        | 46         |
| 5.2.1.Deneklerden biyolojik materyallerin alınması .....                          | 46         |

|                                                     |           |
|-----------------------------------------------------|-----------|
| 5.2.2.Feulgen Boyasının Hazırlanması .....          | 47        |
| 5.2.3.Fast Green Boyasının Hazırlanması.....        | 48        |
| 5.2.4.Preparatların Hazırlanması ve Boyanması ..... | 48        |
| 5.3.Mikroskopik değerlendirme kriterleri .....      | 49        |
| 5.4.İstatiksel Analiz.....                          | 50        |
| <b>6.BULGULAR .....</b>                             | <b>51</b> |
| <b>7.TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>                    | <b>62</b> |
| <b>8.KAYNAKLAR .....</b>                            | <b>70</b> |
| <b>9.EKLER.....</b>                                 | <b>84</b> |
| 9.1.Anket Formu .....                               | 84        |
| 9.2.Etik Kurul Onayı .....                          | 86        |
| <b>10.ÖZGEÇMİŞ.....</b>                             | <b>87</b> |

## KISALTMALAR VE SİMGELER

**8-OHdG:** 8-hidroksil-2-deoksiguanozin

**BFB:** kırık-füzyon-kırık ( bridge-fusion-break)

**BM Cyt:** Bukkal epitelde mikroçekirdek sitom testi,

**CA:**Kromozomal Aberasyon (Chromosomal Aberration)

**CBMN:** Sitokinezi Bloke Edilmiş Mikroçekirdek (Cytokinesis Blocked Micronuclei)

**DM:** Double Minutes

**DNA:**Deoksiribonükleik asit

**DS:** Down sendromu

**DSB:** DNA çift zincir hasarı

**DSÖ:** Dünya Sağlık Örgütü

**EPA:** Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı

**GPA:** Glikoforin A (Glycophorin A)

**HBV:** Hepatit B Virüsü

**HCl:**Hidroklorik Asit

**HLA:** İnsan Lökosit Antijenleri (Human Leukocyte Antigen)

**Hp:***Helicobacter pylori*

**HPRT:**Hipoksantin Guanin Fosforibozil Transferaz

**HUMN:** İnsan mikroçekirdek projesi

**IARC:** Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (The International Agency for Research on Cancer),

**In vitro:** Hücre kültüründe yapılan çalışmalar

**In vivo:** Canlı organizmada yapılan çalışmalar

**IPCS:** Uluslararası Kimyasal Güvenlik Programı



**IWGT:** Uluslararası Genotoksisite Test Prosedürleri Standartları Çalıştayı

**KHAK:** Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

**KHOAK:** Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri

**MÇ:** Mikroçekirdek (Micronucleus)

**NBUD:** Nükleer tomurcuklanmalar

**NHEJ:** Non-homolog Uç Birleştirme Yolağı

**NNAL Gluc:** Glukuronidler

**NGO:** Sivil Toplum Örgütleri

**NNAL:** 4- (Metilnitrosamino) -1- (3-piridil)-1-Bütanol

**NPB:** Nükleoplasmik Köprüleri

**p53:** Tümör süpresör gen

**PAH:** Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar

**SCGE:** Tek Hücre Jel Elektrophorez-Alkali Comet (Single Cell Gel Electrophoresis)

**TCR:** T-hücre reseptörü

**TKÇS:** Tütün Kontrolü Çerçeve Sözleşmesi

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1. Nikotin .....                                                                                                                              | 6  |
| Şekil 2. Hoffmann analitleri, sigara dumanının buhar fazında bulunan uçucu karbonillerin ve hidrokarbonların yapıları .....                         | 8  |
| Şekil 3. Hoffmann analitleri, sigara dumanının partikülat fazında bulunan fenolik bileşiklerin önemli yapıları. ....                                | 8  |
| Şekil 4. Sigaraya bağlı ölümler (milyon) .....                                                                                                      | 14 |
| Şekil 5. Benzo[a]pirenin metabolik aktivasyonu .....                                                                                                | 20 |
| Şekil 6. Birleşik Krallık'ta Akciğer Kanseri Ölümleri Kümülatif Riski, 1990 oranları .....                                                          | 23 |
| Şekil 7. Biyogöstergeler .....                                                                                                                      | 27 |
| Şekil 8. Moleküler epidemiyolojinin kanser araştırmalarında sağladığı açılımlar. ...                                                                | 29 |
| Şekil 9. Genotoksik ajana maruz kalan hücredeki mikroçekirdek oluşumu.....                                                                          | 36 |
| Şekil 10. Asentrik fragman oluşumu .....                                                                                                            | 37 |
| Şekil 11. Bukkal epitelde mikroçekirdek sitom testi ile değerlendirme yapılan hücre çeşitleri .....                                                 | 42 |
| Şekil 12. Mikroçekirdek yöntemi ile Yanak epitel hücrelerinde değerlendirilen mikroçekirdeklerin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri .....        | 43 |
| Şekil 13. Mikroçekirdek yöntemi ile Yanak epitel hücrelerinde değerlendirilen köprülerin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri .....                | 43 |
| Şekil 14. Bukkal Epitel Hücrelerinde MÇ anomalileri.....                                                                                            | 49 |
| Şekil 15. Sigara kullanan ve kullanmayan gruplar arasındaki ortalama mikroçekirdek sayısı.....                                                      | 54 |
| Şekil 16. Sigara kullanımı paket/yıl oranı ile ifade edildiğinde mikroçekirdek sayısı arasındaki korelasyon.....                                    | 55 |
| Şekil 17. Çalışma grubundaki bireylerin yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek ve diğer çekirdek anomalilerinin mikroskobik görüntüler.....      | 60 |
| Şekil 18. Çalışma grubundaki bireylerin yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek ve diğer çekirdek anomalilerinin mikroskobik görüntüler(a-h)..... | 61 |

## TABLÖLAR LİSTESİ

|                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> Hoffman analitleri .....                                                                                                                 | 7  |
| <b>Tablo 2.</b> Günlük sigara tüketimi ile alındığı kanıtlanan akciğer karsinojenleri .....                                                              | 9  |
| <b>Tablo 3.</b> 2000 Yılında 15 Yaş ve Üzeri Tahmini Sigara İçme Sıklığı (Cinsiyete Göre) ve Sigara İçen Sayısı .....                                    | 12 |
| <b>Tablo 4.</b> Bireylerin cinsiyet ve yaşa göre tütün mamulü kullanma yüzdelerinin yıllara göre dağılımı TÜİK verileri .....                            | 16 |
| <b>Tablo 5.</b> Türkiye de ki 15 yaş ve üzeri Bireylerin tütün mamulü kullanmaya başlama nedenlerinin cinsiyete göre dağılımı TÜİK verileri .....        | 18 |
| <b>Tablo 6.</b> DNA hasarının tespitinde kullanılan biyogöstergeler .....                                                                                | 29 |
| <b>Tablo 7.</b> Çalışmada oluşturulan grupların sigara kullanımı ve cinsiyet bakımından dağılımı .....                                                   | 44 |
| <b>Tablo 8.</b> Bireylerin genel özellikleri.....                                                                                                        | 51 |
| <b>Tablo 9.</b> Deney ve kontrol gruplarındaki bireylerin ortalama bukkal epitel hücre mikroçekirdek sayısı. ....                                        | 52 |
| <b>Tablo 10.</b> Deney ve kontrol gruplarındaki bireylerin cinsiyete göre ortalama bukkal epitel hücre mikroçekirdek sayılarının karşılaştırılması. .... | 53 |
| <b>Tablo 11.</b> Sigara içen bireylerin cinsiyete göre ortalama bukkal epitel hücre mikroçekirdek sayılarının karşılaştırılması. ....                    | 53 |
| <b>Tablo 12.</b> Deney ve kontrol grubuna ait bulguların dökümü. ....                                                                                    | 56 |

## 1. ÖZET

### **Türkiye'de Sigara Kullanan Genç Bireylerin Bukkal Hücrelerinde Genotoksik Hasarın Mikroçekirdek Yöntemi ile Belirlenmesi: Prospektif Randomize Kontrollü Çalışma**

Güls Cansu Dökmeci

Danışman: Ayfer Beceren

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

**Amaç:**Genç nüfusun sigara bağımlılığı gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde halk sağlığını etkileyen faktörlerin başında gelmektedir. Sigara kullanımı özellikle akciğer ve baş boyun kanserlerine neden olmaktadır. Dolayısı ile mevcut araştırmalar ağız mukoza hücrelerinde tütün kullanımına bağlı kanserleşmeyi gösterebilecek girişimsel olmayan yöntemler üzerinde durmaktadır.Bu çalışmanın amacı sağlıklı sigara içicilerinin eksfoliye bukkal epitel hücrelerinde sigara kullanımının yarattığı muhtemel genotoksik hasarı gösterebilecek bir belirteç olan mikronukleus sıklığını araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:**Çalışmaya 18-25 yaş aralığında 25'i sigara içen 44'ü sigara içmeyen toplam 69 katılımcı dahil edildi. Katılımcılardan bukkal epitel hücreleri toplanıp lamlara yayıldı ve Feulgen tekniği ile boyandı. Her katılımcı için 3'er adet lam hazırlanıp her lamda 1000 hücre sayıldı ve hücrelerdeki ortalama mikronukleus sayısı hesaplandı.

**Bulgular:**Her 1000 hücrede ortalama mikronukleus sayısı sigara içenlerde ( $4,3 \pm 2,4$ ), içmeyenlerde ( $2,3 \pm 2,1$ ) olarak bulundu. Sonuçların sınırlı sayıda katılımcının değerlendirilmesi ile elde edilmesine rağmen, hücrelerdeki mikronukleus düzeyleri sigara içen/içmeyen ve sigara içen erkek/içmeyen erkek grupları arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulundu ( $p < 0,001$ ). Sonuç olarak hücrelerdeki mikronukleus formasyonunun sigara kullanımına bağlı genotoksisiteyi öngörebileceğini düşünmekteyiz. Çalışmanın devamında da daha fazla katılımcının değerlendirilmesinin edindiğimiz bu sonuçları destekleyeceğine inanmaktayız.

**Anahtar Sözcükler:** mikroçekirdek, genotoksisite, sigara

## 2. SUMMARY

### **Determination of Genotoxic Damage Due to Smoking in Buccal Cells of Young Individuals in Turkey by Microcereal Method: Prospective Randomized Controlled Study**

Gülis Cansu Dökmeci

Advisor: Ayfer Beceren

Department of Pharmaceutical Toxicology

**Purpose:** Smoking addiction among young people is the first issues affecting public health both in developed and in developing countries. Smoking is a major cause of cancer especially lung and head and neck cancer. Therefore, research has been focused on the search for new non-invasive methodologies able to predict malignant transformation of oral mucosa cells related to tobacco smoking. The aim of this study was to evaluate the possible genotoxic damage associated with tobacco smoke in healthy smoker individuals by analyzing the micronucleus frequency in exfoliated buccal epithelial cells.

**Materials and Methods:** The study comprises of 69 individuals in which 25 were smokers and 44 were non-smokers with an age range (18-25) years. Buccal cell samples were collected and then applied to clean microscope slides. Slides were stained by the Feulgen reaction technique.

**Results:** Three slides were prepared for each subject and 1000 cells were evaluated per slide to determine the frequencies of micronucleus. The mean micronucleus frequencies in smokers and control groups were  $(4,3 \pm 2,4)$ , and  $(2,3 \pm 2,1)$  in every 1000 cells count respectively. Although the results were obtained from a limited number of subjects, micronucleus frequencies in smoker subjects were higher than the control values with statistical significance both in smoker/non smoker and smoker male/non smoker male groups ( $p < 0,01$ ). In conclusion these results can show that micronucleus formation may predict the genotoxicity caused by smoking. Progression of the study with larger number of subjects will provide further support to this preliminary observation.

**Keywords:** micronucleus, genotoxicity, smoking

### 3. GİRİŞ ve AMAÇ

Tütün ürünleri arasında sigara kullanımı, dünyayı olumsuz yönde etkileyen halk sağlığı sorunlarının başında gelmektedir (Burns, 2003). Dünyada yaşı 15'in üzerinde olan 1.2 milyar kişi tütün bağımlısı olup bunların %80'i orta ve gelişmekte olan ülkelerdedir. Gelişmekte olan ülkelerde sigaraya başlama yaşı 12- 16'dır ve her gün dünyada 80.000-100.000 gencin tütün bağımlısı olduğu bildirilmektedir. 1999 yılında yapılan bir çalışmada, gelişmiş ülkelerde 13-15 yaşları arasındaki gençlerde sigara içme oranının %10-33 arasında değişmekte olduğu gösterilmiştir (Kaufman ve Yach 2000; Warren ve Riley 2000).

Kanser oluşumunda yaş, cinsiyet, alkol, genetik yatkınlık, zayıf diyet gibi çeşitli risk faktörleri rol oynamasına rağmen Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından bunlardan en önemlisinin tütün ürünlerinin kullanımı olduğu ve kanser insidansını daha fazla artırdığı bildirilmiştir (Parkin ve Pisani, 1999; Kuper ve Adami, 2002; IARC, 2004). IARC'nin yayınladığı monograflarda sigara dumanının içinde bulunan çeşitli kimyasal sınıflara ait 70'den fazla karsinojen madde olduğu raporlanmıştır (WHO. 2004).

Tütün dumanı, sistemik karsinojenlerin en uç örneğidir ve tütün tüketiminin diğer karsinojenlere kıyasla çok daha fazla organda kanser nedeni olduğu tespit edilmiştir. Tütün içinde bulunan maddelerin DNA hasarını indükleyerek akciğer, pankreas, mesane ve böbrek kanseri gibi birçok kansere sebep olmakla birlikte, epidemiyolojik çalışmalar sayesinde oral kanserlerin başlıca nedeni olduğu deney hayvanları ve insanlarda yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Pfeifer ve Denissenko. 2002; WHO 2004; Nanjappa ve Renuse, 2015; Sanner ve Grimsrud, 2015).

Sigara içme akciğer kanserinin başlıca nedenlerinden biri olarak kabul görmektedir. Tüm dünyada en sık görülen kanser olan akciğer kanseri kansere bağlı ölüm nedenlerinde sıralamada 2. sırada yer almaktadır (<http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/lung-cancer-statistics> Erişim tarihi: 27 Nisan 2017). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 2015 yılında global mortalite oranı 1.69 milyon vaka olarak kaydedilmiştir (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> Erişim Tarihi: 27 Nisan 2017). Ülkemizde akciğer kanseri görülme oranı Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı

Kurumu Kanser Daire Başkanlığı tarafından 2014 yılında 20 088 (% 30) olarak bildirilmiştir (<http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri/2106-2014-y%C4%B1l%C4%B1-t%C3%BCrkiye-kanser-istatistikleri.html> Erişim Tarihi: 27 Nisan 2017). Sigara kullanımı ile ilgili mevcut bilimsel araştırmalar sigara kullanımının solunum yolu ve hücrelerinde meydana getirdiği genotoksik hasar ve buna bağlı olarak kanserleşme mekanizmaları üzerinde yoğunlaşmaktadır.

Birçok genetik ve edinsel hastalığın tanı ve tedavisinin değerlendirilmesinde, izlenmesinde, çevresel kirleticiler, gıda katkı maddeleri gibi günlük yaşamda sıklıkla maruz kaldığımız çeşitli maddelerin genotoksik ve karsinojenik potansiyellerinin araştırılmasında genotoksisite testlerinden sıklıkla yararlanılmaktadır. Genotoksisite testleri, kanser riskinin değerlendirilmesi ve izlenmesinde kullanılan güvenilir moleküler biyogöstergelerdir. Ayrıca klinik öncesi ilaç güvenliliğinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır(Douglas ve Blakey, 1988; Fenech, 2002; Toubi ve Shoenfeld, 2007).

Maruziyetin gösterilmesinde, genotoksisite ile ilgili yapılan çalışmalarda biyogösterge olarak en çok tercih edilen yöntemlerden biri Mikroçekirdek (MÇ) tekniğidir. MÇ tekniği; farklı hücre tiplerinde kullanılabilen, ekstra kültür ortamına gerek olmayan, skorlanması oldukça basit ve pratik bir testtir. Klastojenik veya anöjenik ajanların genotoksik etkileri sonucu bölünme yeteneğine sahip tüm hücrelerde mitoz anomalileri ve kromozom kaybı gibi durumların ortaya çıkarılması, mikroçekirdek içeren hücre sayısındaki artış ile değerlendirilmektedir. Bu sebeple, MÇ tekniği kan hücrelerinde standart kromozomal aberasyon (CA) tekniği ile aynı hassasiyeti ve ilişkiyi gösterebilmektedir. Son yıllarda mikroçekirdek yöntemindeki yeni gelişmeler sayesinde yöntem ile birden çok son-nokta belirlenebilmektedir. Bu da karmaşık kanser oluşum prosesi açısından, ideal bir biyogöstergeden beklenen özelliklerin başında gelmektedir(Demirel ve Zamani, 2002; Toubi ve Shoenfeld, 2007).

Mitotik hücrelerde kromozom fragmanlarından ya da anafazda geç kalarak her iki kardeş çekirdeğe dahil olmayan kromozomlardan kaynaklanan mikroçekirdek, hücre çekirdeğinin dışında sitoplazmada yer alan çekirdek orijinli küçük küresel bir oluşumdur. Bu oluşumlar; genellikle kromozomal hasarlardan, hücre siklusunu

kontrol eden genlerdeki eksikliklerden, mitotik iğdeki hatalardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarında meydana gelen hasarlardan kaynaklanmaktadır. MÇ sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açmakta iken klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MÇ oluşumuna katkıda bulunmaktadırlar. Hücre döngüsü boyunca meydana gelen hasar nerede olursa olsun MÇ oluşumuna yol açmaktadır. Bu nedenle hücrelerde MÇ sayısında artış somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir(Fenech, 2006; Holland ve Bolognesi, 2008).DNA onarım yetersizliğinde genetik predispozisyon ya da herhangi bir maruziyetin yarattığı kromozomal veya hücresel değişikliklerin belirlenmesinde mikroçekirdek tekniği kullanılarak hücrelerin onarım yeteneği yani challenge tekniği yapılabilmektedir(Cebulska-Wasilewska, 2003).

Bireyler arasında genetik yatkınlık, çevresel faktörler ve yaşam tarzında farklılıklar bulunduğundan maruz kalınan kimyasalların oluşturduğu hasarın boyutu değişiklik göstermektedir. Toplumumuzda halk sağlığı ve ülke ekonomisi açısından önem taşıyan kanserin önlenmesi ve erken tanısının sağlanması için maruziyetin değerlendirilmesi önem taşımaktadır.

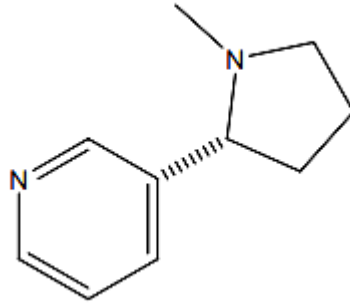
Bu amaçla da çalışmamızın hedeflerini temel olarak şu şekilde toplamak mümkündür; maruziyetin hassas bir biyogöstergesi olan mikroçekirdek tekniği kullanılarak 18-25 yaş arası sigara içen (>5adet/gün) ve içmeyen gençlerin bukkal hücrelerinde mikroçekirdek sıklığının değerlendirilmesi ve karşılaştırılması, kanser oluşumunda rol oynayan risk faktörlerinin mikroçekirdek sonuçları üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesinin yapılmasıdır.



## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1 Sigara Hakkında Genel Bilgi

Tütün bitkisi *Nicotiana tabacum* L., Christopher Columbus Amerika'yı ulaşmadan önceki tarihlerde dahi insanların yaygın kullanımı olan ticari bir üründü. Tütün kullananlarda bağımlılık oluşturan en önemli etken olan nikotin (Şekil 3), ilk kez *Nicotiana* türlerinden 1828 yılında izole edilmiştir. Farmakolojik etkileri ise 1898 yılına kadar aydınlatılamamıştır (Barceloux, 2012).



Şekil 1. Nikotin

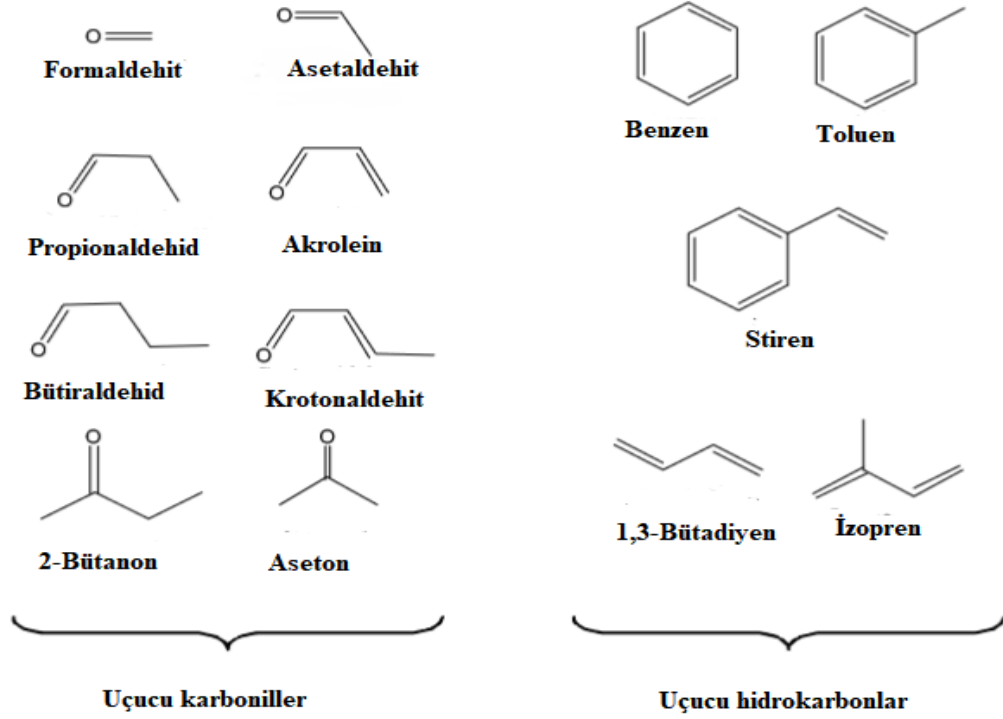
Tütünün en yaygın kullanım şekli sigara şeklinde içilmesidir. Bunun yanı sıra çiğneme tütün, pipo, nargile kullanarak içme gibi çeşitli kullanım şekilleri de vardır (Barceloux, 2012). Sigarada kullanılan tütün, *Nicotiana tabacum* L. (en sık Kuzey Amerika'da rastlanır) ve *Nicotiana rustica subgenera* bitki türlerinin işlenmiş ürünüdür. Diğer bitki türlerine benzer şekilde, kimyasal bileşenleri (şekerler, alkaloidler, N<sub>2</sub> ve selüloz), yaprak konumlandırması, toprak tipi ve besin seviyeleri gibi çevresel faktörlere bağlı olarak değişir. Nikotin, tütün bitkisinde doğal olarak bulunan bir alkaloiddir. Solanaceae familyasındaki birçok bitki güçlü bir nörotoksin olan nikotini içerir. Bununla birlikte, *Nicotiana tabacum* L. birçok bitkiden daha yüksek miktarda nikotin içerir (Tso, 1999).

Hoffmann 1990'larda "Hoffmann analitleri" olarak adlandırılan sigaranın içinde bulunan bileşiklerin raporunu yayınlamıştır (Hoffmann, 1997). Hoffmann analitleri Tablo 4'te özetlenmekte ve bu bileşiklerin bazılarının yapıları Şekil 4 ve 5'te verilmektedir (Hoffmann ve Hecht 1990; Hoffmann, 1997; Hoffmann ve Hoffmann

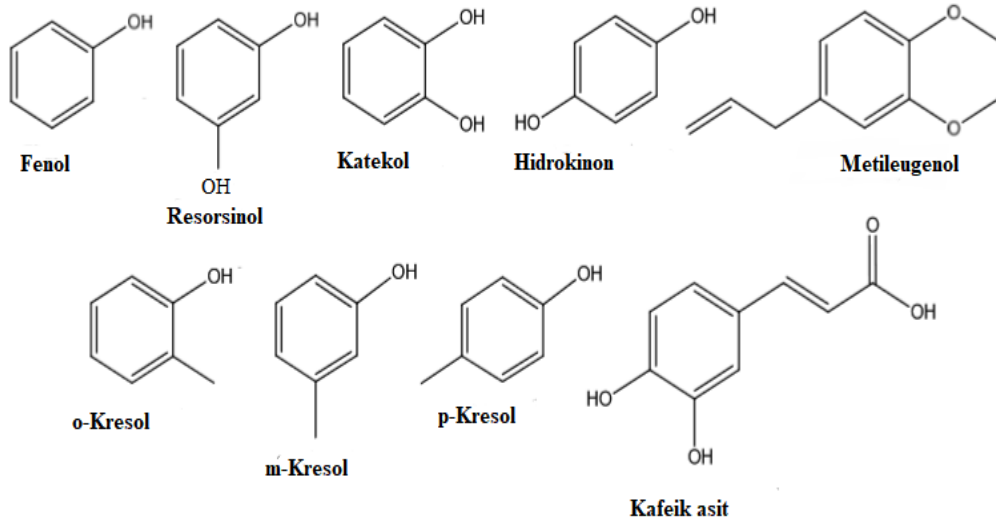
2001; Hoffmann ve Hoffmann, 2001; Rodgman ve Green, 2003; Rodgman ve Perfetti, 2009).

**Tablo 1.** Hoffman analitleri

| Grup                           | Hoffmann Analiti         | Grup                  | Hoffmann Analiti        | Grup                 | Hoffmann Analiti           |
|--------------------------------|--------------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|----------------------------|
| <b>Polisiklik</b>              | Benz[a]antrasen          | <b>N-Heterosiklik</b> | AaC                     | <b>Fenoller</b>      | Fenol                      |
| <b>aromatik</b>                | Benzo[b]floranten        | <b>Aminler</b>        | MeAaC                   |                      | m+p-o-Krezol               |
| <b>hidrokarbonlar</b>          | Benzo[j]floranten        |                       | Glu-P-1                 |                      | Katekol                    |
|                                | Benzo[k]floranten        |                       | Glu-P-2                 |                      | Rezorsinol                 |
|                                | Benzo[a]piren            |                       | PhIP                    |                      | Hydrokinon                 |
|                                | Krizen                   |                       | IQ                      |                      | Metilögenol                |
|                                | 5-Methyl-krizen          |                       | MeIQ                    |                      | Kafeik asit                |
|                                | Dibenz[a,h]antrasen      |                       | Trp-P-1                 | <b>Kloroaromatik</b> | DDT                        |
|                                | Dibenzo[a,e]piren        |                       | Trp-P-2                 | <b>Bileşikler</b>    | DDE                        |
|                                | Dibenzo[a,h]piren        | <b>Aldehitler ve</b>  | Formaldehit             |                      | Poliklorodibenzo-p-dioksin |
|                                | Dibenzo[a,i]piren        | <b>Ketonlar</b>       | Asetaldehit             |                      | Poliklorodibenzofuranlar   |
|                                | Dibenzo[a,l]piren        |                       | Propiyonaledhit         | <b>İnorganik</b>     | Hidrazin                   |
|                                | İndeno[1,2,3-cd]piren    |                       | Bütiraldehit            | <b>Bileşikler</b>    | Hidrojen sülfid            |
| <b>Aza-arenler</b>             | Piridin                  |                       | Krotonaldehit           |                      | Arsenik                    |
|                                | Kinolin                  |                       | Akrolein                |                      | Berilyum                   |
|                                | Dibenz[a,h]akridin       |                       | Aseton                  |                      | Kadmiyum                   |
|                                | Dibenz[a,j]akridin       |                       | 2-Bütanon               |                      | Krom (VI)                  |
|                                | 7H-Dibenzo[c,g]karbazol  | <b>Uçucu</b>          | 1,3-Bütadien            |                      | Kobalt                     |
| <b>N-Nitrözaminler</b>         | N-Nitrözodimetilamin     | <b>Hidrokarbonlar</b> | İzopren                 |                      | Nikel                      |
|                                | N-Nitrözodietilamin      |                       | Benzen                  |                      | Civa                       |
|                                | N-Nitrözodietilamin      |                       | Toluen                  |                      | Kurşun                     |
|                                | N-Nitrözodi-n-propilamin |                       | Stiren                  |                      | Polonyum-210               |
|                                | N-Nitrözodi-n-bütülin    | <b>Muhtelif</b>       | Asetamid                |                      | Selenyum                   |
|                                | N-Nitrözopirolidin       | <b>Organik</b>        | Akrilonitril            | <b>Ek</b>            | Nikotin                    |
|                                | N-Nitrözopiperidin       | <b>Bileşikler</b>     | Akrilamid               | <b>Bileşikler</b>    | Karbon monoksit            |
|                                | N-Nitrözodietanolamin    |                       | 1,1-Dimetil-hidrazin    |                      | Amonyak                    |
|                                | N-Nitrözosarkosin        |                       | Maleik hidrazid         |                      | Nitrojen oksit             |
|                                | N'-Nitrözonornikotin     |                       | Metanol                 |                      | Hidrojen siyanit           |
|                                | 4-(N-Metilnitrözamino)-  |                       | Metil izosiyanat        |                      |                            |
|                                | 1-(3-piridil)-1-bütanon  |                       | Nitrometan              |                      |                            |
|                                | N'-Nitrözooanabasin      |                       | 2-Nitropropan           |                      |                            |
|                                | N'-Nitrözooanatabin      |                       | Nitrobenzen             |                      |                            |
|                                | N-Nitrözomorfolin        |                       | Vinil klorid            |                      |                            |
| <b>Aromatic Amines Aniline</b> | Anilin                   |                       | Etil karbamat           |                      |                            |
|                                | 2-Toluidin               |                       | Etilen oksit            |                      |                            |
|                                | 2,6-Dimetil-anilin       |                       | Propilen oksit          |                      |                            |
|                                | 1-Naftilamin             |                       | Di(2-etilheksil)fitalat |                      |                            |
|                                | 2-Naftilamin             |                       | Furan                   |                      |                            |
|                                | 3-Amino-bifenil          |                       | Benzo[b]furan           |                      |                            |
|                                | 4-Amino-bifenil          |                       |                         |                      |                            |



**Şekil 2.** Hoffmann analitleri, sigara dumanının buhar fazında bulunan uçucu karbonillerin ve hidrokarbonların yapıları (Rodgman ve Green 2003).



**Şekil 3.** Hoffmann analitleri, sigara dumanının partikülata fazında bulunan fenolik bileşiklerin önemli yapıları.

Amerika Birleşik Devletleri'nde üretilen ortalama her bir sigara 8 - 14 mg nikotin içermektedir; günlük sigara içme koşullarında, sigara içen kişi sigara başına yaklaşık 1-2 mg nikotin absorbe etmektedir (Tablo 5) (Benowitz ve Henningfield, 1994).

**Tablo 2.** Günlük sigara tüketimi ile alındığı kanıtlanan akciğer karsinojenleri

| Karsinojen Grubu                   | Bileşik                                            | Miktar (ng/sigara) | Oran    |
|------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------|---------|
| Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar | Benzo[a]piren                                      | 20-40              | 2,5-3,5 |
|                                    | Benzo[b]florantan                                  | 4-22               |         |
|                                    | Benzo[f]florantan                                  | 6-21               |         |
|                                    | Benzo[k]florantan                                  | 6-12               |         |
|                                    | Dibenzo[a, i]piren                                 | 1,7-3,2            |         |
|                                    | Indeno[1,2,3-cd]piren                              | 4-20               |         |
|                                    | Dibenz[a,h]anthrasen                               | 4                  |         |
|                                    | 5-Metilkrizen                                      | 0,6                |         |
| Asaarenler                         | Dibenz[a,h]akridin                                 | 0,1                |         |
|                                    | 7H-Dibenzo[c,g]karbazol                            | 0,7                |         |
| N-Nitrözaminler                    | N-Nitrözodietilamin                                | TE-2,8             | <40     |
|                                    | 4-(Metilnitrözamino)-1-(3-piridil)-1-bütanon (NNK) | 80-770             | 1-4     |
| Çeşitli Organik Bileşikler         | 1-3 Bütadien                                       | 20-70x10 000       |         |
|                                    | Etil karbamat                                      | 20-38              |         |
| Metaller                           | Nikel                                              | 0-510              | 13-30   |
|                                    | Krom                                               | 0,2-500            |         |
|                                    | Kadmiyum                                           | 0-6670             | 7,2     |
|                                    | Polonyum 210                                       | 0,03-1 pCi         | 1-4     |
|                                    | Arsenik                                            | 0-1400             |         |
|                                    | Hidrazin                                           | 24-43              |         |

*TE : Tespit edilmedi*

Sıcak suda bekletilen 5-10 sigaradan ekstrakte edilen nikotini içeren sıvının lavman olarak uygulanmasının orta şiddette zehirlenmelere neden olduğu görülmüştür (Garcia-Estrada ve Fischman Charles, 1977). Çoğu tütün yutma vakası çocuklarda hiç semptom vermez veya hafif semptomlara neden olurken, 9 ve 10 aylık bebeklerin yediği rapor edilen iki Avrupa menşeli sigara olgusunda (nikotin içeriği bildirilmemiş) şiddetli zehirlenmeler (solunum güçlüğü, disritmiler, konvülsiyonlar) meydana geldiği bildirilmiştir (Malizia ve Andreucci, 1983). ABD'de 6 yaş altındaki 700 çocuk ile yapılan retrospektif çalışmada, <2 tam sigaradan veya <6 sigara izmariti oral alındığında toksisite olasılığı düşük bulunmuştur (Mcgee ve ark., 1995). Aynı çalışma, küçük çocuklar tarafından 7,5-15 g dumansız tütünün oral alınması halinde, kusma, ajitasyon ve bilinç değişikliği gelişebileceği bildirilmiştir. Nikotin toksisitesinin belirtileri, diğer ülkelerde üretilen tütün ürünlerinin daha küçük miktarlarda tüketilmesini takiben gelişebilir, çünkü bu ürünler ABD'de üretilen tütün mamüllerinden daha fazla nikotin içerebilir. Yaygın olarak letal erişkin nikotin dozu yaklaşık 60 mg (Larson ve ark., 1968) olarak bildirilmesine rağmen doz ile ciddi nikotin toksisitesini ilişkilendiren az veri bulunmaktadır. Bir olgu sunumunda 17 yaşındaki bir erkekte tahmini 5 g nikotin içeren bir solüsyonun oral alımından birkaç dakika sonra kusma ve ani kardiyopulmoner arrest geliştiği bildirilmiştir (Lavoie ve Harris, 1991).

## **4.2 Sigara Kullanımı**

### **4.2.1 Dünya genelinde sigara kullanımı**

Dünya genelinde tütün kullanıcısı sayısı bir milyardan fazla olup, tüm dünya nüfusunun yaklaşık yüzde on beşini oluşturmaktadır (WHO, 2008). Etkili ve acil önlemler alınmadıkça, dünya genelinde sigara içenlerin sayısının gün geçtikçe artmaya devam edeceği tahmin edilmektedir. Sigara içen nüfusun en hızlı arttığı ülkeler düşük ve orta gelirli ülkelerdir (Jamison ve ark., 2006). Tablo 1'de 2000 yılında bölgelere göre 15 yaş ve üzeri tahmini sigara içme sıklığı gösterilmiştir (Jha ve ark., 2006). Tütün endüstrisi, ürün satış ve tanıtımlarını özellikle gelişmekte olan bu ülkeleri hedef alarak yapmıştır.

Geçmiş yıllarda düşük fiyatlar, yaygın pazar, nikotin bağımlılığı ve tehlikesi hakkında sınırlı bilinç nedeniyle tüm dünyada tütün kullanımı artmasına rağmen Kamu ve işyerlerinde sigara içilmesine yönelik kısıtlamalar ve yasalar tütün kullanımının azaltılmasında etkili olmuştur.

Daha düşük gelir düzeyine sahip bireyler ve gençler arasında sigara tüketimin azaltılması ise yüksek fiyat uygulaması ile sağlanmıştır. Tütün ürün fiyatlarında %70'lik bir artışın, tüm dünyadaki sigaraya bağlı ölümlerin dörtte biri kadarını önleyebileceği öngörülmektedir (Jha ve Chaloupka, 2000; Jamison ve ark., 2006). Deneyisel kanıtlar, kapsamlı reklam yasağının tütün tüketimini azaltabileceğini bunun yanında sınırlı bir reklam yasağının ise çok az veya hiç etkili olmayacağını ortaya koymuştur. Reklam tanıtımları yeni kullanıcıları cezbedip, mevcut sigara içicilerini daha fazla sigara içmeye teşvik etmekte ve onların bırakma motivasyonlarını azaltmaktadır (Saffer ve Chaloupka, 2000).

**Tablo 3.** 2000 Yılında 15 Yaş ve Üzeri Tahmini Sigara İçme Sıklığı (Cinsiyete Göre) ve Sigara İçen Sayısı (Jha ve ark., 2006).

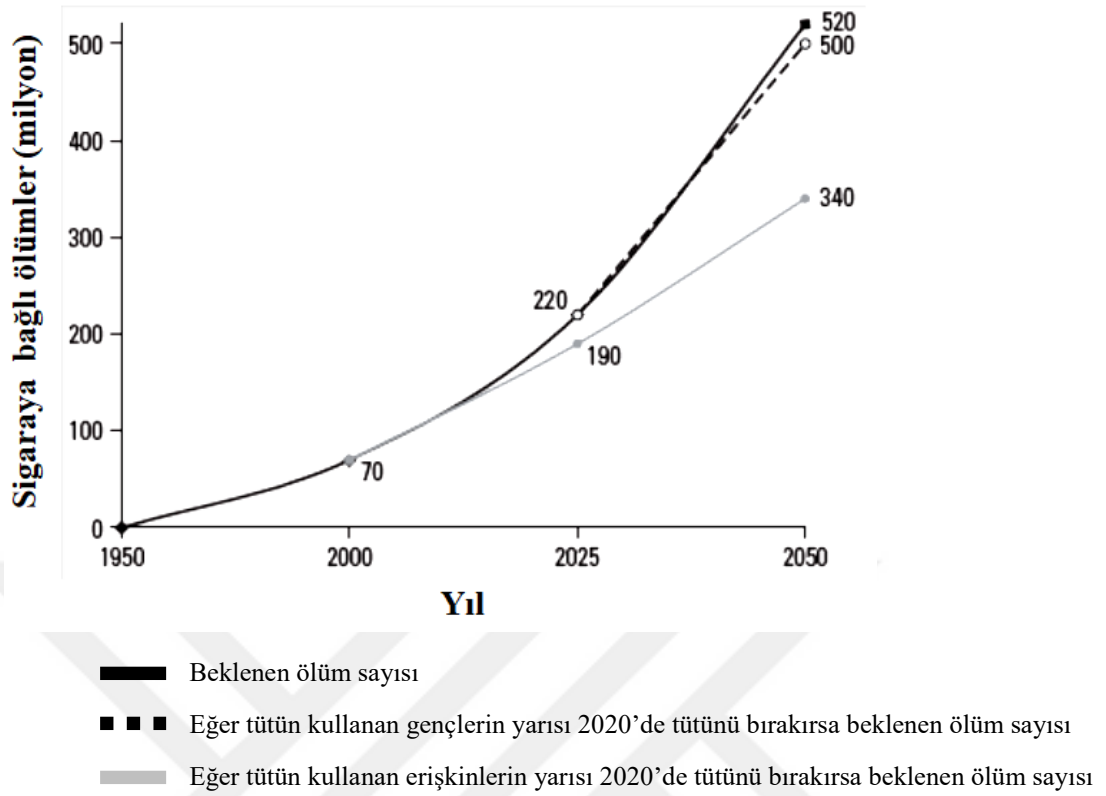
| Bölge                          | Tütün tüketim sıklığı % |       |        | Tüm sigara Kullananlar |                      |
|--------------------------------|-------------------------|-------|--------|------------------------|----------------------|
|                                | Erkek                   | Kadın | Toplam | Milyon                 | Toplam sigara içen % |
| Doğu Asya ve Pasifik           | 63                      | 5     | 34     | 429                    | 38                   |
| Avrupa ve Orta Asya            | 56                      | 17    | 35     | 122                    | 11                   |
| Güney Amerika ve Karayipler    | 40                      | 24    | 32     | 98                     | 9                    |
| Ortadoğu ve Kuzey Afrika       | 36                      | 5     | 21     | 37                     | 3                    |
| Güney Asya                     | 32                      | 6     | 20     | 178                    | 15                   |
| Sahraaltı Afrika               | 29                      | 8     | 18     | 56                     | 6                    |
| Düşük ve orta düzey ekonomiler | 49                      | 8     | 29     | 920                    | 82                   |
| Yüksek düzey ekonomiler        | 37                      | 21    | 29     | 202                    | 18                   |

Sigara kullanımında önemli bir husus da nikotin bağımlılığıdır. Nikotin hem fiziksel hem de psikolojik bağımlılık yaptığı için sigarayı bırakmaları zor olmaktadır. Tütün bağımlılığı diğer bağımlılık türlerinin önüne geçecek derecede yaygındır (Barceloux, 2012). Sigara içenlerin çoğu tütünün tehlikelerinden haberdar olup, bırakmak isterlerse bile bundan vazgeçememektedirler. Sigarayı bırakmak çoğu zaman profesyonel yardım gerektirebilir ancak bu tür yardımlar çoğu ülkede yeterli olamamaktadır (Hammond ve ark., 2006).

Sigara kullanımının sağlık üzerindeki gerçek zararları halk tarafından yeterince bilinmemekte ve sadece kişiisel yaşam tarzının kötü bir alışkanlığı olarak görülmektedir. Sigaranın akciğer kanseri dışında daha birçok kanser eşiidine, kalp ve damar hastalıklarına sebep olduğunun farkında olan bireylerin çoğu sigarayı bırakmak istemektedir (General 1989; Siahpush ve ark., 2006). Yukarıda belirtilen sebeplerin yanı sıra, sigaranın sağlık üzerindeki olumsuz etkileri genellikle hızlı bir şekilde gerçekleşmediğinden, sigara içenlerin sayısının artmaya devam etmesine ve sigaraya bağlı ölümlerin görülmesine neden olmaktadır (Jha ve Chaloupka, 2000).

Ttne bağlı mortalite istatistikleri, sigara bağımlılarının geçmişte ki sigara içme davranışını yansıtmaktadır. Ttne bağlı ölümlerin büyük bir kısmının 2050'den önce önlenmesi için yetişkin içicilerin sigarayı bırakması gerekmektedir. Yetişkinler için sigara tüketiminin 2020 yılına kadar yarıya indirilmesi, 180 milyon tütüne bağlı ölümün önlenmesini sağlayacaktır. Yetişkinlerin dışında sigara içmeye yeni başlayan gençlerin yüzdesindeki azalma, birçok ölüm olasılığını önleyerek, 2050 ve sonrasında ölüm oranları üzerinde büyük bir etki sağlayacaktır (şekil 2) (Jha ve Chaloupka, 2000; Peto ve Lopez, 2004).





**Şekil 4.** Sigaraya bağlı ölümler (milyon)(Jha ve Chaloupka, 2000; Peto ve Lopez, 2004)

Bazı ülkeler, sigara kullanımını kontrol etme ve uygulamaya koyma konusunda önemli adımlar atmışlardır (Chaloupka ve ark., 2011). Bunlardan bazıları, tütün vergisinin artırılması (Jha ve Chaloupka, 2000), kapalı alanda sigaranın kullanımının yasaklanması ve sigara reklamlarının kaldırılmasıdır (Basil ve ark., 2000; Shafey ve ark., 2004). Sigara kullanımına karşı alınan politikalar ile birçok ülkede olumlu sonuç alınmış ve diğer ülkelere örnek olmuştur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), 2005'te Tütün Kontrolü Çerçeve Sözleşmesi'ni (TKÇS) yayınlamış ve sigara salgınının nedenlerinden bazılarını çözmeyi amaçlamıştır. TKÇS yayınlandığından beri, yaklaşık 180 ülkeden onay alarak, dünya çapında sigara salgını hakkında dikkat çekmiş ve iyi sonuçlar almıştır. Daha sonra DSÖ, sigara salgınına karşı koyabilecek ve sigaraya harcanan ölümcül paraları azaltabilecek altı politikaya sahip olan MPOWER paketini yayınlamıştır. Altı maddelik politikanın içinde, tütün kullanımını ve korunma politikalarını izlemek, insanları sigara içmekten korumak, tütünün tehlikelerinden vazgeçmek için yardım sunmak, tütün tanıtım ve sponsorluk

faaliyetlerinde yasak uygulamak ve tütünde vergileri arttırmak bulunmaktadır (WHO, 2008).

Tüm bu çalışmaların sonucunda, sigara kullanımını kontrol etmek için sadece birkaç ülkenin politikasının değil, dünyada ki tüm hükümet ve devletlerin politikalarının bu şekilde oluşturulması gerektiği öngörülmektedir.

#### **4.2.2 Türkiye'de sigara kullanımı**

Türkiye'de yaklaşık olarak 20 milyon sigara bağımlısı bulunmakta olup ortalama beş erkekten ikisi ve beş kadından bir tanesi sigara içmektedir. 15 ve üzeri yaştaki bireyler arasında sigara içme oranı yaklaşık % 44'tür. Gelişmiş ülkelerdeki durumun aksine, Türkiye'de sigara kullanımı özellikle kadınlar arasında artmaktadır. Ülkemizde her yıl tahmini olarak 100 bin kişi sigaraya bağlı olarak ölmektedir. Bu sayı Türkiye'deki yıllık ölümlerin %25'ini oluşturmaktadır. Sigara, aynı zaman da kardiyovasküler hastalık ve kanser bağlı ölümlerin başlıca sebebi olarak görülmektedir. Sigara kullanımının, ülkemizde yılda 25 000 akciğer kanseri vakasına neden olduğu ve diğer kanser vakalarının da %27'sine yol açtığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Bozkurt ve ark., 2006; Ergüderve ark., 2006).

Sigara kullanım oranları ülkemizde bölgeler arası ve yıllara göre farklılık göstermektedir (Güner ve ark., 2000; Bozkurtve ark., 2006). Ülkenin güneybatısında İzmir'in kırsal alanlarında yapılan bir araştırmada,  $\geq 20$  yaş kadınlarda sigara içme oranı % 13.2, erkeklerde ise % 64.3 bulunmuştur. Kocaeli'nde yapılan başka bir araştırmada ise sigara içme oranı  $\leq 18$  yaş bireylerde %50,3 ve  $\geq 20$  yaş bireylerde %32,1 bulunmuştur (Güner ve ark., 2000). Aydın'da yapılan bir başka çalışmada ise sigara içme oranı %48,3 olarak bulunmuştur. Türkiye'de 1988 yılında yapılan bir çalışmada,  $\geq 15$  yaş kadınların %62,8'inin ve toplam nüfusun %43,6'nın sigara içtiği görülmüştür. Bu oranlar günümüzde yapılan çalışmalarda bulunan oranlardan daha yüksektir (Tablo 2) (Bozkurt ve ark., 2006).

**Tablo 4.** Bireylerin cinsiyet ve yaşa göre tütün mamulü kullanma yüzdelerinin yıllara göre dağılımı TÜİK verileri ([http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt\\_id=1095](http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1095), Erişim tarihi: 11.09.2017).

| 15-25 yaş          |        |       |       |        |       |       |        |       |       |        |       | (%)   |
|--------------------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|
|                    | 2010   |       |       | 2012   |       |       | 2014   |       |       | 2016   |       |       |
|                    | Toplam | Erkek | Kadın | Toplam | Erkek | Kadın | Toplam | Erkek | Kadın | Toplam | Erkek | Kadın |
| Her gün kullanan   | 16,4   | 27,1  | 6,1   | 14,3   | 24,1  | 4,6   | 18,5   | 31,4  | 5,7   | 18,1   | 28,2  | 7,8   |
| Ara sıra kullanan  | 3,4    | 4,3   | 2,6   | 2,9    | 4,3   | 1,5   | 4,9    | 6,1   | 3,7   | 3,3    | 3,6   | 3,0   |
| Daha önce kullanan | 9,4    | 11,7  | 7,2   | 5,7    | 6,5   | 5,0   | 8,8    | 10,2  | 7,5   | 2,7    | 3,4   | 2,1   |
| Hiç kullanmayan    | 70,8   | 56,9  | 84,2  | 77,1   | 65,1  | 88,9  | 67,7   | 52,3  | 83,2  | 75,9   | 64,9  | 87,0  |

Türkiye’de sigara kullanımının zararları konusunda ciddi çalışmaların başladığı ve yayınlandığı yıllar olan 1980’lerde yıllık sigara tüketimi sabit kalmıştır (Bilir ve ark., 2010). 15 yaşından büyük yetişkinlerde kişi başı yıllık tütün tüketimi oranı 1945 yılında 1.2 kg iken 1983 yılında kademeli olarak artarak 3.3 kg'a ulaşmıştır (Güleç ve ark., 2005). Bu yıllarda ülkede tütün üreten ve tedarik eden tek bir kuruluş olduğundan, sigaranın reklam ve tanıtımı çok düşük düzeyde kalmıştır. 1980’lerin ortalarında, Philip Morris ve British American Tobacco gibi güçlü şirketlerin etkisi ile Türkiye’de tütün pazarı önemli ölçüde etkilenmiş ve sonuç olarak sigara tüketimi artmıştır (Günes ve ark., 1997; Dağlı, 1999, Onder, 2002). 1986-1993 yılları arasında sigara kullanım sıklığı her yıl %3.3 oranında artış göstermiştir. Bu artış üzerine 1996 yılında “Tütün Mamullerinin Zararlarının Önlenmesine Dair Kanun” 7 Kasım 1996 tarihinde kabul edilmiş, Resmi Gazete’de (T.C. Resmi Gazete, 26 Kasım 1996, sayı: 22829) yayınlanarak yürürlüğe girmiştir (Bilir ve ark., 2010). Bu kanun Türkiye’deki tütün kontrolü çalışmaları bakımından önemli bir adım olmuştur. Kanun, toplu taşıma araçlarında ve kapalı yerlerin önemli bir kısmında sigara kullanımını, 18

yaşından küçük çocuklara sigara satışını, tütün ürünlerinin her türlü reklam ve tanıtımını yasaklayıp, sigara paketleri üzerinde uyarı yazısı yazılmasını ve televizyonlarda sigaranın zararları konusunda eğitici yayın yapılmasını öngörerek sigara kullanımının artış hızını 1997’de %7.7’den 1998’te %2.8’e düşürmüştür. Dünya Sağlık Örgütü Tütün Kontrolü Çerçeve Sözleşmesi (DSÖ, TKÇS), 21 Mayıs 2003 tarihinde yayınladıktan sonra Türkiye TKÇS’yi 2004 yılı Nisan ayında imzalamıştır (Aslan ve Seydioğulları, 2012). 30 Kasım 2004’de Çerçeve Sözleşmesi Türkiye Büyük Millet Meclisi (TBMM) tarafından onaylanarak, sözleşmeyi onaylayan 43. ülke olmuştur. Sözleşmenin kabulünü takiben, uzun çalışmalar sonunda 2008 yılı başında yasanın bazı maddelerini değiştiren düzenleme yapılmıştır. Bu düzenleme ile Kanun’un adı “Tütün Ürünlerinin Zararlarının Önlenmesi ve Kontrolü Hakkında Kanun” olarak değiştirilmiş, sigara içilmesinin yasaklandığı alanlar genişletilmiş, restoran, kafe ve barlar da sigara içilmesinin yasaklandığı yerler arasına katılmıştır. 2006 ile 2013 yılları arasında sigara içme oranı % 33.8’den % 27.1’e düşmüştür. Sigara bağımlılığının önemini göz önüne alırsak, bu başarılar Türkiye için son derece önemlidir(Bilir, 2009; Bilir ve ark., 2010).

#### **4.2.3 Gençlerde sigara kullanımı**

Tütün kullanımı, genetik, sosyal ve psikolojik faktörlerden etkilenen karmaşık bir davranıştır. Çoğu erişkin sigara kullanıcısı 12-15 yaşlarında sigaraya başlamaktadır (Raitasalo ve ark., 2012). Erken yaşta sigara içmeye başlamak bir yetişkin olarak günde içilen sigara sayısını arttırmaktadır. Ayrıca erken yaşta sigara içmeye başlayan bireylerin, daha geç yaşta başlayan bireylere kıyasla sigara içmeyi bırakma ihtimalleri daha düşük olmaktadır(Taioli ve Wynder, 1991). Araştırmalar, sigara bağımlısı çoğu insanın 18 yaşından önce sigara içmeye başladığını belirtmektedir(Warren ve ark., 2008).

Aile bireylerinin sigara içme alışkanlıkları ve ebeveynlerin sosyoekonomik durumu genç yaşlarda sigara içme riskinin artmasında rol oynamaktadır(Kemppainenve ark., 2006) . Yakın tarihli bir sistematik analizde, genç yetişkinler arasında sigaraya başlama riskini artıran faktörler arasında; can sıkıntısı ya da strese maruz kalma, üniversitedeyken sigara içilen sosyal etkinliklere katılma,

sigarayı teşvik eden sosyal normlara ve algılara maruz kalma gösterilmiştir (Tablo 3) (Freedman ve ark., 2012). Epidemiyolojik kanıtlar, sigara kullanımının ve fiziksel aktivite alışkanlığının çocukluktan erişkinliğe doğru devam etmekte olduğunu göstermektedir (Steptoe ve ark., 2002). Ergenlik döneminden itibaren fiziksel hareketsizlik alışkanlık haline gelerek yetişkinliğe doğru ilerlemekte ve yaşam biçimi haline dönen bu durum sigara içimi ile ilişkilendirilmektedir (Conway ve Cronan, 1988; Conway ve Cronan, 1992; Kujala ve ark., 2007). Ayrıca depresyon ile sigara içimi arasında bağlantı olduğu ileri sürülmektedir (Fergusson ve ark., 2003). Depresyondaki kişilerin diğerlerine göre sigara içmeye başlama veya sigara içmeye devam etme olasılığı daha yüksektir (Murphy ve ark., 2003).

**Tablo 5.** Türkiye de ki 15 yaş ve üzeri bireylerin tütün mamulü kullanmaya başlama nedenlerinin cinsiyete göre dağılımı TÜİK verileri (<http://www.tuik.gov.tr>, Erişim tarihi: 11 Eylül 2017).

| [15+ yaş]             | (%)    |       |       |        |       |       |        |       |       |        |       |       |
|-----------------------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|
|                       | 2010   |       |       | 2012   |       |       | 2014   |       |       | 2016   |       |       |
|                       | Toplam | Erkek | Kadın | Toplam | Erkek | Kadın | Toplam | Erkek | Kadın | Toplam | Erkek | Kadın |
| Merak                 | 34,5   | 34,6  | 34,3  | 42,3   | 43,9  | 38,2  | 36,2   | 37,2  | 34,0  | 21,6   | 22,4  | 19,4  |
| Özenti                | 23,3   | 25,5  | 18,3  | 26,5   | 27,8  | 23,2  | 16,8   | 18,3  | 13,2  | 29,7   | 31,7  | 24,3  |
| Aile sorunları        | 4,0    | 2,8   | 6,8   | 3,8    | 2,3   | 7,7   | 3,9    | 2,3   | 7,6   | 5,2    | 3,1   | 11,2  |
| Kişisel sorunlar      | 5,0    | 4,2   | 7,1   | 4,4    | 3,6   | 6,6   | 5,3    | 4,5   | 7,0   | 6,3    | 5,0   | 10,1  |
| Arkadaş etkisi        | 22,7   | 23,7  | 20,5  | 16,0   | 16,3  | 15,2  | 29,4   | 30,4  | 27,2  | 29,1   | 30,3  | 25,9  |
| Eğlence amaçlı        | 3,2    | 3,1   | 3,3   | 1,6    | 1,5   | 1,9   | 2,8    | 2,7   | 3,3   | 3,3    | 3,0   | 3,8   |
| Hiçbir özel neden yok | 1,7    | 1,5   | 2,0   | 2,5    | 2,3   | 3,3   | 1,9    | 1,7   | 2,3   | 4,4    | 4,3   | 4,5   |

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, ergen ve genç erişkin bireylerin düzenli olarak sigara içmeleri halinde kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve orta yaştan önce peptik ülser olma ihtimallerinin diğer bireylere göre belirgin şekilde yüksek olduğu gözlenmiştir (Hozawa ve ark., 2006). Sigara içen genç bireylerde ayrıca, nefes darlığı

ve aşırı balgam gibi solunum yolları şikayetlerine yakalanma olasılığı, sigara içmeyenlerden iki ila üç kat daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Tønnesen, 2002). Buna ek olarak, sigara içen ergen bireylerde, özellikle esrar gibi diğer maddelere bağımlı olma olasılıkları daha yüksektir (Patton ve ark., 2006). Sigara içmenin uzun süreli sağlık sorunlarının yanı sıra daha az ciddi ancak daha acil olan fiziksel sonuçları olduğu tespit edilmiştir. Bu tespiti örnek olarak, sigara içen ergenlik çağındaki kız çocuklarının büyümeleri, sigara içmeyen kız çocukları ile kıyaslandığında kısıtlı büyümeye neden olduğu gözlemlenmiştir (Stice ve Martinez, 2005).

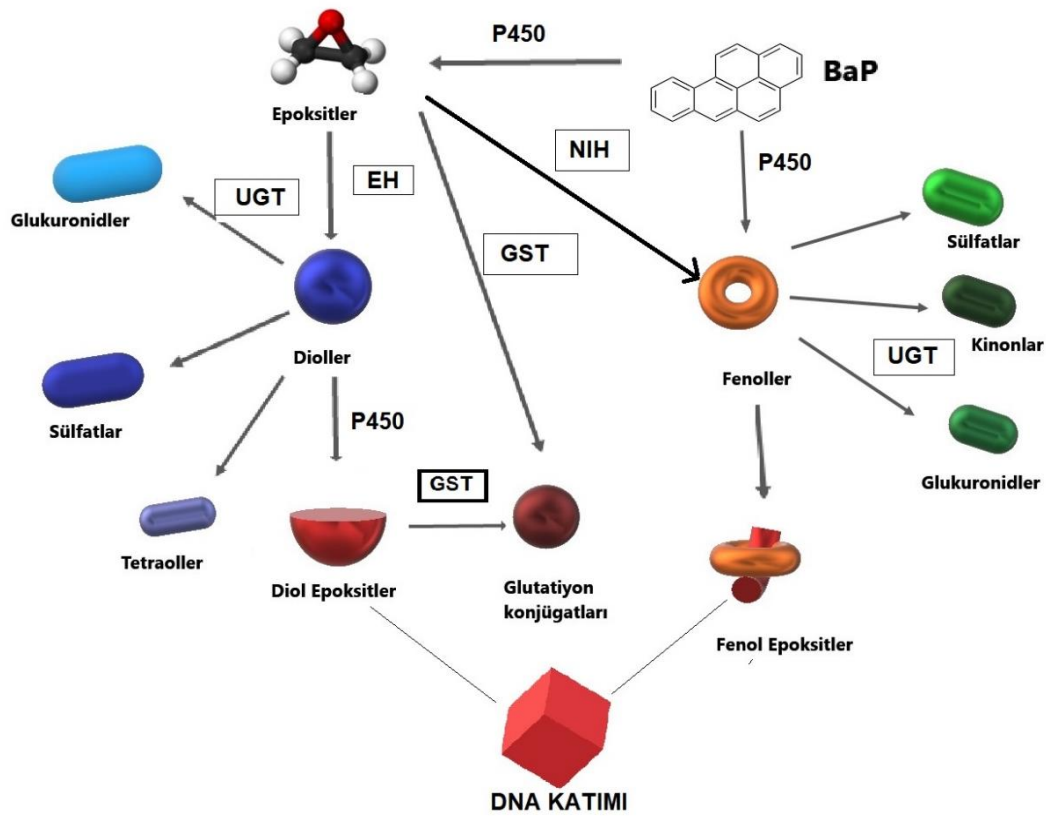
Araştırmalar, az ve düzensiz sigara içmelerine rağmen, sigara içen gençlerin nikotin'e bağımlı olduğunu, sigara içme isteği yaşadıklarını ve sigara içmeyi bırakmakta zorlandıklarını ortaya koymaktadır (DiFranza ve ark., 2002).

#### **4.3 Sigaranın biyotransformasyonu**

Nikotin karaciğerde en az 6 primer metabolite dönüşmektedir. Alınan nikotinin %70-80'i hepatik sitokrom P450 enzimleri ile oksidasyona uğrayarak inaktif metabolitlere (örn., Kotin, nikotin -1'-N-oksit) katalizlenir. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar CYP2A6'nın nikotin ve kotinin oksidasyon mekanizmaları için birincil enzim olduğunu göstermektedir. CYP2A6 enziminin genetik varyantları, nikotin ve kotinin metabolizmasında bireylerarası ve etnik gruplar arasında farklılığa neden olmaktadır (Mwenifumbo ve ark., 2008). Dekstrometorfanın yavaş ve yaygın metabolizörleri (CYP2D6 aktivitesi için) ile ilgili deneysel çalışmalar sonucunda, CYP2D6'nın nikotin veya kotinin metabolizması için başlıca izoenzim olmadığı gösterilmiştir (Benowitz ve Jacob III, 1996). CYP2B6, nikotin oksidasyonunda en aktif ikinci sitokrom P450 izoenzimidir ve *in vitro* yüksek nikotin konsantrasyonlarında CYP2E1'de bir miktar aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Le Gal ve ark., 2003).

Tütünde bulunan normikotin ise nikotinin küçük bir metabolitidir. Kotinin 6 primer metaboliti oluşmaktadır ve bunlar 3'-hidroksitotinin, 5'-hidroksitotinin, kotinin N - oksit, kotinin metonyum iyonu, kotin glukuronid ve norkotinindir. Sigara dumanındaki karsinogenlerin biyoaktivasyonunda temel adım, sitokrom P450

izoenzimleri ile gerçekleşir. Monoamin oksidazlar, lipoksigenazlar, siklooksigenazlar ve miyeloperoksidazlar ise nikotin metabolizmasında daha az yer almaktadır. Karsinojenlerin metabolik aktivasyonu sonucu DNA'ya veya diğer makromoleküllere kovalent olarak bağlanıp katım oluşturan elektrofilik, oksijenlenmiş ara ürünler ortaya çıkar. Bu elektrofilik ara ürünlerin detoksifikasyonu, glutatyon S - transferazlar, epoksit hidrolaz, N - asetil transferazlar, uridin - 5 '- difosfat - glukuronoziltransferazlar, sülfotransferazlar ve diğer enzimler tarafından katalizlenir. Benzo [a] pirenin metabolik aktivasyonu, ekzosiklik N<sup>2</sup> guanin ile katımlar oluşturan, son derece elektrofilik 7,8 - diol - 9,10 - epoksit oluşumuyla sonuçlanır.  $\alpha$  - Hidroksilasyon hem NNK hem de ana metabolit [4- (N - metilnitrosamino) - 1 (3 - piridil) - 1-bütanol, NNAL] için başlıca metabolik aktivasyon yoludur (Şekil 7).



Şekil 5. Benzo[a]pirenin metabolik aktivasyonu

Bu yol diazonyum iyonları ve metil adüktlerin (7-metilguanin, O-6-metilguanin) yanı sıra piridiloksobutil adüktleri oluşturur. *In vivo* çalışmalar, tütün dumanının CYP1A1, CYP1A2, CYP2E1 ve uridin-5'-difosfat-glukuronoziltransferazın bazı

izoformları dahil olmak üzere birçok faz I ve II enzimini indüklediğini göstermektedir (Zevin ve Benowitz, 1999).

#### **4.4 Sigara Kullanımının Üst Solunum Yollarına Etkisi**

Dumansız tütün veya etanolün tütün ile kombinasyon halinde kullanımı, ağız boşluğu ve gırtlak kanseri gelişim riskini önemli ölçüde artırmaktadır. Günlük 30 sigara üstünde sigara içmek ve haftalık 20 gram üzerinde etanol içmek, üst solunum yolu kanseri gelişim riskini sigara içmeyenlerle karşılaştırıldığında yaklaşık 9 kat artırmaktadır (Schottenfeld, 1984). Tütün kullanımı burun boşluğunun ve paranazal sinüslerin skuamoz hücreli karsinomu ile bu bölgedeki adenokarsinomlara göre daha yakından ilişkilidir. Nasofaringeal kanser, Epstein - Barr virüsü enfeksiyonunun bir sonucu olarak Güneydoğu Asya ve Kuzey Afrika bölgelerinde endemiktir. Bu kanserlerin göreceli riski sigara içenlerde sigara içmeyenlere göre yaklaşık 2 -5 kat daha fazladır (Sasco ve ark., 2004).

#### **4.5 Sigara ve Akciğer Kanseri Arasındaki İlişki**

Akciğer kanserinin farklı histolojik tiplerinde sigaranın etkinliği değişkenlik gösterir. Skuamoz hücreli kanser ve adeno kanser sigara kullanımı ile daha anlamlı ilişkidir. Bu iki tip kanserin görülme sıklığının, sigarayı bıraktıktan sonra yıllar içinde önemli oranda azaldığı görülmektedir (Doll ve Hill, 1950).

Sigara kullanımı ile akciğer kanseri arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar 1940'lı yıllarda ortaya çıkmış ve daha sonra bilim insanlarının ilgisini çekmiştir. 1950'lerde İngiltere'de yapılan araştırmalarda Doll and Hill, Cuyler Hammond ve Ernest Wynder, sigara kullanımı ile akciğer kanseri arasındaki nedensel ilişki hakkında kanıt sağlamışlardır (Doll ve Hill, 1950; Schrek ve ark., 1950). Bu çalışmalar, sigara kullanımının akciğer kanserindeki baskın rolünü göstererek yapılacak olan çalışmalara yol göstermiş ve hızla ilerleme kaydedilmiştir. Ancak sigara endüstrisinin ticari çıkarlarını korumak istemesi sebebiyle, uzun bir süre sigara kullanımının zararları insanlara gerek yazılı gerek görsel haberleşme araçları ile aktarılmadığından sigara kullanımı tüm dünyada hızla artmıştır (Witschi, 2001). İzleyen yıllarda Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ve sivil toplum kuruluşlarının (STK)

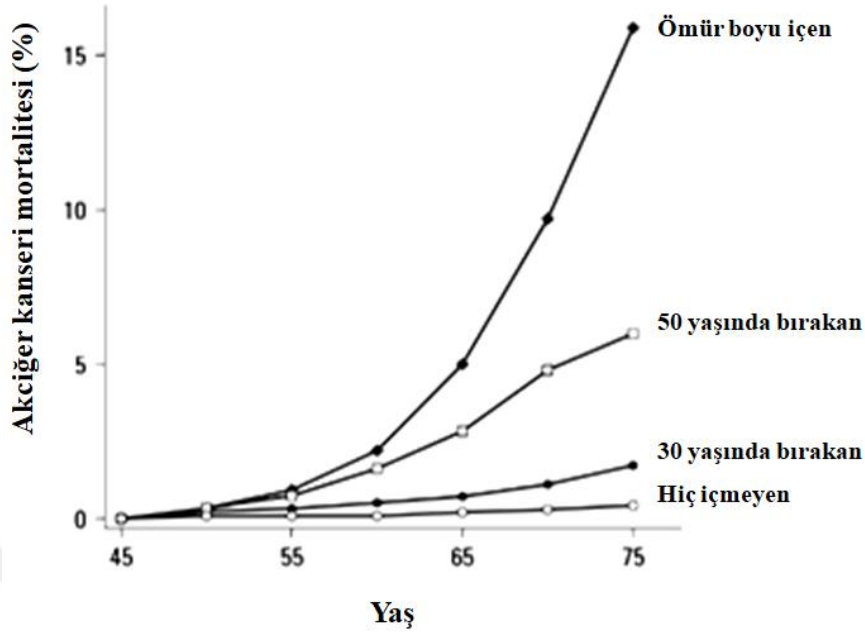


akciğer kanseri verilerini küresel veya bölgesel olarak mortalite ve morbidite oranları ile birlikte açık olarak belirtmeleriyle, insanlar sigaranın sağlık üzerindeki olumsuz etkilerini anlamaya ve dikkate almaya başlamışlardır (Cornfield ve ark., 2009) (Fry ve ark., 1996; WHO, 2015). Son yıllarda da, sigara kullanımının sağlık üzerindeki olumsuz etkilerinin ortaya çıkmasında önemli rol oynayan yaş, cinsiyet ve kırsal-kentsel farklılıklar gibi etiyolojik faktörlerin ve kanser oluşumunun patogenezinde rol oynayan etkilerin araştırıldığı çalışmalar yoğun olarak devam etmektedir (Beckett, 1993; Stewart ve Kleihues, 2003; Cornfield ve ark., 2009).

Akciğer kanseri riskini azaltmanın en etkili yolu, sigarayı bırakmaktır. Çünkü sigarayı bırakanlarda akciğer kanseri riski, hiç sigara içmemiş bireylere göre daha yüksek bulunmakta ve sigarayı bırakma süresi uzadıkça kanser riskinin zamanla düştüğü belirtilmektedir (Doll ve Hill, 1956).

Doll ve Hill'in yaptıkları araştırmada (<10 yıl) sigara içmeyi bırakanlarla, (>10 yıl) sigara içmeyi bırakanları karşılaştırmış ve sonucunda bırakma süresinin uzamasına bağlı olarak mortalite oranının anlamlı bir şekilde azaldığını belirtmişlerdir (Doll ve Hill, 1956).

2001 yılında yapılan bir meta analiz çalışmasında, tüm akciğer kanseri türlerinde yapılan histolojik incelemede sigara kullanımı ile akciğer kanseri riskinin anlamlı şekilde ilişkili olduğu ve günlük içilen sigara sayısının, içme süresinin akciğer kanseri riskini doğrusal olarak arttığını gösterilmiştir (Khuder, 2001).



**Şekil 6.** Birleşik Krallık'ta Akciğer Kanseri Ölümleri Kümülatif Riski, 1990 oranları (Peto ve ark., 2000)

İngiltere de yapılan bir çalışmada sigara kullanım süresi ile akciğer kanseri mortalitesi arasındaki doğrusal ilişki olduğu gösterilmiştir (Şekil 1)(Peto ve ark., 2000) .

Hirayama T.'nin yaptığı çalışma ise sigara içenlerin eşlerinin, sigara içmeyenlerin eşlerinden daha yüksek bir akciğer kanseri riski taşıdıklarını ortaya koymuştur(Hirayama, 2000).

#### 4.6 Biyogöstergeler

Tütün dumanına maruziyeti gösteren olası biyogöstergeler nikotin, kotin, tiyosiyanat, karboksihemoglobin, hidroksiprolin, N-nitrosoprolin, 1- ve 2-naftol, hidroksifenantren bileşikleri, fenantren dihidrodioller, 1 - hidroksipiren, benzen metabolitleri (trans-mukonik asit, S fenilmerkaptirik asit), 4- (metilnitrosamino) -1-(3-piridil)-1-bütanol (NNAL) ve glukuronidler (NNAL Gluc), tütüne özgü adüktler (protein, DNA), 8-oksodeoksiguanozin, 3-etiladenin, ve aromatik aminlerdir. Aktif tütün kullanımı, solunum havasında benzen, uçucu organik bileşikler ve karbon monoksit konsantrasyonunu artırır. Benzen metabolitleri de dahil olmak üzere,

bilinen karsinojenlere ait idrar metabolitlerinin konsantrasyonları, tütün içenlerin idrarında sigara içmeyenlere göre daha yüksektir. Aktif veya pasif tütün dumanına maruz kalmanın en yaygın kullanılan biyolojik göstergesi, hem günlük tütün kullanımı hem de çevresel tütün dumanı maruziyeti için oldukça özgül bir belirteç olan kotinindir. Kotinin konsantrasyonları, partikülat fazı unsurlarına (katran) maruziyeti gösterir, ancak katran maruziyetini gösteren doğrudan bir biyogösterge yoktur. NNAL ve NNAL-Gluc faydalı biyogöstergelerdir, çünkü bu iki bileşik tütüne özgü, 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanon metabolitleridir. Tütün ürünleri için diğer biyogöstergeler arasında trans-mukonik asit, S-fenilmerkaptirik asit, naftalin metabolitleri (1-, 2-naphthol), 1-hidroksipiren, 8-oksodeoksiguanozin ve 3 - etiladenindir (Hecht, 2002). Bununla birlikte, bu biyogöstergelerin belirgin bir özgüllüğü yoktur çünkü sadece NNAL ve NNAL-Gluc tütün ürünlerine maruz kalma için spesifiktir. Serum tiyosiyanat konsantrasyonu, orta ve ciddi düzeyde sigara içen bireylerde artış gösterirken sigara içmeyen, hafif sigara içen veya pasif içiciler arasında anlamlı farklılık göstermemektedir (Trosko, 2004).

Tütün dumanı kronik inflamasyona ve doğal koruyucu bariyerlerin bozulmasına neden olarak karsinogenezin farklı aşamalarında etki gösterir. Tütün dumanı içinde, kokarsinojenler olarak davranan ve tümör gelişimine katkıda bulunan çok sayıda karsinojen madde bulunmaktadır. Tütün dumanında karsinojenlerin çoklu mutasyonlar üzerindeki etkisi ve akciğer kanseri gelişiminde hücresel prosesler Şekil 6'da gösterilmektedir. Kanser gelişim basamakları, kendi kendine büyüme sinyali oluşturabilme, büyüme önleyici sinyallere duyarsızlık gelişimi, sürekli anjiyojenez, doku invazyonu ve metastazı, apoptozdan kaçınma ve sınırsız çoğalma potansiyelini içerir (Hanahan ve Weinberg, 2000). Kök hücre ve onun erken progenitör hücresi, karsinogenez başlangıcı için hedef hücrelerdir (Trosko ve ark., 2004). Çoğu karsinojen madde öncelikle sitokrom P450 izoenzimleri tarafından metabolik aktivasyona uğramaya ihtiyaç duyar. Sigara kullanımı, CYP1A1 ve CYP2D6 enzimlerinin indüklenmesine neden olur; metabolizmada ilk izoenzim tütün dumanından polisiklik aromatik hidrokarbonlar oluştururken ikinci izoenzim, 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanon (NNK) ve *N*-nitrosamin'de dahil olmak üzere birçok nitrosamini etkinleştirir (Nishikawa ve ark., 2004). Sitokrom P450

izoenzimleri tarafından oluşturulan oksijenlenmiş ara ürünler tipik olarak faz II enzimleri (örn., Glutasyon S-transferazlar, uridin-5'-difosfat-glukuronoziltransferazlar, sülfotransferazlar) tarafından daha ileri transformasyona uğrarlar. GSTM1 geni, polisiklik aromatik hidrokarbon diol epoksiti de dahil olmak üzere çeşitli karsinojenlere etki eden glutasyon S-transferazların mu sınıfı için gen kodlarını içerir. Karsinojenlerin sitokrom P450 sistemi ile biyotransformasyonu bu bileşiklerin çoğunu detoksifiye eder, ancak bu elektrofilik bileşiklerin bazıları DNA katımlarını oluşturur. Hücresel onarım mekanizmaları, mutasyonlar oluşmadan önce doğrudan onarım, baz eksizyon tamiri ve nükleotid eksizyon tamiri ile çoğu DNA katımını ortadan kaldırır. Apoptoz (programlanmış hücre ölümü), hasarlı DNA'ya sahip hücreleri de ortadan kaldırır. Bazı DNA katımları normal onarım mekanizmalarından kaçarak bazı onkogenlerde (örneğin Kirsten-ras) ve tümör süpresör genlerde (ör. p53) yanlış kodlamaya ve kalıcı kritik nokta mutasyonlarına neden olur. Bu mutasyonlar, hücre döngüsü kontrol noktalarını bozarak normal hücre büyüme kontrolünün kaybına neden olur ve sonucunda tümör oluşumuna yol açar (Rebbeck, 1997; Barceloux, 2012).

Bir adet sigara içtikten sonra plazmada ortalama nikotin konsantrasyonu yaklaşık 5-30 ng/mL arasında değişmektedir (Benowitz ve Henningfield, 1994; Benowitz ve Jacob III, 1996). Nikotinin plazmada eliminasyon yarılanma ömrünün kısa olması, biyogöstergesi olarak kullanımını sınırlar (Hurt ve ark., 1993). 2 µg/ml'yi aşan serum nikotin konsantrasyonları, ciddi toksisiteye neden olur (Kemp ve ark., 1997).

#### **4.6.1 DNA/Protein katımları**

DNA'daki karsinojenik reaksiyonlar DNA katımları ile ölçülmektedir. Bununla birlikte, DNA ve protein katımları, tütün dumanının erken biyolojik etkilerinin nonspesifik belirteçleridir. Protein katımları (hemoglobin, albümin), DNA katımlarından daha kolay elde edilen ve bunların yerine kullanılan maddelerdir. Tütün dumanındaki karsinojenlerin, kan proteinlerine (öncelikli olarak guanin ve adenine) kovalent bağlanması, bu katımların görülme sıklığını arttırmaktadır. Bu katımlar benzen, aromatik aminler, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, tütüne spesifik nitrosaminler [4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-bütanon], akrilonitril ve

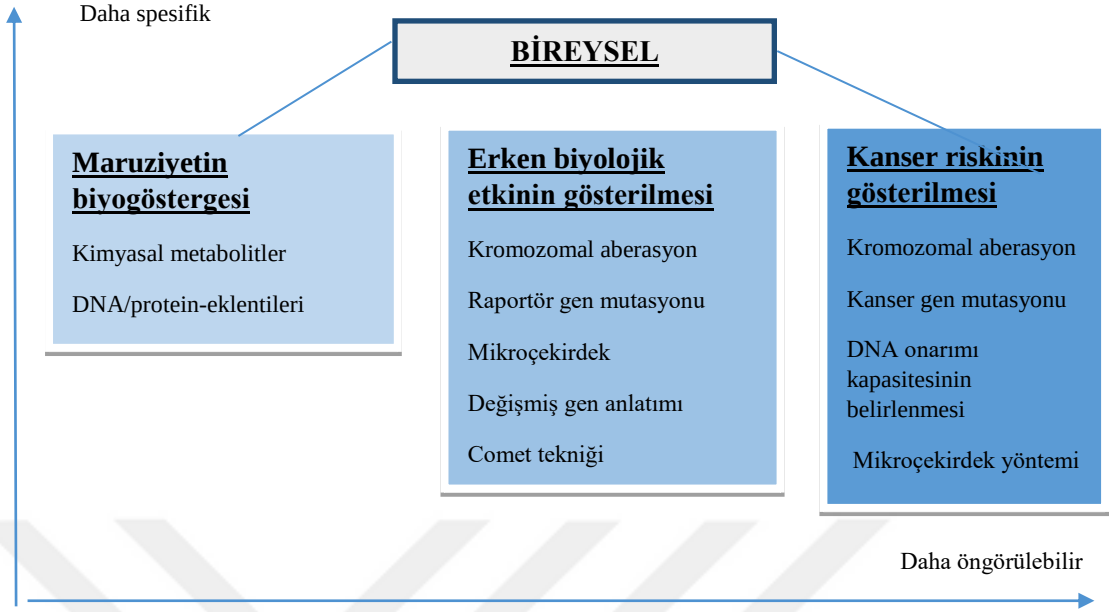
akrilamid gibi tütün dumanındaki çeşitli kimyasallardan kaynaklanmaktadır. Eliminasyon yarılanma ömrü uzun olduğu için protein katımları, 4 ay önceki tütün dumanına maruz kalmayı gösterir. Örneğin, *N* - (2 - hidroksietil) valin, tütün dumanı içindeki etilen oksit ile hemoglobin içindeki *N* - terminal valin arasındaki reaksiyon sonucu ortaya çıkar ve bu protein katımı, tütün dumanına maruz kalmanın nonspesifik biyogöstergesidir(Bono ve ark., 2005).

#### **4.7 Genotoksisite Testlerinin Moleküler Epidemiyoloji Çalışmalarındaki Yeri**

Günümüzde kimyasalların insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri, birçok hastalığın etolojisinin aydınlatılması ve genetik yatkınlığın araştırılmasında moleküler yöntemler etkili olarak kullanılmakta ve biyogöstergelerin önemi her geçen gün artmaktadır. Hızla gelişen teknoloji sayesinde kanser ve diğer birçok hastalığın etyopatogenezindeki bilinmeyenler günümüzde çeşitli moleküler biyogöstergeler ile belirlenebilmekte ve benzer yöntemlerle tedavi seçenekleri geliştirilmektedir (Bartsch ve Hietanen, 1996; Chen ve Hunter; 2005).

Sağlıklı organizmada karmaşık biyolojik olayların aydınlatılması, patogenetik yolun farklı basamaklarına özgün biyogöstergelerin saptanması, hastalıkların tanısı ve olası proflaktif tedavi yöntemlerin geliştirilebilmesi ve tedavi etkililiğinin araştırılabilmesi biyogöstergelerin önemini ortaya koymaktadır. Biyogöstergeler (biyolojik göstergeler), organizmanın doku, hücre ve sıvı gibi biyolojik ortamlarında ölçülebilir nitelikteki hücresel, biyokimyasal veya moleküler değişimleri gösterir. Uzun yıllardır çeşitli hastalıklarda ve epidemiyolojik araştırmalarında kullanılan ilkel biyolojik yöntem çalışmaları, gelişen teknoloji ile artarak günümüzde tıp alanında en yoğun çalışma konularının başına geçmiştir(Leal-Garza ve ark., 2002).

Biyogöstergeler genel olarak, hastalıklarda ve epidemiyolojik çalışmalarında etyopatogenetik olarak birincil kullanımlarına göre en az üç kategoride sınıflandırılmaktadır; maruziyetin biyogöstergeleri, erken biyolojik etkinin biyogöstergeleri ve duyarlılığın biyogöstergeleri. Bu sınıflandırma ve uygun biyogöstergeler Şekil 7’de gösterilmiştir (Au 2007).



Şekil 7. Biyogöstergeler

Ksenobiyotikler organizmada biyokimyasal, fizyolojik, fonksiyonel, morfolojik ve psikolojik değişimlere yol açmaktadır. Toksik bir ajana maruziyetin olup olmadığını belirlemek amacıyla bileşiğin kendisinin veya metabolitlerinin makromoleküllerle oluşturduğu katım ürünlerini ya da bileşiğin spesifik metabolitlerinin direkt ölçümü maruziyetin biyogöstergeleri ile aydınlatılmaktadır. Biyogösterge sonuçlarının hastalığa giden olası yolları ifade ettiği düşünülmektedir. Normalden farklı sonuçlar hastalık için belirgin artmış bir riskin göstergesi olarak algılanabilmektedir(Mercier ve Robinson, 1993; Aitio 2000).

Hastalıkların oluşumunda, maruz kalınan ksenobiyotiğin dozu ve maruziyet süresinin yanı sıra kişisel faktörlerinde rolü vardır. Bu amaçla geliştirilen duyarlılığın biyogöstergeleri ile genetik tabanlı bir yatkınlık ortaya konulabilir. Bu sonuçlar ile genel popülasyona oranla hastalıklara karşı daha yüksek risk taşıyan özel bireylerin tespiti sağlanabilmektedirler. Böylece spesifik kimyasalların aktivasyon veya detoksifikasyonunda rol oynayan enzimlerin aktivitelerinin yanı sıra özel hasar tipindeki DNA onarım kapasitelerinin bilinmesi ve kontrolü duyarlılığın gösterilmesini sağlamaktadır(Au ve ark., 1996).

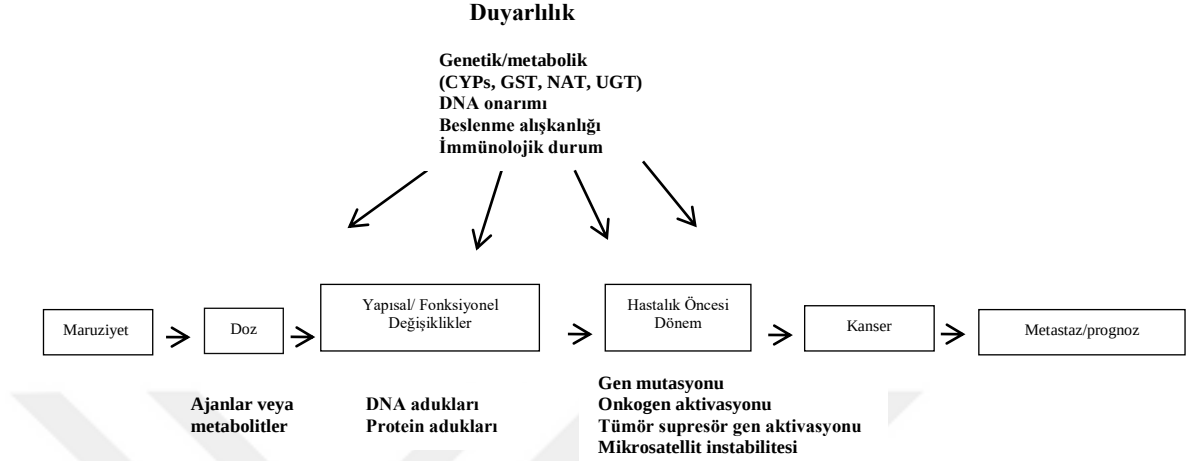
Yukarıda belirtildiği gibi hastalık oluşumunda, maruziyete ek olarak bireye özgü duyarlılık faktörleri de önem arz etmektedir. Bireye özgü duyarlılık faktörlerinden biri de genetik polimorfizmdir. Genetik polimorfizmler, ilgili DNA bölgesinin tamirinin aktivitesini, karsinojen metabolizmasını ve apoptotik yolak genlerini olumsuz etkileyebilmektedir. Bir diğer faktör ise yine bu genlerin aktivitelerini etkileyen dengeli ve düzenli beslenme ve sağlıklı yaşam koşullarıdır. Stresli yaşam ve psikolojik özelliklerinde hastalık oluşumunda önemli olabileceği düşünülmektedir(Fenech, 2002).

Çağımızın en önemli sağlık sorunlarının başında gelen kanser, gen ekspresyonu artmış hücrelerin anormal büyümesi ile diğer dokulara invaze olarak hücre fonksiyonlarını engelleyen ilerleyici bir hastalıktır. Etyopatogeneizde başta sigara olmak üzere radyasyon, kimyasal ajanlar, kronik inflamasyonlar, HBV(Hepatit B virüs) ve Hp (Helikobakter Piloni) enfeksiyonu, travma, yaşlılık, genetik gibi birçok faktör sorumlu tutulmaktadır. Sağlıklı bireylerin normalde doku ve hücrelerinde onkogenik etkenler ile koruyucu etkenler bir denge içinde bulunmaktadır. Fakat henüz tam açıklanamayan bir sinyalle kontrolsüz hücre çoğalması başlayabilir. Bu kontrolsüz hücre çoğalması farklı biyolojik yollar içerdiğinden, birkaç kanser tipinin dışında neden olduğu açıklanamamakta ve tedavisi yapılamamaktadır. Son yıllarda hızla artan biyomoleküler araştırmalar ile anormal biyolojik evreleri tanımlayan çeşitli biyogöstergeler geliştirilmiştir. Bu sayede riskli olguların saptanması, erken evrede hastalığın tanısı ve tedavide ümit verici gelişmeler gözlenmektedir(Au, 2004; Chen ve Hunter; 2005, Au, 2007).

Kanser gelişim riskinin biyogöstergeler ile değerlendirilmesi kabaca 4 aşamada özetlenebilir:

1. Kanser oluşumunu indükleyen temel etken ve mekanizmaların belirlenmesi.
2. Potansiyel çevresel karsinojenlere maruz kalmanın miktarının ve süresinin değerlendirilmesi.
3. Kanser riskini artıran genetik ve/veya edinsel duyarlılık faktörlerinin saptanması.
4. Karsinojenlere maruz kalan popülasyonlarda kanser oluşum riskinin öngörülmesi.

Şekil 8’de moleküler epidemiyolojinin kanser çalışmalarında maruziyetten kanser gelişimine doğru getirdiği açılımlar görülmektedir(Bartsch ve Hietanen 1996).



**Şekil 8.** Moleküler epidemiyolojinin kanser araştırmalarında sağladığı açılımlar.

Kanserin gelişimi birkaç yıldan onlarca yıla kadar sürebileceğinden bu denli uzun bir zaman periyodu için prospektif epidemiyolojik çalışmalar yapmak her zaman mümkün olamamaktadır. Bu nedenle hücrede özellikle çekirdekteki anomalilerin saptanması önemli bulunmaktadır. DNA hasarının sensitif ve spesifik biyogöstergelerinin geliştirilmesi erken kanser riskini belirlenmesi, tanısı ve tedavisi için ümit vaad etmektedir. Meme kanserleri olgularının çoğunda bulunan BRCA1 ve BRCA2 genlerinde meydana gelen mutasyonlar (BRCA1 185delAG, BRCA1 5382insC ve BRCA2 6174delT) ile ilgili geliştirilen tarama testleri erken tanı ve tedavide oldukça yararlı olmuştur(Duesberg ve ark., 2000; Li ve ark., 2000).

Tablo 6, insan hücrelerini *in vitro* veya *in vivo* olarak incelemek için şu anda kullanılan DNA hasarı biyolojik belirteçlerinden bazılarını listelemektedir.

**Tablo 6.** DNA hasarının tespitinde kullanılan biyogöstergeler(Fenech, 2002)

|                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------|
| <b>DNA Hasarının <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> Biyogöstergeleri</b> |
|-------------------------------------------------------------------------|



- DNA ipliğindeki kırılmaların saptanması (örneğin SCGE testi)
- Kromozom aberasyonlarının saptanması
- Mikroçekirdek testi
- Anöploid saptanması
- Telomer kısalığının saptanması
- Apürinik bölgelerin saptanması
- DNA eklerinin saptanması
- DNA oksidasyonu saptanması
- DNA metilasyonu saptanması
- Nükleer p53Nokta mutasyon tahlili (HPRT)
- Mitokondrial DNA mutasyonu saptanması
- Germ hücrelerinde DNA hasarı saptanması

Teorik olarak kanser yolağındaki biyolojik belirteçlerin, kanser riskini ve varlığını göstermesi beklenmektedir. Ancak çoğu zaman biyolojik belirteçlerin sonuçları benzer olgularda farklılıklar göstermesi nedeniyle sensitivite ve spesifitesi henüz net olarak saptanamamaktadır. Çünkü kanserojen etki kimyasal yapıya, doza, sürece ve kişisel özelliklere göre değişmektedir. Çeşitli nedenlere bağlı olarak benzer kanser riski taşıyan bireylerin bir kısmında hastalığın ortaya çıkması, farklı seyretmesi, tedaviye farklı yanıtlar vermesi ve biyomoleküler göstegelerdeki uyumsuz sonuçlar metabolik yolun ne kadar komplike olduğuna işaret etmektedir.

Bu sürecin komplike olmasını sigara içme ve sonucunda gelişen kanser vakaları ile değerlendirecek olursak; kanser gelişiminde klinik belirteç olarak kullanılabilecek değerler arasında, maruziyet için içilen sigara miktarı, maddenin kandaki dozu (örn. kotinin konsantrasyonu), moleküler dozu (örn. örneklenen dokunun DNA'sındaki PAH miktarı), hastalık gelişmeden önce ortaya çıkan biyolojik etkileri (kromozomal aberasyonlar (CA), tümör süpresör geni inaktivasyonu), DNA'nın onarımı, mevcut karsinojenin vücuttaki metabolizması ve apoptotik yolak (örn. P53) genlerinin aktivitesini değiştiren polimorfizmler ve nihai olarak klinikte bazı bireylerde hastalık tanısı konulurken bazı bireylerde ise kanser gelişiminin gözlenmemesi sayılabilir.

Ayrıca kanser gelişimi, hipermutasyona yol açan çoklu mutasyonları içerdiğinden genetik bozulmayı gösteren tek bir biyolojik belirtecin (p53 düzeyi veya apoptozun inaktivasyonu vb.) ne kadar yeterli olduğu bilinmemektedir(Fenech, 2002).

Biyogöstergelerin kanser riski taşıyan veya kansere spesifik dokularda incelenmesi sonuçların daha güvenilir olmasını sağlar. Ancak bu her zaman mümkün olmadığından çoğu zaman riskli doku ile benzer DNA hasarı gösteren, kolay ulaşılabilir hücrelerde araştırılmaktadır. Bu amaçla meme, prostat, kolon kanseri riskini belirlemek için eritrosit, lökosit gibi kan hücreleri veya sürüntü ile alınabilen hücreler kullanılmaktadır(Majer ve ark., 2001; Jois ve ark., 2010).

Erken biyolojik etki ile hastalığın başlangıç sürecinde organizmada meydana gelen fizyolojik, biyokimyasal veya davranışsal değişimlerin biyogenetik değerlendirilmesi hastalık riskinin belirlenmesinde ve hastalık oluşumundaki olası yolların aydınlatılmasında oldukça önemlidir. Kanser riskinin değerlendirmesinde, kanser hücrelerinde ve pek çok gelişimsel anomalilerde yaygın olarak kullanılan kromazomal aberasyon yöntemi diğer biyogöstergeler arasında altın standart olarak tanımlanmıştır. Bu özellik kromozomal aberasyonun indüksiyon mekanizmalarının çok iyi bilinmesi ve çoğu çevresel toksik maddenin kromozomal aberasyonu indüklemesi ile açıklanmaktadır. CA kansere bağlı morbidite ve mortalitenin takibinde kullanılmaktadır. Kromozomal aberasyonun bir versiyonu olan mikroçekirdek yöntemi de erken biyolojik etkinin gösterilmesinde en az kromozomal aberasyon kadar sık kullanılmaktadır. Çevresel mutajenik ajanlara maruziyet sonrası mutasyona uğrayan genle ilişkili hastalıklarda kullanılan HPRT, HLA, GPA ve TCR gen mutasyon teknikleri gibi raportör gen mutasyonları da erken biyolojik etkinin gösterilmesinde kullanılan biyogöstergeler arasındadır (Brusick, 1980).

Erken biyolojik etkinin gösterilmesinde kullanılan diğer biyogöstergeler, metabolizasyonda yer alan genlerin ifade edilmesi, DNA onarım genleri veya spesifik enzimler gibi değişmiş gen ekspresyonlarının ölçülmesidir. Tek hücre jel elektroforezi ya da popüler adıyla comet tekniği, DNA sarmal kırıklarının ölçülmesinde kullanılan pratik bir tekniktir. Ancak anlamlı biyolojik etkilerin gösterilmesi için comet tekniğinin yayınlanmış diğer biyogöstergeler tarafından doğrulanması gerekmektedir (Albertini, 2004).

Genetik yatkınlığın araştırılmasında kullanılan duyarlılığın biyogöstergeleri ile toplumda hastalıklara karşı daha yüksek risk taşıyan bireylerin tespitinin yanı sıra bazı kimyasalların aktivasyon/detoksifikasyonunda rol oynayan enzimlerin aktivitelerini ve özel hasar tipindeki DNA onarım kapasitelerini de belirlemek mümkün olmaktadır. Hasarlı DNA'nın onarılamaması kanser oluşumunun temel mekanizması olarak kabul edilmektedir. Özellikle endüstriyel kirliliğin fazla olduğu ortamlarda çalışan bireylerde karsinogenik riskli olguların belirlenmeleri, takipleri ve gerekirse tedavi dozlarının olguya özel hazırlanmasında duyarlılığın tespiti çok önemlidir (Au ve ark., 1996; Au ve ark., 2001; Au ve ark., 2010).

Bazı germline tümör süpresör gen mutasyonları kalıtsal kanserlerle ilişkilidir. Bunlar sporadik kanserlerde de mutasyona uğrayabilirler (Berwick ve Vineis, 2000). Tümör süpresör genleri ve onkogenler gibi kanser gen mutasyonları da kanserle ilgili olduğu tahmin edilen ve kanserin öngörülmesinde kullanılan biyogöstergelerdir. Ancak yayınlamış olan çalışmalarda elde edilen veriler henüz bu tahminleri doğrulamak için yeterli değildir (Fenech, 2002).

*In vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile gösterildiği gibi çevresel mutajenlere benzer maruz kalma koşulları altında bile biyogöstergelerin ifadesinde bireyden bireye önemli farklılıklar görülmektedir. Biyogöstergelerin ifadelerinde ve kontrollü *in vivo* çalışmalarda bireyler arasındaki anlamlı farklılıklar karmaşık biyolojik işlemlere bağlanmıştır. Sonuç olarak bazı bireyler çevresel mutajenlere duyarlı ve bazıları ise dirençlidir. Duyarlılığa ait faktörler, genel olarak edinilen ve genetik yatkınlık olarak sınıflandırılabilir (Norppa, 2003; Au, 2004; Sabbioni ve ark., 2006).

İlk sınıflandırmaya yani maruziyetin biyogöstergelerine sigara alışkanlığı, yetersiz ve dengesiz beslenme, kronik enfeksiyonlar, yaşlılık gibi bireyin yaşam deneyimleri örnek olarak verilebilir. İkinci sınıflandırmaya (erken biyolojik etkinin biyogöstergeleri) da kimyasalların metabolizması ve DNA onarımı gibi önemli olayları etkileyen kalıtsal genlerin çeşitliliği örnek olarak verilebilir. Bu nedenle edinsel ve kalıtsal yatkınlık faktörlerinin varlığı Şekil 7'de birçok biyogöstergenin ifadesini etkilemektedir.

#### 4.8 Mikroçekirdek Testi

#### 4.8.1 Mikroçekirdek testi tarihsel gelişimi

Mikroçekirdek, ilk olarak 19. yüzyılın sonunda Howell ve Jolly'nin kedi ve sıçan kanlarında küçük inklüzyonlar bulmalarıyla keşfedilmiştir. Günümüzde Howell-Jolly adlı bu küçük inklüzyonlar, şiddetli anemi hastalarının periferik kan eritrositlerinde de görülmektedir(Hayashi, 2016).

1959'da Evans ve ark., fasulyelerin kök uçlarında gama ışınlarının mikroçekirdek artışına sebep olduğunu görmüş ve oluşan kromozomal anomalileri değerlendirmeye çalışmıştır. Bu sayede normal hücreler arasında mikroçekirdek barındıran hücrelerin frekansı ile kromozomal sapmayı değerlendiren ilk raporu hazırlayarak, kromozomal parçaların yaklaşık % 60'ının mikroçekirdek oluşumuna katkıda bulunduğunu öne sürmüştür (Hayashi, 2016).

1970'de Boller ve Schmid, normal eritrositler arasındaki mikronükleer eritrosit frekansını değerlendirmek için bir test yöntemi geliştirmiş ve bu yöntemi makalede, "Mikrokern-Test (mikroçekirdek testi)" olarak adlandırmışlardır (Hayashi, 2016).

Mikroçekirdek testi, Countryman ve Heddle tarafından 1976'da insan lenfositleri kullanılarak geliştirmiş daha sonra Fenech ve Moley tarafından sitokasazin B kullanılarak yöntemde değişiklikler yapılmıştır (Hayashi, 2016).

Cole ve ark. ve King ve Wild (1979),gebe farelere intraperitoneal klastojenik kimyasal madde uygulandığında, fetal fare karaciğer ve periferik kan hücrelerinde mikroçekirdek indüksiyonunu gözlemlemişlerdir (Hayashi, 2016).

1980'de MacGregor ve ark. mikroçekirdek içeren eritrositlerin dalak tarafından hızla ve etkili bir şekilde yakalanıp yok edildiğini bu sebeple sıçanların ve insanların periferik kanlarında pek görülemeyeceğini fakat farelerde bu durumun böyle olmadığını belirterek fare periferik eritrositlerinde mikroçekirdek tespiti için bir sitok bildirmişlerdir(Hayashi, 2016).

1981 ve 1983'te Lähdetie ve Tates, erkek germ hücrelerini kullanan bir rapor yayınlayarak, kimyasalların kalıtsal yan etkilerinin potansiyelini saptamak için mikroçekirdek testinin kullanılma olasılığını ileri sürmüşlerdir (Hayashi, 2016).

1983'te ABD-EPA Gene Tox Programının (Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı, United States Environmental Protection Agency) mikroçekirdek komitesi, o zamana kadar mikroçekirdek testi ile analiz edilen kimyasalları

değerlendirerek sonuçlarını içeren kapsamlı bir özet bildirmiştir. Aynı yıllarda, kısa vadeli çalışmaları değerlendirmek için Uluslararası Kimyasal Güvenlik Programı (IPCS) tarafından uluslararası bir işbirliği programı başlatılmıştır. Kanserojen olan ve olmayan maddeler çeşitli test sistemleri ile değerlendirilmiş ve mikroçekirdek testi kimyasalların klastojenik aktivitelerini tahmin etmede en iyi puanı elde etmiştir (Hayashi, 2016).

1983'te Mikroçekirdekleri ve olgunlaşmamış eritrositleri tanımlamak amacıyla ilk olarak Hayashi ve ark., DNA'dan yayılan sarımsı yeşil flüoresansla eş zamanlı olarak olgunlaşmamış eritrosit RNA'larından yayılan kırmızı flüoresan oluşturan akrinin turuncu boyasını, daha sonra MacGregor ve ark., ise UV ışık altında DNA'ya spesifik mavi floresan ışık yayan Hoechst 33258 boyasını ve yeşil aydınlatma altında hem RNA hem de DNA lekelerinin kırmızı-turuncu floresan ışık yaymasını sağlayan pyronin Y boyasını kullanarak floresan boyama yöntemlerini oluşturmuşlardır (Hayashi, 2016). Daha sonra, nükleer bölünmeden sonra sitoplazmik bölünmeyi önlemek için iğ iplikçiklerinin bir inhibitörü olan Sitokalazin-B'nin (Cyt-B) kullanıldığı bir sitokinez-blok mikroçekirdek testi oluşturulmuştur. Sitokinezi Bloke Edilmiş Mikroçekirdek (Cytokinesis Blocked Micronuclei, CBMN) Testinin X-ışınıyla indüklenen kromozom hasarının incelenmesinde diğer yöntemlere göre daha verimli olduğu kanıtlanmıştır. Testin en büyük avantajı, klastojenik ve/veya anojenik tedavi sonucunda oluşan MN'yi ayırt etme kabiliyetidir (Luzhna ve ark., 2013). Hücrenin bölünmesine devam edildiğinde mikroçekirdeklerin sitokinezden sonra kaybolduğu görülmüştür (Thomas ve ark., 2003). Bölünmüş hücrelerin bloke edilmesi, kromozomal kayıp, kromozomal kırılma ve nükleoplasmik köprüleri (NPB) tanınmasını mümkün kılar (Luzhna ve ark., 2013).

1986'nın başlarında, mikroçekirdekli eritrositlerin analizi için flow sitometri ve görüntü analiz sistemleri kullanılmaya başlanılmıştır. Flow sitometri, çok düşük doz seviyesinde ve kısa bir süre içinde çok sayıda hücre analiz edebildiğinden tercih edilmiştir (Luzhna ve ark., 2013).

1988'de mitotik aparatın bozulmasına neden olan kimyasalları tespit etmek için antikör kullanılarak kinetokor boyama tekniği kullanılmıştır. Hayashi ve ark. , mikroçekirdeği periferik kandan ayırmak ve mikroçekirdeklerin sentromere sahip

olup olmadığını ayırmak için kullanılan bir metot yayınlamışlardır (Luzhna ve ark., 2013).

1990'da ABD-EPA Gene Tox Programı komitesi 1983 raporunun revize edilmiş bir baskısını yayınlamıştır. Aralık 1992'de organizatörler ve başkanlar Uluslararası Genotoksisite Test Prosedürleri Standartları Çalıştayı'nın (IWGT) ön toplantısı olarak Tokyo'da bir araya gelerek bir atölye çalışması düzenlemişlerdir. 1993 yılında, 6. Uluslararası Çevre Mücadelesi Konferansına bağlı olarak Melbourne'da iki gün süreyle uluslararası atölye çalışması yapılarak rapor edilmiştir(Hayashi, 2016).

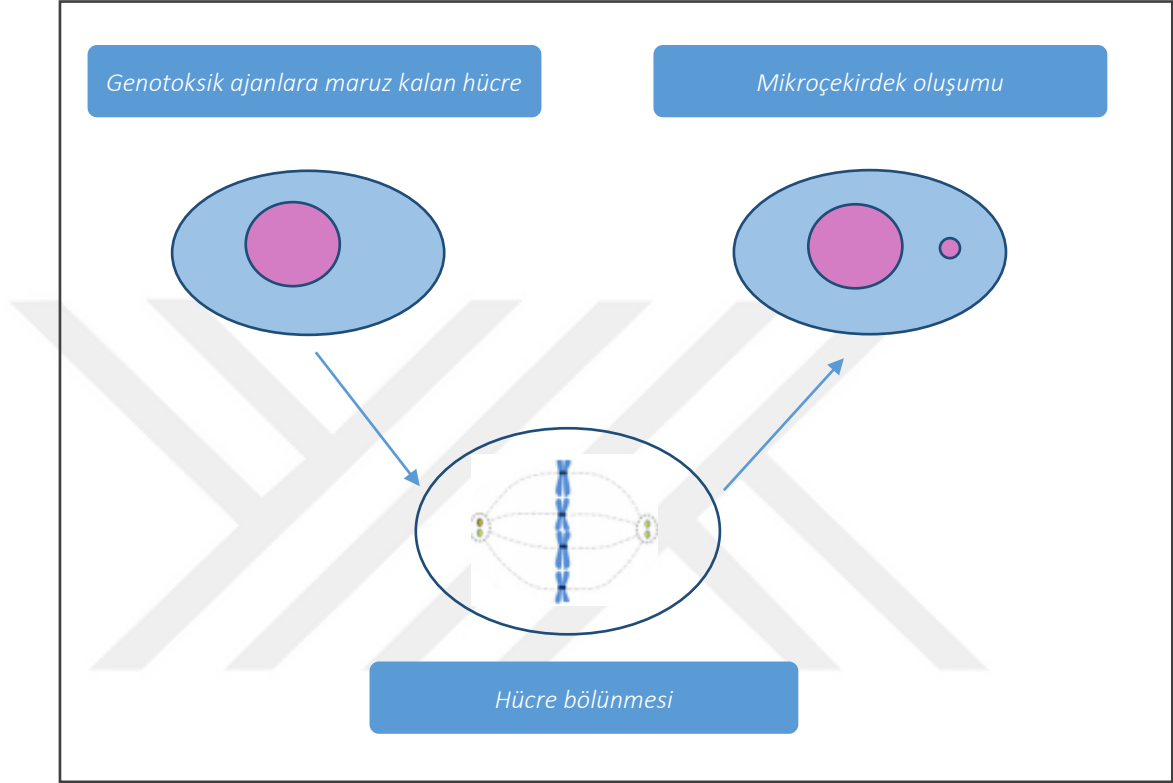
1997'de kurulan insan mikroçekirdek (HUMN) projesi, insan popülasyonlarında mikroçekirdek (MN) frekansının incelenmesi ve skarlama kriterlerinin etkilerinin değerlendirilmesini amaçlayan uluslararası bir işbirliği programıdır (<http://www.humn.org>). Projenin odak noktası, maruz kalan ve kalmayan kişilerden alınan periferik kan lenfositlerinde MN'nin analizidir. HUMN projesinin nihai hedefleri, metodolojileri standartlaştırmak, başlangıçtaki MN sıklık oranlarını tanımlamak, demografik, genetik ve metodolojik faktörlerin bu frekanslar üzerindeki etkilerini karakterize etmek ve farklı dokulardaki MN frekanslarının kanser riskini öngörüp görmediğini belirlemektir. 21 ülkenin bulunduğu 34 laboratuvar tarafından üstlenilen doğrulama çabasıyla sitokinesis-blok MN analizinde değişkenlik kaynaklarını değerlendirilmiş ve lenfositler için skarlama kriterlerinin ayrıntılı bir tanımını sunulmuştur(Holland ve ark., 2008).

Yakın zamanda, 10 ülkeyi temsil eden 20 laboratuvardan toplam 6700'den fazla denekten oluşan veritabanının prospektif analizinden elde edilen sonuçlar, insan lenfositlerinde artan mikroçekirdek frekansının kanser riski artışını gösterdiğini doğrulayarak mikroçekirdek testinin kanser araştırmalarındaki önemini ispat etmiştir(Holland ve ark., 2008). Günümüzde sayısız çalışma, DNA lezyonlarının ölçümü ve olası kimyasal ve radyoaktif bileşiklerin genotoksisitesini incelemek için mikroçekirdek skarlamaına başvurmaktadır.

#### **4.8.2 Mikroçekirdek formasyonu**

Mikroçekirdekler, bölünmekte olan hücrelerin anafaz evresinde bölünmesi duran asentrik kromatid/kromozom veya bütün kromatid/kromozomlardan köken alan ve

telofaz evresinde ana çekirdeğe dahil olmayan küçük ekstra-nükleer cisimlerdir (Şekil 9 ). Boyutları daha küçük olmakla hücre bölünmesi sonunda sitoplazmada hücre çekirdeğinden ayrı olarak membranla çevrili bir yapı oluştururlar(Sedelnikova ve ark., 2007; Fenech ve ark., 2011).

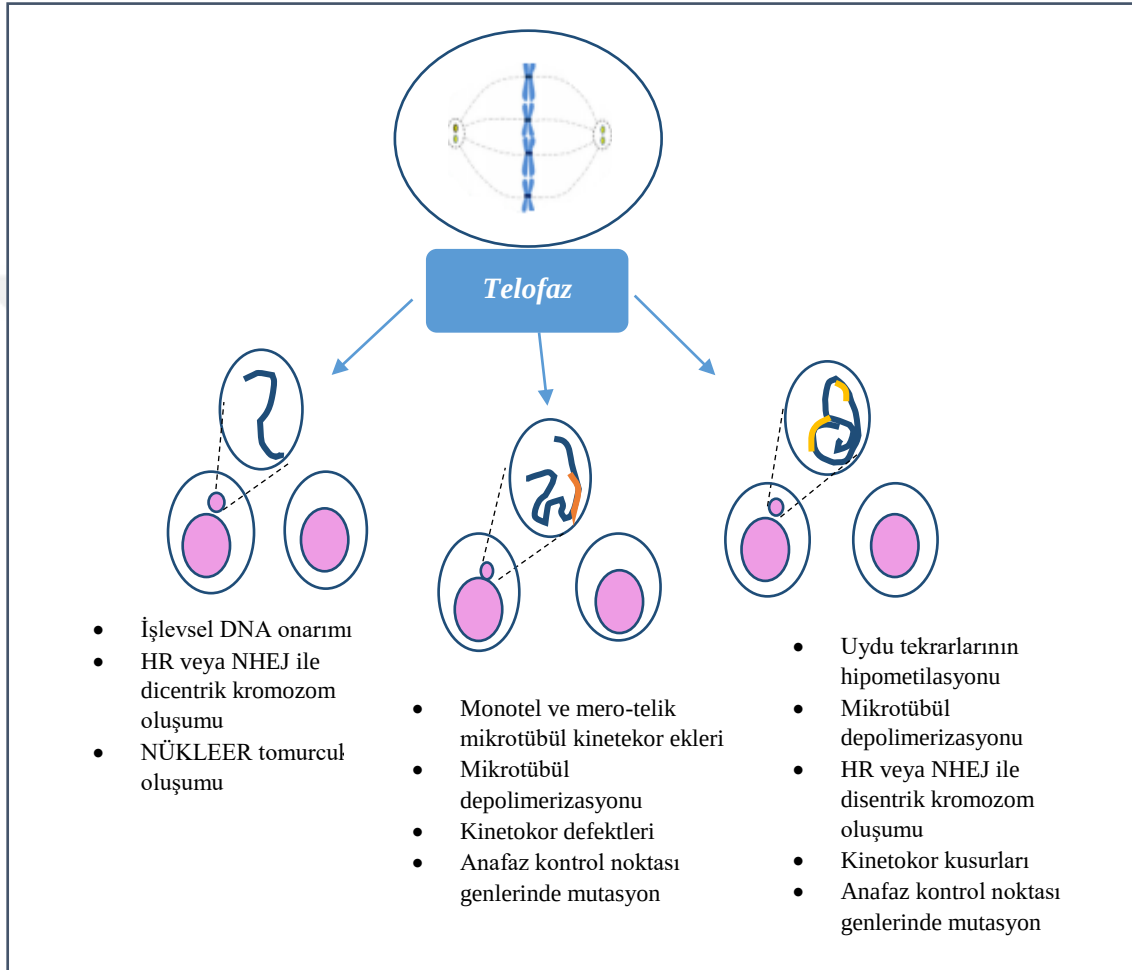


**Şekil 9.** Genotoksik ajana maruz kalan hücredeki mikroçekirdek oluşumu(Luzhna, Kathiria ve ark. 2013)

Asentrik kromatid/kromozom fragmanları genellikle çift zincir hasarı gibi yoğun DNA hasarlarından sonra ortaya çıkarlar. MN'deki bütün kromatidler veya kromozomlar, çoğunlukla anafaz evresinde kromozom ayırımındaki hatalar sebebiyle ortaya çıkar. Bu duruma da mitotik içcik aksaklıkları, kinetokor hasar, sentromerik DNA hipometilasyonu ve hücre döngüsünün kontrol sistemindeki kusurlar sebep olur. Mikroçekirdek oluşum şekli öncelikli olarak hücrelerin karsinojen maddeye nasıl maruz kaldığına bağlıdır. Kimyasala tek doz veya kısa süreli maruziyete uğrayan dokular, kronik maruziyete uğrayan dokulara kıyasla farklı bir görünüm sergileyecektir. MN sayısı, ya kromozom hasarı sonucu hücre ölümüyle ya da hücre

bölünmesi sırasında mikroçekirdek kaybı nedeniyle zamanla azalır(Luzhna ve ark. 2013).

Bir asentrik fragman oluşturmak için, DNA çift zincir hasarı ya bir kardeş kromatidinde oluşmalı ya da tüm anafaz kromozomunda gerçekleşmelidir (Şekil 10).



**Şekil 10.** Asentrik fragman oluşumu(Luzhna ve ark., 2013)

Bu, ancak çift zincir hasar seviyesinin, bölünen hücrelerin tamir kapasitesini aşması durumunda olur; bu durum da, esasen çift zincir hasarlarının disfonksiyonel homolog rekombinasyonu sonucu oluşan tamir hataları veya non-homolog uç birleştirme yolağı (NHEJ) kusurları sonucu oluşur (Hartlerode ve Scully, 2009).DNA çift zincir hasarlarının ve MN'nin oluşumu genellikle eşzamanlı eksizyon hasar



onarımı ve yanlış baz eşleşmesi sonucu gerçekleşir. DNA kırıklarının onarımındaki hatalar da çift zincir hasarlarına yol açar (Dianov ve ark., 1991).

Kardeş kromatidlerin ayrışma sorunları, genellikle iğ mikrotübüllerinin kromozom kinetokorlarına bağlanmaması ya da hatalı bağlanmasına bağlı olarak ortaya çıkar. Kararlı amfitelik mikrotübül bağlanmalarının oluşması, kinetokorlarda gerilim oluşturarak kromatid yerleşmesinin doğru bir şekilde gerçekleşmesini sağlar. Sintelik (her iki kardeş kromatidinin aynı iğ kutbuna bağlanması), monotelik (ikinci kardeş kromatidi bağlanmamış haldeyken sadece bir kinetokor bağlanmıştır) veya merotelik (bir kinetokor her iki iğ kutbuna da bağlıdır) gibi dengesiz mikrotübül kinetokor bağlantıları ciddi derecede gerilmeye neden olur böylece oluşan bağ çözülmeye yatkın hale gelir (Şekil 10). Bu tür bağlanmalar düzeltilemez ise düzensiz ayrışma ve kromozom kaybına yol açarak, anöploidi ve mikroçekirdek oluşumu ile sonuçlanır (Şekil 4)(Luzhna ve ark., 2013).

Fenech ve ark.'na göre, kromozomların hatalı ayrımına bağlı MN oluşumunun sebebi sentromerik ve parasentromerik bölgelerin hipometilasyonu ve uydu tekrarlanmalarıdır. Genellikle, uydu bölgeler hipermetile haldedir ve metilasyon kaybı tekrar bölgelerini uzatarak kinetokorlardaki gerilimi azaltır ve dolayısı ile mitotik iğ ve kromozomların mikrotübülleri arasında sorunlu bağlantılar oluşur (Fenech ve ark., 2011). Bazen, kromatidler/kromozomlar, tübülün depololimerizasyonu nedeniyle mitotik iğcikler işlev gösteremediği için ayrılamaz. Kinetokorun veya sentromerik kusurların olması da telofaz evresindeki kromozomların ayrışmasını geciktirir (Şekil 3)(Luzhna ve ark., 2013).

Nükleer tomurcuklanmalar (NBUD) ve NPB'ler mikroçekirdeğe benzer yapılardır (Fenech ve ark., 2011). Çift zincir hasarı disentrik kromozomlardan yani iki sentromerik bölgeye sahip olanlardan oluşur. Disentrik kromozomlar, farklı kromozomların tamamlayıcı DNA dizileri arasındaki homolog rekombinasyondan ya da DNA çift zincir hasarına (DSB) bağlı iki kromozom arasındaki homolog olmayan uç birleşmesinden (NHEJ) dolayı oluşur (Obe ve ark., 2002). Benzer şekilde NHEJ, telomer kısaltılması sırasında uygunsuz şekilde kapsüllenmiş telomerler oluşumu ile de gerçekleşebilir. Telomerde 3' tek sarmal uzantısı uygun şekilde kapatılmazsa,

kırık bir DNA molekülü (NHEJ mekanizması ile düzeltilmesi gereken) olarak kabul edilir (Luzhna ve ark., 2013).

İki sentromere sahip disentrik kromozomlar, kromatidi zıt yönde çeken iki zıt iğ ipliği gövdesine bağlanabilir. Kırılmanın gerçekleşmemesi durumunda, nükleer membran, aralarında nükleoplazmik köprü oluşan her iki çekirdeğin de etrafını sarar. Sitokinezis esnasında kırılan nükleoplazmik köprü mikroçekirdek oluşumuna neden olur (Şekil) (Fenech ve ark., 2011). İki kromozomal kırılmanın yanlış tamiri, hem disentrik hem de asentrik fragmanların oluşumuna neden olur. İkincisi, kendi MN'sini oluşturacaktır (Şekil 3). Telomer füzyonu nükleoplazmik köprülere (NPB) neden olur ve bu da kopma sonrası MN şeklinde, kardeş çekirdeklerden birine eşlik eder. Telomer füzyonundan sonra oluşan MN ve NPB'ler, subtelomerik bölgelere hibridize olan spesifik problemler tarafından tanımlanabilen telomerik dizileri içerir. Bunun karşılık, DNA çift zincir hasarlarının hatalı tamirinden oluşan MN ve NPB'ler telomer negatiftir (Fenech, 2007).

Anafaz köprüleri, kromozomal istikrarsızlığın özelliklerinden olan kırık-füzyon-kırık (BFB, bridge-fusion-break) sikluslarındaki başlangıç olaylarıdır. NPB'lerin eşit olmayan şekilde kırılması, iki kardeş çekirdek oluşmasına yol açar; bunlardan birisi fazladan genetik bilgi içerir, ikincisi ise eşit miktarda eksik genetik bilgi içerir. Böyle kırık kromozomlar genellikle telomerik zonları içermezler ve bu nedenle bir sonraki mitotik olay sırasında kopyaları ile kaynaşarak sonraki bölünmeler için aynı döngüyü tekrarlayabilirler. BFB döngüleri, sonunda anormal kromozomun dışına atılan ve böylelikle de double minute (DM) olarak adlandırılan kırılma noktasının yakınında gen amplifikasyonuna yol açar. DM kromozomları, özellikle çekirdeğin çevresinde yerleşir ve S fazında nükleer tomurcuklanma ile çekirdekten dışarı atılır (Shimizu ve ark., 1998). NBUD, dar bir sitoplazmik geçiş yoluyla çekirdeğe daha yakın konumda ve bağlantılı olması haricinde, mikroçekirdek ile hemen hemen aynı yapıdadır. NBUD, aynı zamanda, sentromerik veya telomerik bölgeler olmaksızın interstisyel veya terminal fragmanları içerir (Dutra ve ark., 2010).

MÇ oluşum mekanizmalarını kısaca özetlemek gerekirse, MÇ'ler tamir edilmemiş veya yanlış tamir edilmiş DNA kırılmalarının sonucu oluşan asentrik kromatidleri veya kromozomları içerir, ancak bununla birlikte bütün kromatid

kromozoma sahip MÇ'ler, (a) uydu centromeric /parasentromerik sekansların hipometilasyonu (b) kinetokor defektleri, (c) disfonksiyonel içcik ve (d) anafaz kontrol noktası genlerinde mutasyonlar sonucu oluşur (Şekil 3). NPB'ler yanlış tamir edilmiş DNA kırılmaları sonucu, telomer uç füzyonu, ya da kardeş kromatidlerinin dektenasyon eksikliği sebebiyle ayrılmaması sonucunda oluşur. Son olarak, nükleer tomurcuklanma, amplifiye DNA'nın BFB döngüleri yoluyla veya poliploid hücrelerde artık kromozomların spesifik olarak eliminasyonu yoluyla gerçekleşir (Wang ve ark., 2004).

#### 4.8.3 Bukkal mikroçekirdek

Bukkal epitelde mikroçekirdek sitom (BMCyt) testi, insanlardaki aerodijestif sistem hücrelerinde genomik hasar, hücre ölümü ve sitostazi değerlendirmek için düşük maliyetli, minimal invaziv bir yaklaşımdır. 1980'den beri başarılı bir şekilde uygulanan yöntem ile mikroçekirdek sıklığı ölçülerek, inhalasyon veya direkt temas yolu ile tehlikeli maddelere maruziyet, DNA onarım yollarındaki genetik hasar ve yaşam tarzına bağlı oluşan genotoksik etkiler değerlendirilebilmiştir (Vondracek ve ark., 2001; Thomas ve ark., 2009).

Sitom yönteminde ek yöntemlerin uygulanması, daha fazla hücre patolojisi değerlendirme imkanını sunarak BMCyt analizinin kapsamını ve kullanımını daha da genişletmiştir. Aynı zamanda, BMCyt testi kullanılarak, Down sendromu (DS) ve Alzheimer gibi hastalıklarda belirli nükleer anomaliler ve sitom profilleri ilişkilendirilerek, bu hastalıklara yakalanma riski olan bireylerin tanımlanması sağlanabilir (Thomas ve ark., 2009).

Kontrol popülasyonlarındaki MÇ frekanslarının baz değerleri (0.10-40.00) arasında değişmekte olup, Güney Asya popülasyonlarında bildirilen yüksek değerler tütün çiğneme gibi tipik yaşam tarzı alışkanlıklarıyla ilişkilidir (Fenech, 2007; Holland ve ark., 2008; Fenech ve ark., 2011). Bu değişkenliğin başlıca nedeni muhtemelen farklı boyama yöntemleri ve skorlama kriterlerinin kullanılmasıdır. DAPI veya yaygın olarak kullanılan Feulgen gibi DNA'ya özgü boyalara kıyasla Giemsa gibi spesifik olmayan boyaların kullanımı yanlış pozitif sonuçların oluşmasına yol açmaktadır. Çünkü Giemsa boyaması ile bukkal hücrelerde DNA dışı

MN benzeri yapılar boyanmaktadır oysa DNA ile spesifik mikroçekirdeklerin boyanması gerekmektedir. Bukkal hücrelerde DNA'ya spesifik boyalarla boyanmış MN benzeri yapıların yanı sıra, DNA'ya spesifik olmayan boyalarla boyanmış MN benzeri yapıların görülmesinin nedeni bilinmemektedir ve bu anomalileri yaratan mekanizmaların anlaşılabilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca yöntem, mononükleotid hücrelerde MN frekansı, nükleer tomurcuklanma, nükleoplazmik köprüler, nekroz ve apoptoz gibi sitotoksikite belirteçlerinin değerlendirilmesiyle ilgili de kapsamlı yaklaşımlar içerir (Thomas ve ark., 2009).

Bukkal epitelde mikroçekirdek sitom testi ile değerlendirme yapılan hücre çeşitleri 6 gruptan oluşmaktadır. Bunlar;

**(a) Bazal hücreler**, oval veya yuvarlak şekilde ve diferansiye hücelere göre büyük çekirdek/sitoplazma oranına sahiptirler. Genellikle diferansiye hücelere göre boyutça daha küçüktürler. (Şekil 11a ).

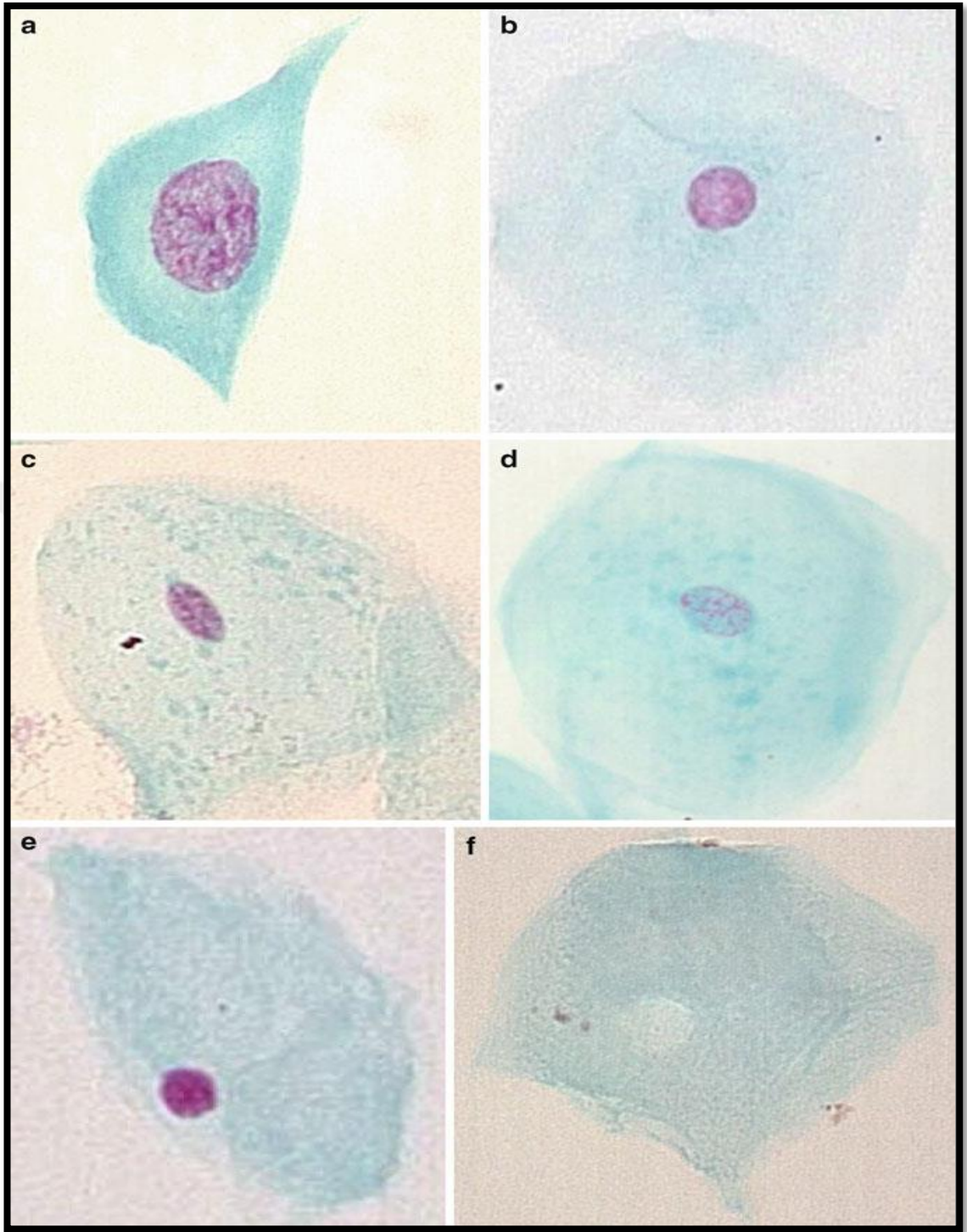
**(b) Farklılaşmış (diferansiye) hücreler**, köşeli ve yassı olup bazal hücelere kıyasla daha küçük bir çekirdek sitoplazma oranına sahiptir. Bazal hücelerden daha büyüktürler. (Şekil 11b).

**(c) Kromatin yoğunluğu yüksek olan bukkal hücreler**, çekirdekte sıklıkla birbirine paralel yerleşimli paketlenmiş kromatin alanları içeren diferansiye hücelerdir (Şekil 11c).

**(d) Karyorektik hücreler**, nükleer parçalanmayı işaret eden aşırı nükleer kromatin çöküntüleri ile karakterizedir. (Şekil 11d).

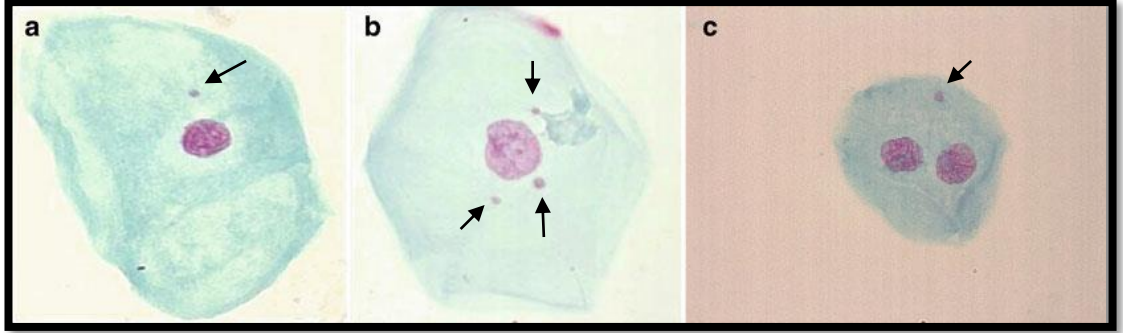
**(e) Piknotik hücreler**, yoğun ve üniform boyanmış küçük çekilmiş bir çekirdeğe (normal bir çekirdeğin çapının 1/3-2/3 arası büyüklükte) sahiptirler. (Şekil 11e).

**(f) Karyolitik hücreler**, Feulgen negatif, hayalet benzeri görüntüler gibi görünen DNA'nın tamamen yok olduğu çekirdeklere sahiptirler. (Şekil 11f).



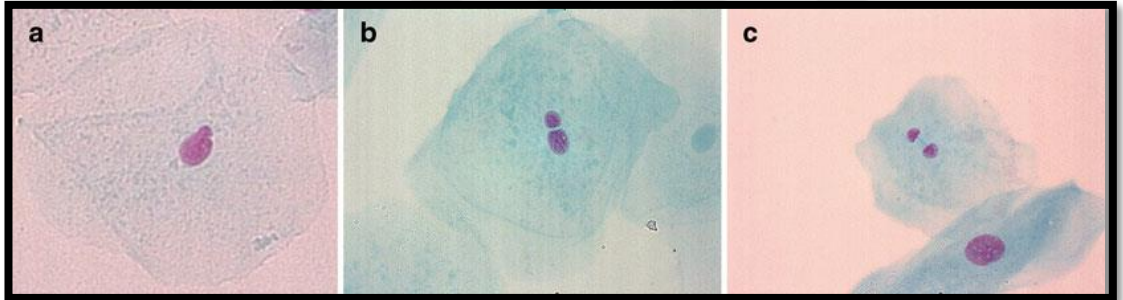
**Şekil 11.** Bukkal epitelde mikroçekirdek sitom testi ile değerlendirme yapılan hücre çeşitleri (Thomas ve ark., 2009).

#### 4.8.3.1 Mikroçekirdekler ve Köprüler



**Şekil 12.** Mikroçekirdek yöntemi ile Yanak epitel hücrelerinde değerlendirilen mikroçekirdeklerin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri(Thomas ve ark., 2009).

Mikroçekirdekler, ana çekirdek ile aynı doku ve boyanma yoğunluğuna sahip olan, ancak çekirdeğin 1/3-1/16'sı büyüklüğündeki, ana çekirdek ile bağlantısı olmayan yuvarlak ya da oval Feulgen pozitif yapılardır. (Şekil 12a-c).



**Şekil 13.** Mikroçekirdek yöntemi ile Yanak epitel hücrelerinde değerlendirilen köprülerin ışık mikroskobu altındaki görüntüleri(Thomas ve ark., 2009).

Nükleer tomurcuklar ana çekirdeğe bağlı küçük Feulgen pozitif cisimler veya çekirdeklerin küçük çıkıntıları olarak görünürler. Tomurcuklar genellikle ana çekirdeğin 1/3-1/16 çapındadırlar, ancak bazı durumlarda ana çekirdeğin 1/2'sinden daha büyük olabilir. (broken eggs; Şekil 13a-c).

## 5. GEREÇ VE YÖNTEM

### 5.1 Çalışma ve Kontrol Grupları

Çalışma protokolü Marmara Üniversitesi klinik araştırmalar etik kurulu tarafından kabul edildi. Bu araştırma 2017 yılında Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasotik Toksikoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. Çalışmanın 2 farklı grupta yürütülmesi planlandı. Çalışma grubu olarak 18-25 yaş arası sigara içen genç bireylerden (n=25) ve kontrol grubu olarak demografik özellikler bakımından çalışma grubu ile uyumlu sigara içmeyen genç bireylerden (n= 44) bukkal hücre örnekleri toplandı(Tablo7). Örnekler çalışma gününün sabahında aç karna bireyler ağızlarını su ile çalkaladıktan sonra, nemli tahta abeslang ile sağ ve sol her iki yanak içinden süprüntü şeklinde alındı. Kontrol grubu ve hasta grubunu oluşturacak bireyler öncelikle çalışma hakkında bilgilendirilerek ve gönüllü olarak bu çalışmaya katılmayı kabul edenlerden bilgilendirilmiş gönüllü olur formu alındıktan sonra çalışmaya dahil edildi.

**Tablo 7.** Çalışmada oluşturulan grupların sigara kullanımı ve cinsiyet bakımından dağılımı.

|                       | KADIN | ERKEK | TOPLAM |
|-----------------------|-------|-------|--------|
| <b>SİGARA İÇEN</b>    | 9     | 16    | 25     |
| <b>SİGARA İÇMEYEN</b> | 13    | 31    | 44     |
| <b>TOPLAM</b>         | 25    | 44    | 69     |

### 5.1.1 Çalışmaya dahil edilme kriterleri

Bütüngruplar için ön koşul; araştırmaya katılmayı kabul etmeleridir.

Ayrıca çalışmaya dahil edilen bireylerde dikkat edilen hususlar sırasıyla,

1. Bireyin sigara içtiğinin kabul edilmesi için alt sınır olarak günde en az 5 ve en az 1 yıldır sigara içmesi şartı arandı.
2. Herhangi bir kronik hastalığı olmaması.
3. Çalışmaya gönüllü olarak katılıp kan örneği vereceğine dair belge imzalamış olması.

Bireyler seçilirken cinsiyet, sosyoekonomik ve sosyo-kültürel duruma bakılmaksızın rastgele örnekleme yöntemi kullanıldı.

Çalışma için 05.05.2017 tarih ve 09.2017.382 sayı ile Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakültesi'nden etik kurul onayı alındı (Ek 1). Bireylerin çalışmada gönüllü olarak yer aldığına, bukkal epitel örneklerinin bu projedeki çalışmalarda kullanılmasını kabul ettiklerine dair gönüllü beyan formu ile onayları alındı (Ek 2).

Her bireye yaş, kilo, boy, sigara kullanma alışkanlığı, son 1 ayda X-ışını maruziyeti, son 1 yılda olduğu aşılar, kullandığı ilaç ve vitaminler, herhangi bir sistemik rahatsızlığının olup olmadığı gibi bilgileri içeren anket formu uygulandı (Ek 3).

### 5.1.2 Çalışmadan çıkarılma kriterleri

Araştırmaya katılmayı başlangıçta kabul etmesine rağmen, kan alımı veya anket doldurma sürecinin herhangi bir yerinde araştırmaya devam etmek istemeyenler araştırmadan çıkartılmıştır.



## 5.2 Yanak Epiteli Hücrelerinde Mikroçekirdek Yöntemi

### 5.2.1 Deneklerden biyolojik materyallerin alınması

Bukkal epitel örnekleri çalışma yürütücüsü olarak tek bir kişi tarafından alındı. Kontrol ve deney grubu bireylerin, aç karına ağızlarını su ile çalkaladıktan sonra ıslak abeslang yardımıyla bukkal epitel hücreleri her iki yanağın iç yüzeyinden sürterek alındı. Distile su ile ıslatılmış ve +4°C’de bekletilmiş ikişer lam üzerine yayıldı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Aynı gün içerisinde, lamlar %80 metanol içinde 10 dakika tutularak fiksasyon işlemi yapıldı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Fiksasyon işleminden sonra boyama işlemleri için saklandı.

#### Kullanılan kimyasal maddeler

- Fast green (Merck)
- Sodyum disülfid ( $\text{NaHSO}_3$ ) (Sigma-Aldrich)
- Hidroklorik asit (HCl) (Merck)
- Aktif kömür (Merck)
- Ksilen (Merck)
- Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ) (Merck)
- Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) (Merck )
- Pararosanilin (Merck)
- Milli Q su

#### Kullanılan araç ve gereçler

- Beher
- Erlen
- Hassas terazi
- Su banyosu
- Şale
- Tahta spatül (Abeslang)
- Süzgeç kağıdı
- Alüminyum folyo

- Huni
- Termometre
- Renkli kapaklı şişe
- Çeker ocak
- Lam
- Lamel
- Mikroskop (Olympus, BX51)
- Vorteks
- Hassas terazi
- Buzdolabı

#### **Analiz için kullanılan çözeltiler**

- %80 metanol çözeltisi
- 1M HCl çözeltisi
- 5M HCl çözeltisi
- Feulgen boyası
- Fast green boyası
- %10 ksilen

#### **Kullanılan çözeltiler ve hazırlanması**

**Fiksatif** :%80'lik metanol fiksatif olarak kullanıldı.80 ml metanol, distile su ile 100 ml hacime tamamlanmış ve iyice karışması sağlanmıştır.

**1N HCl çözeltisi**: Çeker ocak altında917 ml distile su üzerine 83 ml derişik HCl eklenerek çözelti 1000 ml ye tamamlanır.

**5M HCl çözeltisi**:Çeker ocak altında 585 distile su üzerine 415 ml derişik HCl eklenerek çözelti 1000 ml ye tamamlanır.

#### **5.2.2 Feulgen Boyasının Hazırlanması**

1 gram pararosanilin, 100 ml kaynamış Milli Q su içerisine konulup su banyosu içerisinde çözüldü. Çözelti 60°C ye soğutulduktan sonra önceden distile su ile ıslatılmış olan süzgeç kâğıdı ile süzöldü. 20 ml 1N HCl ve 2g NaBisülfıt

karıştırılarak süzünüye eklendi ve parafinle kapatılarak iyice çalkalandıktan sonra 24-48 saat karanlıkta bekletildi. Bekleme süresi sonunda çözeltiye 300 mg Aktif kömür eklenip 1 dak. kuvvetlice çalkalandı (Bu aşamada çözelti şeffaf olduğu gözlemlendi). Son çözelti koyu renkli şişeye süzgeç kağıdı ile süzülerek alındı ve +4°C'de buzdolabında saklandı.

### **5.2.3 Fast Green Boyasının Hazırlanması**

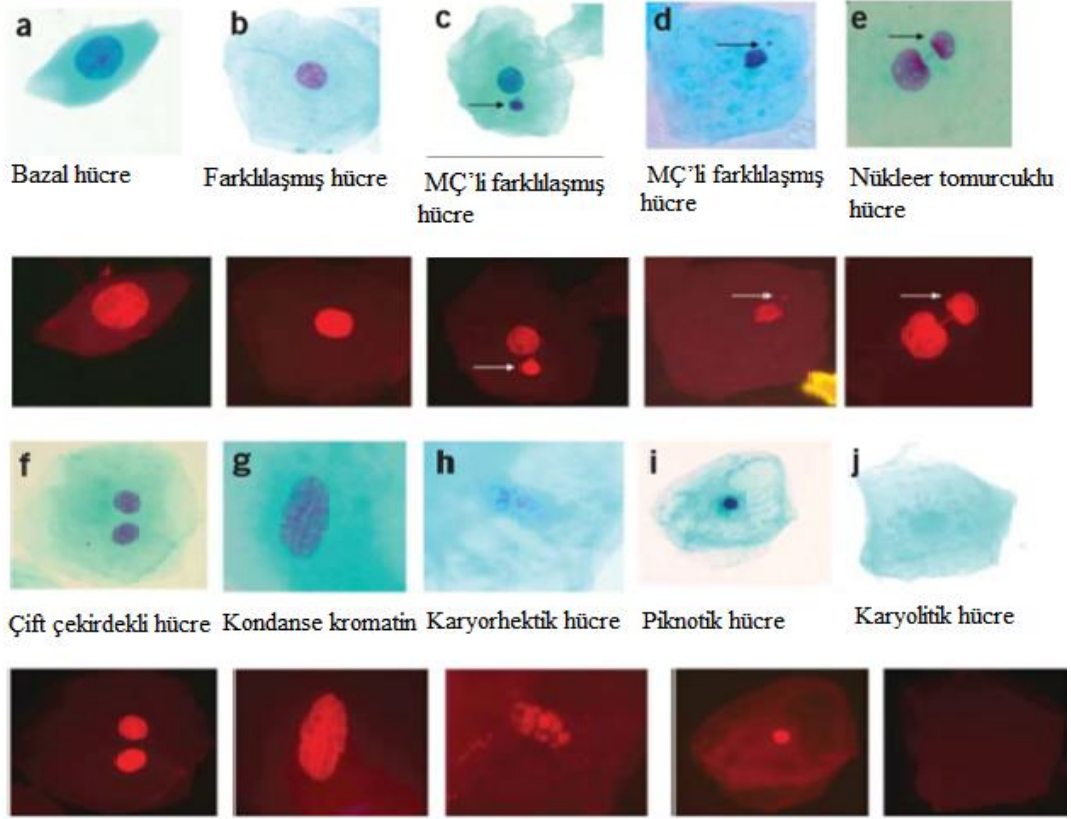
0,5 g fast green tartılıp, 100 ml Milli Q su kullanılarak çözülmüştür. Süzgeç kağıdı (Whatman, Katalog No: 1001-090 ) kullanılarak süzölmüş ve kahverengi şişede, oda sıcaklığında, karanlıkta saklanmıştır.

### **5.2.4 Preparatların Hazırlanması ve Boyanması**

Fiksasyon işleminin ardından, lamalar şaleler içerisine yerleştirilmiş ve Feulgen boyama işlemi(Thomas ve ark., 2009) laboratuvar şartlarında değiştirilerek uygulanmıştır. 5M HCl içerisinde oda sıcaklığında 30 dk. tutulduktan sonra 3 dk. çeşme suyu altında şale içerisinde yıkanmıştır. Tamamen kurutulan lamalar, alüminyum folyo kaplı, kuru ve temiz şalelerin içine alınmış ve 90 dk. Feulgen boyasının içerisinde, oda sıcaklığında, karanlıkta bekletilmiştir. Mikroskopta çekirdeklerin boyanıp boyanmadığı kontrol edilerek, gerekirse tekrar Feulgen içerisinde bir süre daha bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda, lamalar distile su içerisinde 10-15 dk. bekletilmiş ve daha sonra kurutulmuştur. Kurutulan lamalar, fast green çözeltisinde 5-10 saniye tutulmuş ve sonra %50 etanolden daha sonra %20 etanolden geçirilerek fazla fast green boyası uzaklaştırılmıştır. Boyama işlemi tamamlanan lamalar iyice kurutulmuş ve çeker ocak altında, %10 ksilen içerisinde 10 dk. bekletilerek boyanın sabitlenmesi sağlanmıştır.

### 5.3 Mikroskopik değerlendirme kriterleri

Her birey için 1000 hücre sayıldı ve mikroçekirdekli hücreler için değerlendirme kriteri Tolbert ve arkadaşları'na göre ışık mikroskobu altında yapıldı (Şekil 14) Sonuçlar ‰ sıklık cinsinden ifade edildi(Tolberthy ve ark., 1992).



Şekil 14. Bukkal Epitel Hücrelerinde MÇ anomalileri (Thomas ve ark., 2009).

#### 5.4 İstatiksel Analiz

Sigara içen ve içmeyen genç bireylerin demografik özellikleri (yaş, cinsiyet, sigara içme alışkanlığı, maruziyet süresi, hastalık soygeçmişi, X-ray maruziyeti, enfeksiyon öyküsü, ilaç kullanım öyküsü, alkol kullanımı) ile ilgili tanımlayıcı istatistiki analizlerin anlamlılığını değerlendirmek için SPSS 21.0 (IBM Corp., New York, USA) kullanıldı. Çalışma grubundaki bireylerin bukkal epitel hücrelerindeki mikroçekirdek sıklığı ortalamaları±standart sapmaları (Ort±SS) hesaplandı. Verilerin normal dağılıma uyup uymadığı Kolmogorov Smirnov testi ile incelendi. Gruplar arasındaki ortalama farklılıklarının analizi için parametrik testlerden Student t testi, non parametrik testlerden Mann-Whitney U ve gruplandırılmış verileri incelemek için Fisher's Exact testleri uygulandı. Anlamlılık düzeyi olarak  $P \leq 0.05$  kabul edildi.

## 6. BULGULAR

Sigara kullanan ve sigara kullanmayan gruplardaki bireylerin yaş ortalamaları, cinsiyetleri, sigara içme alışkanlıkları, süre ve miktarları, alkol alışkanlıkları, X-ışını maruziyetleri, geçirilmiş enfeksiyon olup olmadığı, ilaç kullanım öyküleri ve aile bireylerinin sağlık durumlarına ilişkin anket sonucundaki veriler Tablo 8’de verilmiştir.

**Tablo 8.** Bireylerin genel özellikleri.

| Parametreler  |                      | Sigara  |       | p değeri           |
|---------------|----------------------|---------|-------|--------------------|
|               |                      | İçmeyen | İçen  |                    |
| Yaş           | Ort±SS               | 22,28   | 22,0  | >0,05              |
| Cinsiyet      | Erkek                | 31      | 16    | >0,05 <sup>a</sup> |
|               | Kadın                | 13      | 9     |                    |
| Sigara        | Kullanım süresi (Ay) | -       | 46,56 | -                  |
|               | Adet/gün             | -       | 17,04 |                    |
| Alkol         | Var                  | 13      | 17    | >0,05 <sup>b</sup> |
|               | Yok                  | 31      | 8     |                    |
| X-ışını       | Var                  | 25      | 11    | >0,05 <sup>c</sup> |
|               | Yok                  | 19      | 14    |                    |
| Ailede Hasta  | Yok                  | 19      | 13    | >0,05 <sup>d</sup> |
|               | Kronik               | 18      | 9     |                    |
|               | Kanser               | 7       | 3     |                    |
| Enfeksiyon    | Var                  | 8       | 5     | >0,05 <sup>e</sup> |
|               | Yok                  | 36      | 20    |                    |
| İlaç Kullanım | Var                  | 5       | 3     | >0,05 <sup>f</sup> |
|               | Yok                  | 39      | 22    |                    |

<sup>a</sup>P>0,05, X<sup>2</sup>= 0,534 (X<sup>2</sup> testi)

<sup>b</sup>P>0,05, X<sup>2</sup>= 8,052 (X<sup>2</sup> testi)

<sup>c</sup>P>0,05, X<sup>2</sup>= 1,628 (X<sup>2</sup> testi)

<sup>d</sup>P>0,05, X<sup>2</sup>= 0,966 (X<sup>2</sup> testi)

<sup>e</sup>P>0,05, X<sup>2</sup>= 0,96 (X<sup>2</sup> testi)

<sup>f</sup>P>0,05, X<sup>2</sup>= 0,29 (X<sup>2</sup> testi)

p değerlerinin hesaplanması için ki kare (X<sup>2</sup>)testi kullanılmıştır.

Deney ve kontrol grubundaki yaş, cinsiyet, X-ışını maruziyeti, alkol kullanımı, geçirilmiş enfeksiyon olup olmadığı, ilaç kullanım öyküsü ve aile bireylerinin sağlık durumları yönünden benzer özellikler göstermektedir (Tablo 8) (p>0,05).

Tablo 9’da deney ve kontrol gruplarındaki bireylerin ortalama bukkal epitel hücre mikroçekirdek sayısı ve tüm çalışma grubunun yaş, cinsiyet, x-ışını maruziyeti, geçirilmiş enfeksiyon olup olmadığı, ilaç kullanım öyküsü ve aile bireylerinin sağlık durumlarına göre bukkal epitel hücre mikroçekirdek sayılarının karşılaştırılması yer almaktadır.

**Tablo 9.** Deney ve kontrol gruplarındaki bireylerin ortalama bukkal epitel hücre mikroçekirdek sayısı.

|                | Parametreler | MÇ Sayısı | <i>p değeri</i> |
|----------------|--------------|-----------|-----------------|
| Sigara         | Var (n=25)   | 4,32±2,47 | <0,001          |
|                | Yok (n=44)   | 2,30±2,16 |                 |
| Alkol          | Var          | 2,59±2,44 | >0,05           |
|                | Yok          | 3,60±2,41 |                 |
| X-ışını        | Var          | 2,85±2,56 | >0,05           |
|                | Yok          | 3,19±2,40 |                 |
| Ailede Hasta   | Yok          | 3,41      | >0,05           |
|                | Kronik       | 2,67      |                 |
|                | Kanser       | 2,8       |                 |
| Enfeksiyon     | Var          | 3,07±2,75 | >0,05           |
|                | Yok          | 3,01±2,42 |                 |
| İlaç Kullanımı | Var          | 4,00±2,56 | >0,05           |
|                | Yok          | 2,90±2,44 |                 |

p değerleri, independent samples student's t-test ile hesaplandı ve aile hastalık öyküsü açısından one-way ANOVA testi kullanıldı.

Deney grubu ortalama mikroçekirdek sayısı, kontrol grubuna kıyasla 1,8 kat yüksek olup, bu fark istatistiksel açıdan anlamlıdır ( $p<0,001$ )(Tablo 9). Bu bulgu, tütün mamullerine maruziyet sonrası DNA hasarı oluşumunu göstermesi açısından önemlidir.

Tablo 9’da gösterildiği gibi, tüm çalışma grubundaki mikroçekirdek sayıları, yaş, cinsiyet, X-ışını maruziyeti, geçirilmiş enfeksiyon olup olmadığı, ilaç kullanım öyküsü ve aile bireylerinin sağlık durumları açısından farklılık göstermemiştir ( $p>0,05$ ).

**Tablo 10.** Deney ve kontrol gruplarındaki bireylerin cinsiyete göre ortalama bukkal epitel hücre mikroçekirdek sayılarının karşılaştırılması.

| MÇ sayısı |       | Sigara içmeyen |             | Sigara içen |             | <i>p</i> değeri |
|-----------|-------|----------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|
|           |       | n              | Ort±SS      | n           | Ort±SS      |                 |
| Cinsiyet  | Erkek | 13             | 2.15 ± 2.00 | 16          | 4.60 ±1.95  | <i>p</i> <0,001 |
|           | Kadın | 31             | 4.60 ±1.95  | 9           | 3.77 ± 3.34 | <i>p</i> >0,05  |

Sigara kullanan erkek bireylerdeki ortalama mikroçekirdek sayısı, sigara kullanmayan erkek gruba kıyasla 2.1 kat yüksek olup, bu fark istatistiksel açıdan anlamlıdır (Tablo 10)(p<0.001).Bu bulgu, erkek bireylerde tütün mamullerine maruziyet sonrası DNA hasarı oluşumunu göstermesi açısından önemlidir.

Ancak sigara kullanan kadın bireylerdeki ortalama mikroçekirdek sayısı, sigara kullanmayan kadın gruba kıyasla istatistiki olarak farklı değildir (Tablo 10) (p>0,05).

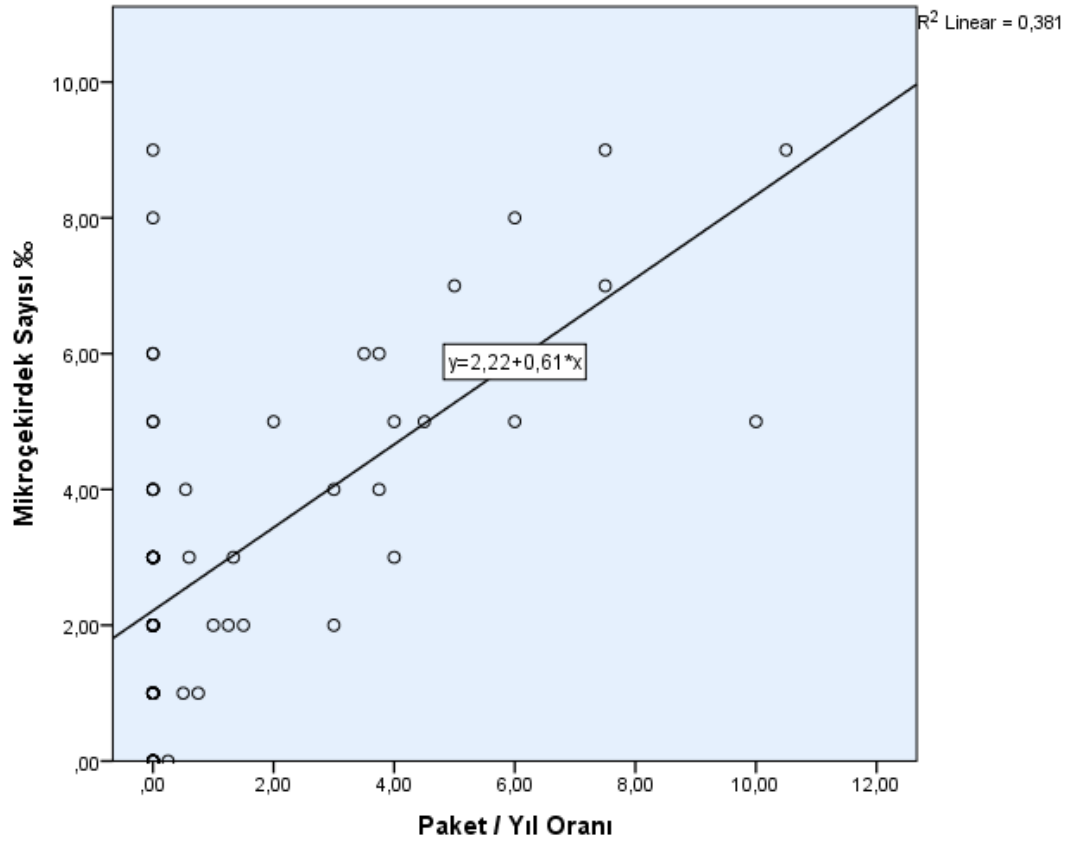
**Tablo 11.** Sigara içen bireylerin cinsiyete göre ortalama bukkal epitel hücre mikroçekirdek sayılarının karşılaştırılması.

| MÇ sayısı | Sigara içen |          | p değeri    |
|-----------|-------------|----------|-------------|
|           | n           | Ort ± SS |             |
| Cinsiyet  | Erkek       | 16       | 4.60 ±1.95  |
|           | Kadın       | 9        | 3.77 ± 3.34 |

Ayrıca sigara kullanan erkek bireylerdeki ortalama mikroçekirdek sayısı ile sigara kullanan kadın bireylerdeki ortalama mikroçekirdek sayısı, karşılaştırıldığında istatistiki olarak farklı bulunmamıştır(p>0,05)(Tablo 11). Dolayısı ile bu bulgunun, bireylerde tütün mamullerine maruziyetin cinsiyete göre DNA hasarı oluşumunu gösterme yönünden belirleyiciliği kesin değildir.







**Şekil 16.** Sigara kullanımı paket/yıl oranı ile ifade edildiğinde mikroçekirdek sayısı arasındaki korelasyon.

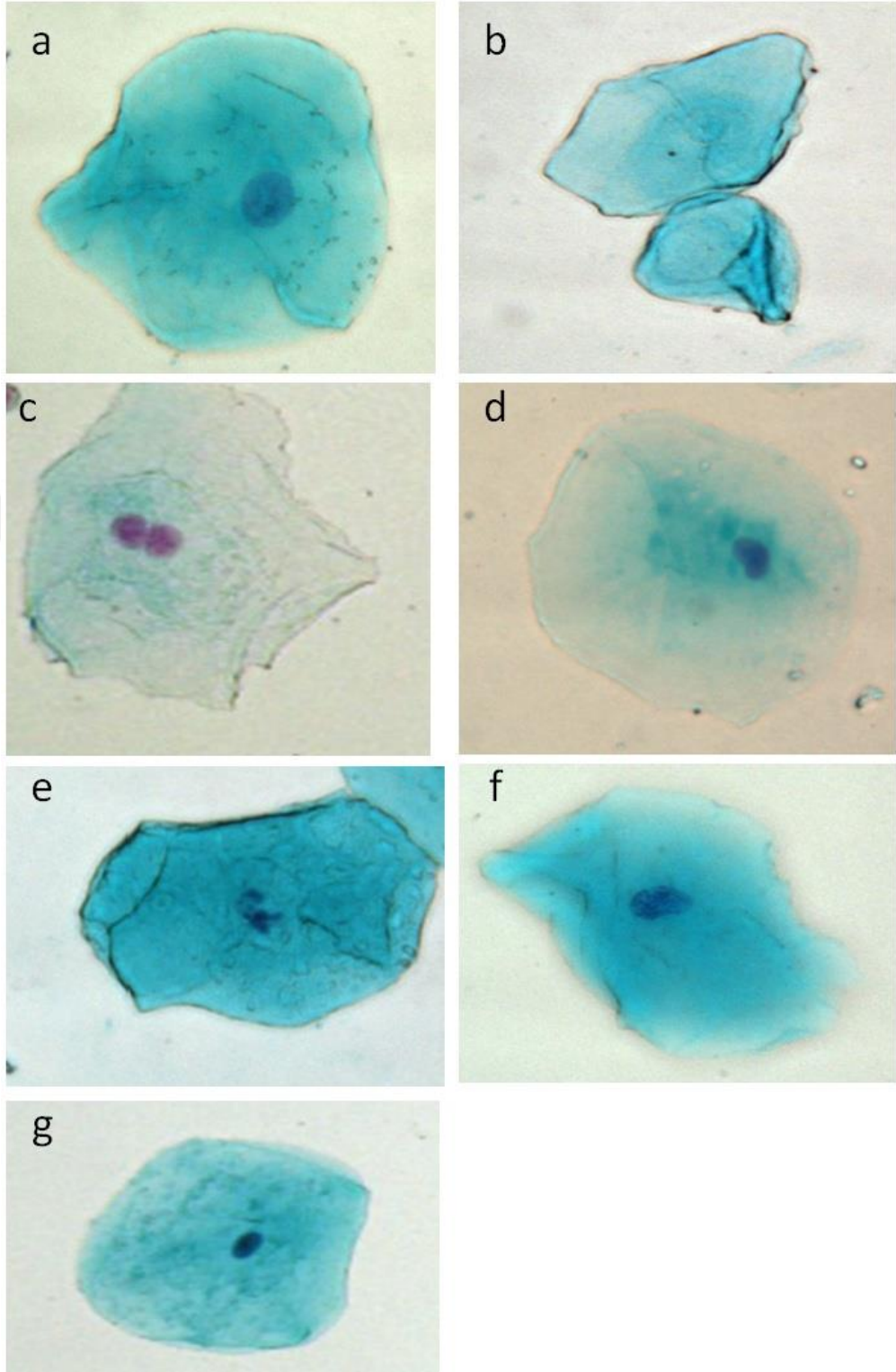
**Tablo 12.**Deney ve kontrol grubuna ait bulguların dökümü.

| Olgu | Yaş | Cinsiyet | Mikroçekirdek Sayısı ‰ | Sigara Kullanımı | Sigara Kullanım Miktarı (gün/paket) | Sigara Kullanım Süresi (ay) | Alkol Kullanımı | X Işını Maruziyeti | Ailede Hastalık Varlığı | Geçirilmiş Enfeksiyon | İlaç Kullanım Öyküsü |
|------|-----|----------|------------------------|------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------|--------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|
| 1    | 19  | Erkek    | 0                      | 0                | 0                                   | 0                           | Var             | Var                | Kronik Hastalık         | Var                   | Yok                  |
| 2    | 25  | Erkek    | 3                      | 0                | 0                                   | 0                           | Var             | Var                | Kronik Hastalık         | Yok                   | Yok                  |
| 3    | 18  | Erkek    | 3                      | 0                | 0                                   | 0                           | Var             | Var                | Yok                     | Yok                   | Yok                  |
| 4    | 22  | Erkek    | 8                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Var                | Yok                     | Yok                   | Yok                  |
| 5    | 23  | Erkek    | 0                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Var                | Kronik Hastalık         | Yok                   | Yok                  |
| 6    | 21  | Erkek    | 1                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Var                | Yok                     | Yok                   | Yok                  |
| 7    | 18  | Erkek    | 2                      | 0                | 0                                   | 0                           | Var             | Var                | Kronik Hastalık         | Yok                   | Yok                  |
| 8    | 22  | Erkek    | 0                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Var                | Yok                     | Yok                   | Yok                  |
| 9    | 23  | Erkek    | 1                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Yok                | Yok                     | Yok                   | Yok                  |
| 10   | 23  | Erkek    | 5                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Var                | Yok                     | Yok                   | Yok                  |
| 11   | 18  | Erkek    | 0                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Var                | Kronik Hastalık         | Yok                   | Yok                  |
| 12   | 18  | Erkek    | 1                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Var                | Kronik Hastalık         | Yok                   | Yok                  |
| 13   | 18  | Erkek    | 0                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Var                | Yok                     | Yok                   | Yok                  |
| 14   | 25  | Erkek    | 1                      | 0                | 0                                   | 0                           | Var             | Yok                | Kronik Hastalık         | Var                   | Yok                  |
| 15   | 18  | Erkek    | 0                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Yok                | Kronik Hastalık         | Yok                   | Yok                  |
| 16   | 18  | Erkek    | 1                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Yok                | Kronik Hastalık         | Yok                   | Yok                  |
| 17   | 24  | Erkek    | 4                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Var                | Kronik Hastalık         | Yok                   | Var                  |

| Olgu | Yaş | Cinsiyet | Mikroçekirdek Sayısı % | Sigara Kullanımı | Sigara Kullanım Miktarı (gün/paket) | Sigara Kullanım Süresi (ay) | Alkol Kullanımı | X Işını Maruziyeti | Ailede Hastalık Varlığı | Geçirilmiş Enfeksiyon | İlaç Kullanım Öyküsü |
|------|-----|----------|------------------------|------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------|--------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|
| 18   | 23  | Erkek    | 3                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Var                | Kronik Hastalık         | Yok                   | Yok                  |
| 19   | 24  | Erkek    | 3                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Yok                | Kanser                  | Yok                   | Yok                  |
| 20   | 23  | Erkek    | 2                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Var                | Kanser                  | Yok                   | Var                  |
| 21   | 20  | Erkek    | 2                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Var                | Kronik Hastalık         | Yok                   | Var                  |
| 22   | 25  | Erkek    | 3                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Yok                | Kronik Hastalık         | Yok                   | Yok                  |
| 23   | 25  | Erkek    | 6                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Var                | Yok                     | Var                   | Yok                  |
| 24   | 24  | Erkek    | 2                      | 0                | 0                                   | 0                           | Var             | Yok                | Kronik Hastalık         | Yok                   | Yok                  |
| 25   | 23  | Erkek    | 2                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Var                | Kronik Hastalık         | Var                   | Yok                  |
| 26   | 19  | Erkek    | 1                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Yok                | Yok                     | Yok                   | Yok                  |
| 27   | 25  | Erkek    | 0                      | 0                | 0                                   | 0                           | Var             | Yok                | Kronik Hastalık         | Yok                   | Yok                  |
| 28   | 24  | Erkek    | 3                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Yok                | Yok                     | Yok                   | Yok                  |
| 29   | 21  | Erkek    | 1                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Yok                | Yok                     | Yok                   | Yok                  |
| 30   | 20  | Erkek    | 5                      | 0                | 0                                   | 0                           | Var             | Var                | Yok                     | Yok                   | Yok                  |
| 31   | 19  | Erkek    | 1                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Var                | Yok                     | Yok                   | Yok                  |
| 32   | 25  | Erkek    | 5                      | 1                | 20                                  | 120                         | Var             | Var                | Kanser                  | Yok                   | Yok                  |
| 33   | 23  | Erkek    | 3                      | 1                | 8                                   | 18                          | Var             | Yok                | Yok                     | Yok                   | Yok                  |
| 34   | 20  | Erkek    | 2                      | 1                | 5                                   | 60                          | Yok             | Var                | Kanser                  | Yok                   | Var                  |
| 35   | 25  | Erkek    | 7                      | 1                | 25                                  | 72                          | Var             | Yok                | Yok                     | Yok                   | Yok                  |
| 36   | 24  | Erkek    | 5                      | 1                | 18                                  | 60                          | Var             | Var                | Kronik Hastalık         | Yok                   | Yok                  |
| 37   | 18  | Erkek    | 2                      | 1                | 10                                  | 36                          | Var             | Yok                | Yok                     | Yok                   | Yok                  |
| 38   | 23  | Erkek    | 6                      | 1                | 15                                  | 56                          | Var             | Var                | Kronik Hastalık         | Var                   | Var                  |
| 39   | 21  | Erkek    | 5                      | 1                | 20                                  | 24                          | Var             | Yok                | Yok                     | Yok                   | Var                  |

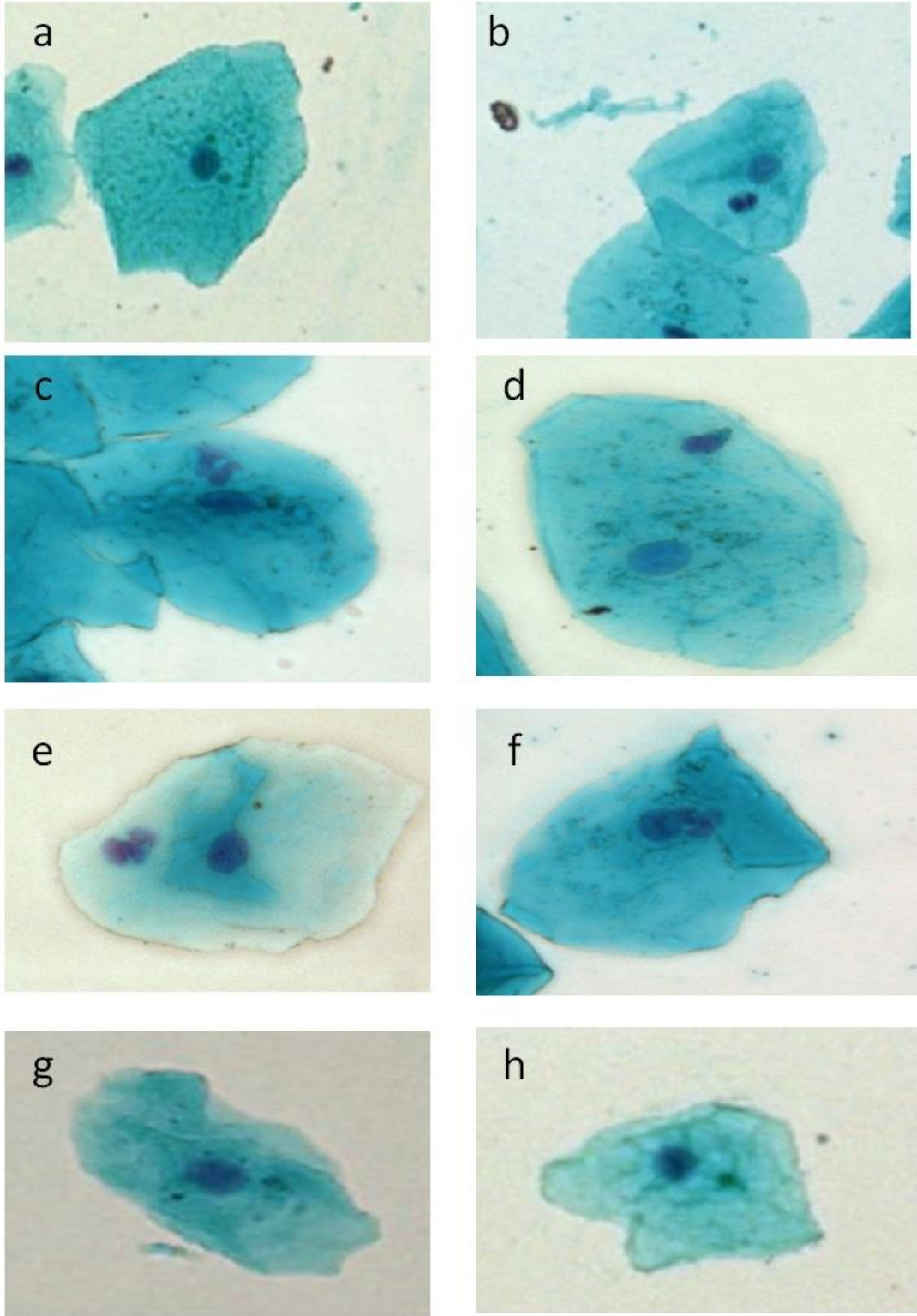
| Olgu | Yaş | Cinsiyet | Mikroçekirdek Sayısı % | Sigara Kullanımı | Sigara Kullanım Miktarı (gün/paket) | Sigara Kullanım Süresi (ay) | Alkol Kullanımı | X Işını Maruziyeti | Ailede Hastalık Varlığı | Geçirilmiş Enfeksiyon | İlaç Kullanım Öyküsü |
|------|-----|----------|------------------------|------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------|--------------------|-------------------------|-----------------------|----------------------|
| 40   | 24  | Erkek    | 4                      | 1                | 15                                  | 48                          | Yok             | Var                | Kanser                  | Yok                   | Yok                  |
| 41   | 23  | Erkek    | 6                      | 1                | 15                                  | 60                          | Var             | Var                | Kanser                  | Var                   | Yok                  |
| 42   | 20  | Erkek    | 3                      | 1                | 20                                  | 48                          | Var             | Var                | Kronik Hastalık         | Yok                   | Yok                  |
| 43   | 20  | Erkek    | 2                      | 1                | 20                                  | 12                          | Var             | Yok                | Yok                     | Yok                   | Yok                  |
| 44   | 23  | Erkek    | 4                      | 1                | 25                                  | 36                          | Yok             | Var                | Yok                     | Var                   | Yok                  |
| 45   | 24  | Erkek    | 7                      | 1                | 20                                  | 60                          | Var             | Var                | Yok                     | Yok                   | Yok                  |
| 46   | 21  | Erkek    | 5                      | 1                | 30                                  | 48                          | Var             | Yok                | Kronik Hastalık         | Yok                   | Yok                  |
| 47   | 23  | Erkek    | 8                      | 1                | 30                                  | 48                          | Var             | Var                | Kronik Hastalık         | Var                   | Yok                  |
| 48   | 23  | Kadın    | 0                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Var                | Kronik Hastalık         | Var                   | Yok                  |
| 49   | 25  | Kadın    | 6                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Var                | Kanser                  | Yok                   | Yok                  |
| 50   | 19  | Kadın    | 3                      | 0                | 0                                   | 0                           | Var             | Yok                | Yok                     | Yok                   | Yok                  |
| 51   | 19  | Kadın    | 0                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Var                | Kanser                  | Var                   | Yok                  |
| 52   | 23  | Kadın    | 1                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Yok                | Kanser                  | Var                   | Yok                  |
| 53   | 23  | Kadın    | 3                      | 0                | 0                                   | 0                           | Var             | Yok                | Kronik Hastalık         | Yok                   | Yok                  |
| 54   | 25  | Kadın    | 2                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Yok                | Kronik Hastalık         | Var                   | Yok                  |
| 55   | 21  | Kadın    | 9                      | 0                | 0                                   | 0                           | Var             | Yok                | Yok                     | Yok                   | Var                  |
| 56   | 22  | Kadın    | 4                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Yok                | Kronik Hastalık         | Yok                   | Yok                  |
| 57   | 22  | Kadın    | 2                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Yok                | Yok                     | Yok                   | Var                  |
| 58   | 23  | Kadın    | 3                      | 0                | 0                                   | 0                           | Var             | Var                | Yok                     | Yok                   | Yok                  |
| 59   | 23  | Kadın    | 0                      | 0                | 0                                   | 0                           | Var             | Yok                | Yok                     | Yok                   | Yok                  |
| 60   | 26  | Kadın    | 4                      | 0                | 0                                   | 0                           | Yok             | Var                | Yok                     | Yok                   | Yok                  |
| 61   | 25  | Kadın    | 4                      | 1                | 5                                   | 26                          | Yok             | Var                | Yok                     | Var                   | Yok                  |

| <b>Olgu</b> | <b>Yaş</b> | <b>Cinsiyet</b> | <b>Mikroçekirdek Sayısı %</b> | <b>Sigara Kullanımı</b> | <b>Sigara Kullanım Miktarı (gün/paket)</b> | <b>Sigara Kullanım Süresi (ay)</b> | <b>Alkol Kullanımı</b> | <b>X Işını Maruziyeti</b> | <b>Ailede Hastalık Varlığı</b> | <b>Geçirilmiş Enfeksiyon</b> | <b>İlaç Kullanım Öyküsü</b> |
|-------------|------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------|------------------------|---------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| <b>62</b>   | 22         | Kadın           | 2                             | 1                       | 15                                         | 48                                 | Var                    | Yok                       | Kronik Hastalık                | Yok                          | Yok                         |
| <b>63</b>   | 22         | Kadın           | 3                             | 1                       | 10                                         | 32                                 | Var                    | Yok                       | Yok                            | Yok                          | Yok                         |
| <b>64</b>   | 23         | Kadın           | 5                             | 1                       | 20                                         | 48                                 | Var                    | Yok                       | Yok                            | Yok                          | Yok                         |
| <b>65</b>   | 23         | Kadın           | 0                             | 1                       | 5                                          | 12                                 | Var                    | Yok                       | Kronik Hastalık                | Yok                          | Yok                         |
| <b>66</b>   | 23         | Kadın           | 1                             | 1                       | 5                                          | 36                                 | Yok                    | Yok                       | Yok                            | Yok                          | Yok                         |
| <b>67</b>   | 25         | Kadın           | 9                             | 1                       | 30                                         | 84                                 | Yok                    | Yok                       | Kronik Hastalık                | Yok                          | Yok                         |
| <b>68</b>   | 19         | Kadın           | 1                             | 1                       | 10                                         | 12                                 | Yok                    | Yok                       | Yok                            | Yok                          | Yok                         |
| <b>69</b>   | 24         | Kadın           | 9                             | 1                       | 30                                         | 60                                 | Yok                    | Yok                       | Yok                            | Yok                          | Yok                         |



**Şekil 17.** Çalışma grubundaki bireylerin yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek ve diğer çekirdek anomalilerinin mikroskobik görüntüler.

a) Normal farklılaşmış hücre; b) Karyolitik (ok); c)Nükleer tomurcuk;  
d)Binükleer; e)Kondanse kromatin; f)Karyohektik; g)Piknotik



**Şekil 18.** Çalışma grubundaki bireylerin yanak epitel hücrelerindeki mikroçekirdek ve diğer çekirdek anomalilerinin mikroskopik görüntüleri(a-h).



## 7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde insanlarda görülen sağlık sorunlarının başında kanser gelmektedir. Tüm dünyada görülme sıklığı en yüksek kanser türleri akciğer, meme ve kolorektal kanserlerdir. Kanser kaynaklı en sık ölümler erkeklerde akciğer ve kolorektal kanser, kadınlarda ise meme kanseri dolayısı ile gerçekleşmektedir. Tütün kullanımı, tüm kanser türlerinin oluşumuna (öncelikle akciğer, ağız ve larenks, pankreas, mesane vs) katkıda bulunmakta ve tütün kaynaklı kimyasallar birinci derece onkojenler arasında kabul edilmektedir (Ames, 1979; Carbone, 1992; Beckett, 1993; Barbone ve ark., 1997; Au, 2004; Brenner ve ark., 2009).

Tütün ve tütün ürünlerinin; başta solunum sistemi hastalıkları, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser de dahil olmak üzere pek çok hastalığa yol açtığı, kronik maruziyete bağlı olarak hastalık insidansını arttırdığı yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Pfeifer ve ark., 2002; Karlıkaya ve ark., 2006). Son yıllarda yapılan çalışmalar, bu hastalıkların patogeneziindeki mekanizmaların aydınlatılması ve önceden belirlenmesi konularına yönelmiştir. Tütün ürünlerinin yol açtığı hasarın boyutu bireyin tükettiği tütünün cinsi, kullanım süresi ve tüketim miktarı da olmak üzere birçok faktöre bağlıdır. Özellikle akciğer kanserinin yanı sıra baş boyun kanserlerinde sigaranın rolünün fazla olabileceği düşüncesi bu konuda mevcut biyomoleküler çalışmaların yoğunlaşmasına sebep olmuştur. Oluşan hasarın değerlendirilmesinde ise kolay uygulanabilen, hızlı, güvenilir, tekrarlanabilir moleküler teknikler tercih edilmektedir (Au, 2004; Au ve ark., 2010; Chow ve ark., 2010; Chandrasekar ve ark., 2014).

1985’den bu yana çeşitli modellerde (*in vivo/in vitro*) yapılan çalışmalar ile tütün ve tütün ürünlerinin; gen mutasyonları, kromozomal aberasyonlar, mikroçekirdek oluşumu, kardeş kromatid değişimi, DNA sarmal kırıkları ve oksidatif DNA aduktu gibi bir dizi genetik sapmaya neden olduğu gösterilmiştir (Şardaş ve ark., 1991; DeMarini, 2004; Chandrasekar ve ark., 2014). Sigara, IARC tarafından grup 1 karsinojen olarak sınıflandırılan 81 adet karsinojen bileşik içermektedir (Rana ve ark., 2017). Sigara dumanında bulunan maddelerin çoğu genotoksiktir. Bu nedenle sitogenetik hasar, dumandaki zararlı ajanlara maruz kalmanın etkisini belirlemek için mükemmel bir biyolojik belirteç gibi gözükmemektedir. Bu hipotezi desteklemek için

yakın zamanda yapılan çalışmalar ile kromozom kırıklarının sıklığının artmasının, karsinogenezdeki başlangıç olayı olduğu gösterilmiştir ve bu da, bu değişikliklerin, karsinogenik riski değerlendirmede önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu amaçla kullanılabilecek biyolojik belirteçler arasında mikroçekirdek ölçümü en uygun yöntemlerden biri gibi gözükmektedir. Mikroçekirdek oluşumu, kromozom hasarı varlığını gösterir ve bu nedenle erken evre karsinogenez belirtici olarak kullanılabilir(Bonassi ve ark., 2003).

Geçen yüzyıl başlarında tanımlanmaya başlayan hücre ve çekirdek yapısı, yüzyıl ortalarında çekirdek, kromozom ve DNA'nın keşfi ile geliştirilen biyomoleküler teknikler, genetik hastalıklarda, kronik zehirlenmelerde ve bazı sistemik hastalıklarda uygulanmaya başlamıştır(Watson ve Crick, 1953; Avise, 2012). Bu tekniklerle hücre, çekirdek ve DNA stabilitesi (Kromatin yoğunluğu, kromozom kırıkları, telomer hasarları, karyorektik, kiknotik, karyolitik hücre, gen analizi) araştırılmaktadır(Fenech, 2002; Fenech, 2006; Fenech, 2007; Bolognesi ve ark., 2015).

İlk kez 1982 de Stich ve ark. insan döküntü hücrelerinde M tekniği kullanarak kanser ile tütün kullanımı arasındaki ilişkiyi araştırmıştır(Stich ve ark., 1982). Çalışmada sağlıklı popülasyonda M sıklığının 0.0 ile 0.9% arasında değiştiği belirtilmiştir (Stich ve ark., 1984). Son yıllarda mikroçekirdek yöntemindeki yeni gelişmeler sayesinde yöntem ile birden çok son-nokta belirlenebilmektedir. Bu da, karmaşık kanser oluşum süreci ile ilgili, ideal bir biyogstergeden beklenen özelliklerin başında gelmektedir(Fenech, 2006).

Bununla birlikte yapılan birçok çalışmada farklı norm değerleri belirtilmekle birlikte M tekniği pratik ve ekonomik bir yöntem olarak kanser, prekanseröz lezyonlar ve diğer birçok sistemik hastalıkta sıklıkla kullanılmaktadır(Bloching ve ark., 2000; Bonassi ve ark., 2007; Iarmarcova ve ark., 2008).

Sitotoksitenin gösterilmesinde mikroçekirdek tekniği, 2000'li yıllardan itibaren başta tütün olmak üzere diğer toksik madde maruziyetlerinde ayrıca kanser ve genetik hastalıkların araştırılmasında biyogösterge olarak kullanılmaktadır(Bolognesi ve ark., 2015; Nersesyan ve ark., 2016; Bolognesi ve ark., 2017).

Çalışmamızda 18-25 yaş arası sigara içen (n=25), sigara içmeyen (kontrol, n=44), gençlerin bukkal mukoza hücrelerinde DNA hasarı mikroçekirdek tekniği ile değerlendirilerek karşılaştırılmıştır.

Organizmada en hızlı çoğalan hücreler kan, ağız ve üretral sistem hücreleridir. Bukkal mukozanın bazal tabaka hücrelerinde başlayan mikroçekirdek oluşumu ve genotoksik değişiklikler 1-3 hafta sonra yüzey tabakalara ulaşır. Bazı çalışmalarda bukkal hücrelerin yanı sıra lenfositler ve üretral hücrelerde de MÇ sayımı yapılmaktadır(Zamani ve ark., 2011). Yakında yayınlanan bir çalışmada ise bazal tabaka biyopsi örneklerinin daha hassas sonuçlar verdiği belirtilmektedir (Thomas ve ark., 2009). Ancak oral mukoza biyopsisi invazif bir yöntem olduğundan, mukozal sürüntü ile alınan hücrelerde MÇ testi noninvaziv ve pratik bir test olarak çoğu çalışmada tercih edilmektedir. Bu nedenle çalışmamızda genotoksik etkiler yüzeyel bukkal hücreler kullanılarak araştırılmıştır.

Sağlıklı hücrelerde çekirdek sitoplazmanın ortasında bulunmakta olup (eritrositlerde çekirdek bulunmamaktadır) yuvarlak veya oval görünümündedir. Sitoplazma homojen görünümde olup çekirdek yapısına benzer başka herhangi bir oluşum görülmez (toksik granülasyon Howel Body vs. haricinde). Mikroçekirdekler, çekirdekle bağlantısı olmayan çekirdeğe benzer boyanan membranla çevrili, farklı sayıda olabilen küçük yapılardır(Fenech ve ark., 2011).

Bukkal hücrelerde mikroçekirdek, mukozal sürüntü alınarak veya bu hücreler hücre kültüründe çoğatıldıktan sonra lama fikse edilerek incelenir. Boya olarak Feulgen/Fast Green, Giemsa, Papanicolaou, Periodic acid Schiff kullanılır. En az 1000 hücre sayılarak % MÇ sayısı değerlendirilir. Giemsa boyası mikroçekirdek benzeri boya kalıntıları oluşturabileceğinden, kullanımı önerilmemektedir(Thomas ve ark., 2009). Günümüzde en sık Feulgen/Fast Green boyama tekniği ve klastrojenik ve aneuploidojenik mekanizmayı gösteren Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) tekniği kullanılmaktadır(Kirsch-Volders ve ark., 1997; Chung ve ark., 2002). Çalışmamızda bukkal mukozada MÇ değerlendirmesi Feulgen/Fast Green boyama tekniği kullanılarak yapılmıştır.

Literatürde sigara içiciliği için günlük kesin herhangi bir sayı belirtilmemekle birlikte, çalışmamızda günde 5 sigara en az 1 yıl süre ile kullandığını ifade edenler

içici olarak değerlendirilmiştir(Rana ve ark., 2017). Gruplar oluşturulurken özellikle tütün ürünlerinden sadece sigara kullanan bireyler tercih edilmiştir.

Yapılan çalışmalar cinsiyet, yaş, mesleki maruziyet, alkol kullanımı, kronik hastalık hikayesi, ve ilaç kullanımının DNA hasarının değerlendirilmesinde mutlaka göz önünde bulundurulması gereken risk faktörleri olduğunu ve sağlıklı sonuçlar elde edebilmek için mutlaka değerlendirilmeye alınması gerekliliğini ortaya koymuştur(Ceppi ve ark., 2010; Bonassi ve ark., 2011).

Çalışmamıza katılan gruplara ait anket çalışması ile elde edilen demografik verilerden, yaşam şekilleri ve hastalık durumları hakkında genel bilgiler elde edilmiştir. Demografik özelliklerden yola çıkılarak genetik hastalık hikayesi, yaş, cinsiyet, mesleki maruziyet, alkol kullanımı, vitamin ve ilaç kullanımı, beslenme şekli, röntgen (X-ışınına maruziyet) arasındaki farkın anlamlılığı istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda, DNA hasarının oluşumunda risk faktörü olduğu düşünülen cinsiyet, yaş, mesleki maruziyet, alkol kullanımı, genetik hastalık hikayesi, vitamin ve ilaç kullanımı, beslenme şekli, özelliklerinin gruplar arasında dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Dünya Sağlık Örgütü 2017 verilerine göre genç yaşlarda kadınlarda sigara kullanım sıklığının arttığı ancak erkeklerde sigara kullanımının daha fazla olduğu bildirilmektedir. Bizim çalışmamızda Sigara kullanan grubun kadın erkek dağılımı Kadın/Erkek=9/16 kişi olarak belirlenmiştir. Sigara kullanmayanlarda ise bu dağılım Kadın/Erkek= 13/31 olarak belirlenmiştir. Kadın erkek dağılımı açısından karşılaştırma yapıldığında gruplar arasındaki dağılımda anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Yapılan çalışmalarda değişen yaşam koşullarına bağlı olarak (çalışma hayatına başlamaları ve ekonomik bireysel özgürlüklerinin artması ile) kadınlarda sigara kullanımının arttığı dolayısıyla kadınlarda görülen akciğer kanseri riskinin arttığı belirtilmektedir.

Kanserli olgularda yapılan bazı çalışmalarda hastaların birinci derece yakınlarında da mikroçekirdek frekansının normalden yüksek olduğu belirtilmektedir. İlginç olarak baş boyun kanserli olguların birinci derece

yakınlarında kanser riski yüksek olup bunların sigara ve alkol kullanmaları halinde riskin üç misli arttığı gösterilmiştir(Burgaz ve ark., 2011).

Röntgen ve diğer ışınların mikroçekirdek ve kanser oluşumunu arttırdığı bilinmektedir. Hatta ağır radyoterapi ve kemoterapi alan olgularda ikincil kanser riskinin arttığı da ilgili çalışmalarda gösterilmiştir. Bu durum özellikle baş boyun ve oral kanserlerde yapılan MÇ çalışmaları dikkati çekmektedir. Diş hekimleri tarafından yapılan çalışmalarda sık uygulanan röntgen çekiminin oral kansere neden olabileceği araştırılmaktadır(Çiftçi,2013). Çalışmamızda tüm olguların 36'sında 1-2 kez rutin akciğer ve diş röntgeni çekimi söz konusu olup X-ışını maruziyeti açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ )

Tütün kullanımında gözlenen MÇ sıklığında cinsiyetin önemi iyi bilinmemektedir. Rana ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptıkları çalışmada 25-65 yaş arası 67 erkekte tütün ile birlikte alkol tüketiminin genotoksisiteye etkisi, bukkal hücrelerde MÇ sıklığı ve idrarda 8-hidroksil-2-deoksiguanozin (8-OHdG) miktar ölçümü ile araştırılmıştır. Tüm gruplarda ortalama MÇ sıklığı kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Ancak istatistiki olarak anlamlı düzeyde en kuvvetli korelasyon sigara ve alkolü birlikte kullanan grupta bulunmuştur(Rana ve ark., 2017).

Bizim çalışmamızda da cinsiyet açısından mikroçekirdek sıklığı değerlendirildiğinde Sigara kullanan erkeklerde ortalama mikroçekirdek sıklığı içmeyenlere oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ( $p<0,001$ ).Fakat sigara kullanan kadınların ortalama mikroçekirdek sıklığı içmeyenlere ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). Farklı olarak sigara içen erkeklerin ve kadınların mikroçekirdek sıklığı karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p>0,05$ ).

Sonuçlarımızla uyumlu şekilde, Konopacka 120 sağlıklı gönüllü ile yaptığı çalışmada yaş ve cinsiyet farklılığının bukkal mikroçekirdek sıklığında herhangi bir etkisi olmadığını ancak sigaranın bazal DNA hasarında belirgin etki gösterdiğini bildirmiştir (Konopacka, 2003).

İnsan Mikroçekirdek Projesi grubunun 2011'de yayınladıkları raporda, mesleki maruziyetin değerlendirilmesinde sigara kullanımının oluşturacağı DNA hasarının

mutlaka dikkate alınarak değerlendirilmesi gerektiği vurgulanmış ve kanser riskinin sigara kullanımında çok daha yüksek olduğu raporlanmıştır(Bonassi ve ark., 2011). Şardaş ve ark. yaptıkları çalışmada DNA hasar seviyesinin sigara kullanan ve mesleki maruziyeti olan bireylerde daha yüksek olduğu gösterilmiş olup, ilgili raporu desteklemektedir(Sardas, ve ark., 2010). Çalışmamızdaki genç bireylerin henüz öğrenci olması ve ileride olası mesleki maruziyete bağlı karsinojenite riskinin sigara kullanmayan bireylere oranla çok daha yüksek olacağı öngörülmektedir(Bonassi ve ark., 2011).

Literatürde MÇ sayısının gençlerde daha yüksek olduğu yaşlanmakla mikroçekirdek sayısının azaldığı ve bu durumun kromozom rejenerasyonunun ve hücre replikasyonunun azalması sonucu hücre apoptozunun artmasıyla ortaya çıktığı düşünülmektedir.(Shafi, 2015) Ancak yaş ile birlikte kanser sıklığının artması ise kanser oluşumunda kompleks bir mekanizmanın olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda bukkal mukozada MÇ tekniği uygulanması sonucunda sigara içen genç bireylerde MÇ sıklığı, kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p<0,001$ ). Literatürde uzun dönem sigara kullanımının bukkal mukoza hücrelerinde mikroçekirdek frekansını artırdığına dair pek çok çalışma olmasına rağmen kısa dönem maruziyetin değerlendirildiği az sayıda çalışma bulunmaktadır(Konopacka, 2003; Wu ve ark., 2004; Naderi ve ark., 2012; Chandirasekar ve ark., 2014). Mikroskobik inceleme sırasında bazı hücrelerde kromatin yoğunluğu yüksek, karyorektik, piknotik ve karyolitik hücreler görülse de değerlendirmeye alınmamıştır.

Bu alanda yapılan sitogenetik çalışmalar değerlendirildiğinde Türkiye’de bu tekniğin kullanıldığı ilk çalışmanın Burgaz ve ark. tarafından 1995 yılında yapıldığı görülmektedir(Burgaz ve ark., 1995). Çalışmamız ile benzer olarak sigara içen bireylerin üretral hücrelerinde mikroçekirdek sıklığı içmeyenlere oranla anlamlı düzeyde yüksek ( $p < 0.001$ ) bulunmuştur.

Zamani ve ark. yaptıkları çalışmada ise, sigara kullanan ve kullanmayan gençlerin bukkal mukoza, lenfosit ve ürotelyal hücrelerinde MÇ frekanslarını kıyaslamış ve sigara içen bireylerin bukkal mukoza, lenfosit ve ürotelyal hücrelerinde kontrole kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek MÇ frekansına sahip

olduğu gösterilmiştir. Ürotelyal hücrelerde ise bu artışın daha da belirgin olduğu bildirilmiştir. MÇ tekniğinin de, sigaraya bağlı kanser riskinin değerlendirilmesinde uygun bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada ilginç olarak Bukkal hücrelerin lenfositlere oranla sınırlı DNA tamir kapasitesine sahip olmaları nedeniyle bukkal hücrelerin genomik instabilite olaylarını daha doğru yansıtabileceği de ileri sürülmektedir(Zamani ve ark., 2011).

Yaklaşık çeyrek yüzyıldır yurt içi ve yurt dışında yapılan birçok çalışmada MÇ tekniğinin kanser ve prekansöröz lezyonlara tanı konulmasına yardımcı olduğu, ek olarak tedavi takibinde de faydalı olduğu belirtilmektedir. Bunun yanı sıra MÇ testinin belirtilen konularda anlamlı sonuç vermediğini ileri süren bazı çalışmalar da bulunmaktadır(Landi ve Barale, 1999; Yildirim ve ark., 2013). Bu durum, sınır değerlerin çok geniş olması ve boyama ve hücre sayımındaki teknik farklılıklar ile açıklanabilir. Güvenilir sonuçların elde edilebilmesi için örneklerin iyi fikse edilmesi, yalancı pozitifliğe neden olan boyaların kullanılmaması (Giemsa) ve mikroskopta en az 1000 hatta 3000 hücre sayılması önerilmektedir (Normal oran 0.5-2.5/1000 hücre)(Holland ve ark., 2008; Bonassi ve ark., 2011).

Tütün ve tütün ürünlerinin en çok Ortadoğu, Uzakdoğu ve Güney Amerika'da kullanıldığı ve bu nedenle geniş kapsamlı araştırmaların bu bölgelerde yapıldığı dikkati çekmektedir. Hindistan'da Chandrasehar ve ark. kontrol, sigara, dumansız sigara, tütün çiğneyenler tek başlarına veya sigara ile birlikte kullananlar olmak üzere 5 ayrı grupta; DNA hasarını bukkal hücrelerde ve lenfositlerde MÇ tekniği ve diğer genotoksisite yöntemlerini kullanarak araştırmışlardır. Tüm gruplarda kontrole kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek MÇ frekansına sahip olduğu gösterilmiştir(Chandrasekar ve ark., 2014). Ayrıca, çalışmada bizim çalışmamızla benzer olarak maruziyetin değerlendirilmesinde yaş üzerinden gruplandırma yapılmış ve 15-30 yaş arası genç grupta MÇ sıklığı ( $1,43 \pm 0,77$ ), 30 yaş üzeri gruba ( $2,50 \pm 0,44$ ) kıyasla daha düşük ancak kontrole kıyasla anlamlı düzeyde yüksek olarak bulunmuştur.

Tütün cinsi ve kullanım şeklinin MÇ oluşumunda farklı etkilere neden olabileceği düşünülerek doğu ve uzak doğu ülkelerinde nargile kullanan ve tütün çiğneyen gruplarda araştırmalar yürütülmüştür. Diğer biyolojik ajanlarda olduğu gibi

sigara içenlerde de tütünün yapısına (nikotin oranı), alınıp şekline, kullanım süresine, günlük kullanım miktarına bağlı olarak MÇ oluşumu ve karsinojen etki değişmektedir. Yaptığımız çalışmada maruziyetin değerlendirilmesi için 12 ay boyunca günde ne kadar sigara içildiği hesaplanmış ve bu oran paket/yıl oranı olarak kaydedilmiştir. Bu parametre ile mikroçekirdek sayısı arasındaki korelasyon analizi gerçekleştirildiğinde pearson korelasyon katsayısı  $r=0,61$  ( $p<0.005$ ) olarak bulunmuştur. Bu sonuç da bize adet/yıl oranı ile mikroçekirdek sayısı arasında güçlü ve istatistiki olarak anlamlı pozitif bir korelasyon olduğunu göstermiştir.

Tütün kullanımı dünya çapında morbidite ve mortalitenin başlıca önlenabilir nedenlerinden biridir. Halen dünyada yaklaşık bir milyar sigara içicisi bulunmaktadır ve yetişkin popülasyonda her on ölümden biri sigara kullanımını ile ilişkilidir. Yarısından fazlasının gelişmekte olan ülkelerde yaşadığı 1 milyar genç yetişkinin, 2030 yılına kadar sigara içmeye başlaması beklenmektedir. Dünya Sağlık Örgütü, Türkiye'nin dünyada en fazla sigaranın içildiği 10 ülke arasında yer aldığını raporlamıştır (WHO, 2008). Türkiye gibi gelişmekte olan ülkelerde sigaranın, kanser insidansını arttırdığı gösterilmiştir. Bununla beraber mikroçekirdek oluşum sıklığı ile kanser insidansı arasında korelasyon bulunmaktadır. Elde edilen sonuçlar sigaranın, genç içicilerin bukkal mukoza hücrelerinde DNA hasarına neden olduğunu göstermektedir. Sigara içimi ile akciğer başta olmak üzere diğer birçok kanser türü arasındaki ilişki sigarayı bıraktıktan sonra bile uzun yıllar devam etmektedir. Bu nedenle gençlere sigaranın sağlığa zararlı etkileri konusunda erken eğitim verilmesi bu alışkanlığın önlenmesi ve halk sağlığının korunması açısından önemli bir role sahiptir.

Mevcut çalışmanın sonuçları sigara içimi ile kromozomal hasar arasındaki muhtemel ilişkiyi anlamayı ve ayrıca bukkal mukozadaki MN analizinin genotoksisite testi için yararlı bir biyogösterge olduğu gerçeğini güçlendirmektedir. Konunun daha iyi anlaşılabilmesi için geniş sayıda olgu gruplarında daha ileri teknolojik yöntemler ile araştırılması yararlı olacaktır.



## 8. KAYNAKLAR

Aitio A. "Biomarkers and their Use in Occupational Medicine." *Scand J Work Environ Health* 1999;25(6):521-528

Albertini, Richard J. "Mechanistic insights from biomarker studies: somatic mutations and rodent/human comparisons following exposure to a potential carcinogen." *IARC scientific publications* 157 (2004): 153-177.

Alleyne, George, et al. "Disease control priorities in developing countries." (2006).AAA

Ames, Bruce N. "Identifying Environmental Chemicals Causing Mutations and Cancer." *Jurimetrics* 20.4 (1980): 326-347.

Aslan, Dilek, and Mustafa Seydioğulları. "Tütün Reklamları, Promosyonu ve Sponsorluğuna Yönelik Yasaklar: Neredeyiz? Nasıl ilerleriz?." *Sürekli tıp eğitim dergisi* (2012) 21.6: 326.

Au, William, et al. "Biomarker monitoring for health risk based on sensitivity to environmental mutagens." *Reviews on environmental health* 16.1 (2001): 41-64.

Au, W. W. "Life style, environmental and genetic susceptibility to cervical cancer." *Toxicology* (2004) 198(1): 117-120.

Au, William W. "Usefulness of biomarkers in population studies: from exposure to susceptibility and to prediction of cancer." *International journal of hygiene and environmental health* 210.3 (2007): 239-246.

Au, William W., Ashok K. Giri, and Mathuros Ruchirawat. "Challenge assay: a functional biomarker for exposure-induced DNA repair deficiency and for risk of cancer." *International journal of hygiene and environmental health* 213.1 (2010): 32-39.

Au, William W., et al. "Monitoring populations for DNA repair deficiency and for cancer susceptibility." *Environmental health perspectives* 104.Suppl 3 (1996): 579.

Awise, J. C. (2012). *Molecular markers, natural history and evolution*, Springer Science & Business Media.

Barbone, Fabio, et al. "Cigarette smoking and histologic type of lung cancer in men." *Chest* 112.6 (1997): 1474-1479.

Barceloux, Donald G. *Medical toxicology of drug abuse: synthesized chemicals and psychoactive plants*. John Wiley & Sons, 2012.

Bartsch, Helmut, and Eino Hietanen. "The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure." *Environmental health perspectives* 104.Suppl 3 (1996): 569.

Basil, Michael D., Debra Z. Basil, and Caroline Schooler. "Cigarette Advertising to Counter New Years Resolutions." *Journal of health communication* 5.2 (2000): 161-174.

Beckett, W. S. "Epidemiology and etiology of lung cancer." *Clinics in chest medicine* 14.1 (1993): 1-15.

Benowitz, Neal L., and Jack E. Henningfield. "Establishing a Nicotine Threshold for Addiction--The Implications for Tobacco Regulation." (1994): 123-125.

Benowitz, Neal L., and Peyton Jacob III. "CYP2D6 phenotype and the metabolism of nicotine and cotinine." *Pharmacogenetics and Genomics* 6.3 (1996): 239-242.

Berwick, Marianne, and Paolo Vineis. "Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review." *Journal of the National Cancer Institute* 92.11 (2000): 874-897.

Bilir, Nazmi. "Türkiye Tütün Kontrolünde Dünyanın Neresinde?." *Türk Toraks Dergisi/Turkish Thoracic Journal* 10.1 (2009).

Bilir, Nazmi, et al. "Türkiye’de tütün kontrolü politikaları." DSÖ Türkiye Ofisi, DSÖ yayını, Danimarka (2010): 15-32.

Bilir, N., B. G. Doğan, and A. N. Yıldız. "Smoking behavior and attitudes—Turkey." *Contract* 94-0200 (1997): 02882.

Bloching, M., et al. "Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay." *Oral oncology* 36.6 (2000): 550-555.

Bolognesi, Claudia, et al. "Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 766 (2015): 20-31.

Bolognesi, Claudia, et al. "The lymphocyte cytokinesis block micronucleus test in human populations occupationally exposed to vinyl chloride: A systematic review and meta-analysis." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 774 (2017): 1-11.

Bonassi, Stefano, et al. "The HUman MicroNucleus project on eXfoLiated buccal cells (HUMN XL): the role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 728.3 (2011): 88-97.

Bonassi, Stefano, et al. "Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 543.2 (2003): 155-166.

Bonassi, Stefano, et al. "An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans." *Carcinogenesis* 28.3 (2007): 625-631.

Bono, Roberto, et al. "Cotinine and N-(2-hydroxyethyl) valine as markers of passive exposure to tobacco smoke in children." *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* 15.1 (2005): 66-73.

Bozkurt, Ali I., et al. "Patterns of active and passive smoking, and associated factors, in the South-east Anatolian Project (SEAP) region in Turkey." *BMC public health* 6.1 (2006): 15.

Brenner, Hermann, Dietrich Rothenbacher, and Volker Arndt. "Epidemiology of stomach cancer." *Cancer Epidemiology: Modifiable Factors* (2009): 467-477.  
Brusick, D. (1980). *Principles of genetic toxicology*, Springer.

Burgaz, Sema, et al. "Micronucleus frequencies in lymphocytes and buccal epithelial cells from patients having head and neck cancer and their first-degree relatives." *Mutagenesis* 26.2 (2011): 351-356.

Burgaz, Sema, et al. "Evaluation of micronuclei in exfoliated urothelial cells and urinary thioether excretion of smokers." *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 335.2 (1995): 163-169.

Burns, David M. "Epidemiology of smoking-induced cardiovascular disease." *Progress in cardiovascular diseases* 46.1 (2003): 11-29.

Carbone, David. "Smoking and cancer." *The American journal of medicine* 93.1 (1992): S13-S17.

Cebulska-Wasilewska, Antonina. "Response to challenging dose of X-rays as a predictive assay for molecular epidemiology." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 544.2 (2003): 289-297.

Ceppi, Marcello, et al. "Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: statistical and epidemiological issues." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 705.1 (2010): 11-19.

Chaloupka, Frank J., Kurt Straif, and Maria E. Leon. "Effectiveness of tax and price policies in tobacco control." *Tobacco Control* (2010): tc-2010.

Chandrasekar, R., et al. "Assessment of genotoxic and molecular mechanisms of cancer risk in smoking and smokeless tobacco users." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 767 (2014): 21-27.

Chen, Yen-Ching, and David J. Hunter. "Molecular epidemiology of cancer." *CA: a cancer journal for clinicians* 55.1 (2005): 45-54.

Chow, Wong-Ho, Linda M. Dong, and Susan S. Devesa. "Epidemiology and risk factors for kidney cancer." *Nature Reviews Urology* 7.5 (2010): 245-257.

Chung, Hai Won, Su Jin Kang, and Su Young Kim. "A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1, 2, 4-benzenetriol." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 516.1 (2002): 49-56.

Conway, Terry L., and Terry A. Cronan. "Smoking and physical fitness among Navy shipboard men." *Military medicine* (1988).

Conway, Terry L., and Terry A. Cronan. "Smoking, exercise, and physical fitness." *Preventive medicine* 21.6 (1992): 723-734.

Cornfield, Jerome, et al. "Smoking and lung cancer: recent evidence and a discussion of some questions." *International journal of epidemiology* 38.5 (2009): 1175-1191.

Çelik, Ayla, et al. "Bio-monitoring for the genotoxic assessment in road construction workers as determined by the buccal micronucleus cytome assay." *Ecotoxicology and environmental safety* 92 (2013): 265-270.

Çiftçi, Mehmet Ertuğrul. *Dental Volumetrik Tomografinin Genotoksik Etkileri*. Diss. 2013.

Dağlı, E. "Are low income countries targets of the tobacco industry?[Counterpoint]." *The international journal of tuberculosis and lung disease* 3.2 (1999): 113-118.

DeMarini, David M. "Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 567.2 (2004): 447-474.

Demirel, Sennur, and Ayşe Gül Zamani. "Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları." *Genel Tıp Dergisi* 12.3 (2002): 123-127.

Dianov, Grigory L., et al. "Repair of uracil residues closely spaced on the opposite strands of plasmid DNA results in double-strand break and deletion formation." *Molecular and General Genetics MGG* 225.3 (1991): 448-452.

DiFranza, Joseph R., et al. "Development of symptoms of tobacco dependence in youths: 30 month follow up data from the DANDY study." *Tobacco control* 11.3 (2002): 228-235.

Doll, Richard, and A. Bradford Hill. "Smoking and carcinoma of the lung." *British medical journal* 2.4682 (1950): 739.

Doll, Richard, and A. Bradford Hill. "Lung cancer and other causes of death in relation to smoking." *British medical journal* 2.5001 (1956): 1071.

Douglas, George R., David H. Blakey, and David B. Clayson. "Genotoxicity tests as predictors of carcinogens: an analysis." *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* 196.1 (1988): 83-93.

Duesberg, Peter, Reinhard Stindl, and Rüdiger Hehlmann. "Explaining the high mutation rates of cancer cells to drug and multidrug resistance by chromosome reassortments that are catalyzed by aneuploidy." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97.26 (2000): 14295-14300.

Dutra, A., et al. "Nuclear bud formation: a novel manifestation of Zidovudine genotoxicity." *Cytogenetic and genome research* 128.1-3 (2010): 105-110.

Ergüder, Toker, et al. "Tobacco use among youth and related characteristics, Turkey." *Sozial-Und Praeventivmedizin* 51.2 (2006): 91-98.

Fenech, Michael. "Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology." *Toxicology* 181 (2002): 411-416.

Fenech, Michael. "Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 600.1 (2006): 58-66.

Fenech, Michael. "Cytokinesis-block micronucleus cytome assay." *Nature protocols* 2.5 (2007): 1084-1104.

Fenech, M., et al. "Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells." *Mutagenesis* 26.1 (2011): 125-132.

Fergusson, David M., Renee D. Goodwin, and L. John Horwood. "Major depression and cigarette smoking: results of a 21-year longitudinal study." *Psychological medicine* 33.8 (2003): 1357-1367.

Freedman, Kit S., Nanette M. Nelson, and Laura L. Feldman. "Smoking initiation among young adults in the United States and Canada, 1998-2010: a systematic review." *Preventing chronic disease* 9 (2012).

Fry, Willard A., Herman R. Menck, and David P. Winchester. "The national cancer data base report on lung cancer." *Cancer* 77.9 (1996): 1947-1955.

Garcia-Estrada, H. and M. Fischman Charles. "An unusual case of nicotine poisoning." *Clinical toxicology* (1977) 10(4): 391-393.

General, S. "Reducing the health consequences of smoking. 25 years of progress. US Department of Health and Human Services." (1989).

Güleç, M., B. Bakır, M. Özer, M. Uçar, S. Kılıç and M. Hasde. "Association between cigarette smoking and depressive symptoms among military medical students in Turkey." *Psychiatry research* (2005) 134(3): 281-286.

Güner, Ç., et al. "The Health Problems Of The Adolescents In Kocaeli." *Tobacco, Alcohol and Drug Use International Public Health Congress*. Vol. 152. 2000.

Günes, G., et al. "Determinants of smoking behaviour among high school students in Malatya." *Abstract Book for International Public Health Congress: Health*. Vol. 21.

Hammond, David, et al. "Effectiveness of cigarette warning labels in informing smokers about the risks of smoking: findings from the International Tobacco Control (ITC) Four Country Survey." *Tobacco control* 15.suppl 3 (2006): iii19-iii25.

Hanahan, Douglas, and Robert A. Weinberg. "The hallmarks of cancer." *cell* 100.1 (2000): 57-70.

Hartlerode, A. J. and R. Scully. "Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells." *Biochemical Journal* (2009) 423(2): 157-168.

Hayashi, M. "The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test—." *Genes and Environment* (2016) 38(1): 18.

Hecht, S. S. "Human urinary carcinogen metabolites: biomarkers for investigating tobacco and cancer." *Carcinogenesis* (2002) 23(6): 907-922.

Hirayama, T. "Non-smoking wives of heavy smokers have a higher risk of lung cancer: a study from Japan." *Bulletin of the World Health Organization* (2000) 78(7): 940-942.

Hoffmann, D. and S. Hecht (1990). *Advances in tobacco carcinogenesis. Chemical carcinogenesis and mutagenesis I*, Springer: 63-102.

Hoffmann, D. and I. Hoffmann. "The changing cigarette: chemical studies and bioassays." *Smoking and tobacco control monograph* (2001) 13: 159-192.

Hoffmann, D., I. Hoffmann and K. El-Bayoumy. "The less harmful cigarette: a controversial issue. A tribute to Ernst L. Wynder." *Chemical research in toxicology* (2001) 14(7): 767-790.

Hoffmann, D. H., Ilse. "The changing cigarette, 1950-1995." *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* (1997) 50(4): 307-364.

Holland, N., C. Bolognesi, M. Kirsch-Volders, S. Bonassi, E. Zeiger, S. Knasmueller and M. Fenech. "The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* (2008) 659(1): 93-108.

Hozawa, A., T. Houston, M. W. Steffes, R. Widome, O. D. Williams, C. Iribarren, M. J. Pletcher, M. L. Daviglus, J. J. Carr and D. R. Jacobs. "The association of cigarette smoking with self-reported disease before middle age: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) study." *Preventive medicine* (2006) 42(3): 193-199.

Hurt, Richard D., et al. "Serum nicotine and cotinine levels during nicotine-patch therapy." *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 54.1 (1993): 98-106.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 2004.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, World Health Organization, and International Agency for Research on Cancer. Tobacco smoke and involuntary smoking. Vol. 83. Iarc, 2004.

IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, World Health Organization, and International Agency for Research on Cancer. Tobacco smoke and involuntary smoking. Vol. 83. Iarc, 2004.

Iarmarcovai, G., M. Ceppi, A. Botta, T. Orsiere and S. Bonassi. "Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* (2008) 659(3): 274-283.

Jha, Prabhat, and Frank J. Chaloupka. Tobacco control in developing countries. Oxford University Press, 2000.

Jois, Harshvardhan S., Alka D. Kale, and K. P. Kumar. "Micronucleus as potential biomarker of oral carcinogenesis." *IJDA* 2.2 (2010): 197-202.

Karlıkaya, C., F. Öztuna, Z. A. Solak, M. Özkan and O. Örsel. "Tütün kontrolü." *Toraks dergisi* (2006) 7(1): 51-64.

Kaufman, N. and D. Yach. "Tobacco control: Challenges and prospects." *Bulletin of the World Health Organization* (2000) 78(7): 867-867.

Kemp, Philip M., et al. "Postmortem distribution of nicotine and cotinine from a case involving the simultaneous administration of multiple nicotine transdermal systems." *Journal of analytical toxicology* 21.4 (1997): 310-313.

Kemppainen, U., K. Tossavainen, E. Vartiainen, V. Jokela, P. Puska, V. Pantelejev and M. Uhanov. "Environmental factors as predictors of smoking among ninth-grade adolescents in pitkäranta (russian karelia) and in eastern Finland." *Research in nursing & health* (2006) 29(6): 543-555.

Khuder, S. A. "Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis." *Lung cancer* (2001) 31(2): 139-148.

Kirsch-Volders, M., A. Elhajouji, E. Cundari and P. Van Hummelen. "The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* (1997) 392(1): 19-30.

Konopacka, M. "Effect of smoking and aging on micronucleus frequencies in human exfoliated buccal cells." *Neoplasma* (2003) 50(5): 380-382.

Kujala, Urho M., Jaakko Kaprio, and Richard J. Rose. "Physical activity in adolescence and smoking in young adulthood: a prospective twin cohort study." *Addiction* 102.7 (2007): 1151-1157.

Kuper, H., H. O. Adami and P. Boffetta. "Tobacco use, cancer causation and public health impact." *Journal of internal medicine* (2002) 251(6): 455-466.

Landi, S. and R. Barale. "Sister chromatid exchanges, chromosome aberrations and micronuclei in female lymphocytes: correlations with biological rhythms, miscarriages and contraceptive pill use." *Mutagenesis* (1999) 14(6): 581-586.

Larson, P., H. Haag and H. Silvette. "Tobacco, Experimental and Clinical Studies, Baltimore 1961." The Williams & Wilkins Company. Becker, RF, King, JE, and Little, CR D.: *Am. J. Obstet. Gynecol* (1968) 101: 1109.

Lavoie, F. W. and T. M. Harris. "Fatal nicotine ingestion." *The Journal of emergency medicine* (1991) 9(3): 133-136.

Le Gal, A., Y. Dréano, D. Lucas and F. Berthou. "Diversity of selective environmental substrates for human cytochrome P450 2A6: alkoxyethers, nicotine, coumarin, N-nitrosodiethylamine, and N-nitrosobenzylmethylaniline." *Toxicology letters* (2003) 144(1): 77-91.



Leal-Garza, Carlos H., et al. "Micronuclei in cervical smears and peripheral blood lymphocytes from women with and without cervical uterine cancer." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 515.1 (2002): 57-62.

Li, R., A. Sonik, R. Stindl, D. Rasnick and P. Duesberg. "Aneuploidy vs. gene mutation hypothesis of cancer: recent study claims mutation but is found to support aneuploidy." *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2000) 97(7): 3236-3241.

Luzhna, L., P. Kathiria and O. Kovalchuk. "Micronuclei in genotoxicity assessment: from genetics to epigenetics and beyond." *Frontiers in genetics* (2013) 4.

Majer, B., B. Laky, S. Knasmüller and F. Kassie. "Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* (2001) 489(2): 147-172.

Malizia, E., G. Andreucci, F. Alfani, M. Smeriglio and P. Nicholai. "Acute intoxication with nicotine alkaloids and cannabinoids in children from ingestion of cigarettes." *Human toxicology* (1983) 2(2): 315-316.

Mcgee, D., T. Brabson, J. McCarthy and M. Picciotti. "Four-year review of cigarette ingestions in children." *Pediatric emergency care* (1995) 11(1): 13-16.

Mercier, M. and A. Robinson. "Use of biologic markers for toxic end-points in assessment of risks from exposure to chemicals." *International archives of occupational and environmental health* (1993) 65(1): S7-S10.

Murphy, Jane M., et al. "Cigarette smoking in relation to depression: historical trends from the Stirling County Study." *American Journal of Psychiatry* 160.9 (2003): 1663-1669.

Mwenifumbo, J. C., C. N. Lessov-Schlaggar, Q. Zhou, R. E. Krasnow, G. E. Swan, N. L. Benowitz and R. F. Tyndale. "Identification of novel CYP2A6\* 1B variants: the CYP2A6\* 1B allele is associated with faster in vivo nicotine metabolism." *Clinical Pharmacology & Therapeutics* (2008) 83(1): 115-121.

Naderi, N. J., S. Farhadi and S. Sarshar. "Micronucleus assay of buccal mucosa cells in smokers with the history of smoking less and more than 10 years." *Indian Journal of Pathology and Microbiology* (2012) 55(4): 433.

Nanjappa, V., S. Renuse, G. J. Sathe, R. Raja, N. Syed, A. Radhakrishnan, T. Subbannayya, A. Patil, A. Marimuthu and N. A. Sahasrabuddhe. "Chronic exposure

to chewing tobacco selects for overexpression of stearoyl-CoA desaturase in normal oral keratinocytes." *Cancer biology & therapy* (2015) 16(11): 1593-1603.

Nersesyan, A., M. Fenech, C. Bolognesi, M. Mišík, T. Setayesh, G. Wultsch, S. Bonassi, P. Thomas and S. Knasmüller. "Use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay in occupational biomonitoring of genome damage caused by in vivo exposure to chemical genotoxins: Past, present and future." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* (2016) 770: 1-11.

Nishikawa, A., Y. Mori, I.-S. Lee, T. Tanaka and M. Hirose. "Cigarette smoking, metabolic activation and carcinogenesis." *Current drug metabolism* (2004) 5(5): 363-373.

Norppa, H. "Genetic susceptibility, biomarker responses, and cancer." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* (2003) 544(2): 339-348.

Obe, G., P. Pfeiffer, J. Savage, C. Johannes, W. Goedecke, P. Jeppesen, A. Natarajan, W. Martinez-López, G. Folle and M. Drets. "Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* (2002) 504(1): 17-36.

Onder, Z. "The economics of tobacco in Turkey: new evidence and demand estimates." *Tobacco Control* (2002).

World Health Organization, Research for International Tobacco Control. WHO report on the global tobacco epidemic, 2008: the MPOWER package. World Health Organization, 2008.

World Health Organization. WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking 2015. World Health Organization, 2015.

Parkin, D. M., P. Pisani and J. Ferlay. "Global cancer statistics." *CA: a cancer journal for clinicians* (1999) 49(1): 33-64.

Patton, George C., et al. "Teen smokers reach their mid twenties." *Journal of Adolescent Health* 39.2 (2006): 214-220.

Peto, R., S. Darby, H. Deo, P. Silcocks, E. Whitley and R. Doll. "Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies." *Bmj* (2000) 321(7257): 323-329.

Peto, R. and A. D. Lopez. "The future worldwide health effects of current smoking patterns." *Tobacco and public health: Science and policy* (2004): 281-286.

Pfeifer, Gerd P., et al. "Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers." *Oncogene* 21.48 (2002): 7435.

Raitasalo, K., P. Huhtanen, M. Miekkala and S. Ahlström (2012). Nuorten päihteyden käyttö Suomessa 1995-2011-Espad-tutkimuksen tulokset, THL.

Rana, S., Y. Verma and G. D. Singh. "Assessment of genotoxicity amongst smokers, alcoholics, and tobacco chewers of North India using micronucleus assay and urinary 8-hydroxyl- 2'-deoxyguanosine, as biomarkers." *Environmental Monitoring and Assessment* (2017) 189(8): 391.

Rebbeck, T. R. "Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility." *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* (1997) 6(9): 733-743.

Rodgman, A. and C. R. Green. "Toxic chemicals in cigarette mainstream smoke-hazard and hoopla." *Beiträge zur Tabakforschung/Contributions to Tobacco Research* (2003) 20(8): 481-545.

Rodgman, A. and T. A. Perfetti. "The chemical components identified in tobacco and tobacco smoke prior to 1954: a chronology of classical chemistry." *Beiträge zur Tabakforschung/Contributions to Tobacco Research* (2009) 23(5): 277-333.

Sabbioni, G., C. R. Jones, O. Sepai, A. Hirvonen, H. Norppa, H. Järventaus, H. Glatt, D. Pomplun, H. Yan and L. R. Brooks. "Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility in workers exposed to nitrotoluenes." *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* (2006) 15(3): 559-566.

Saffer, H. and F. Chaloupka. "The effect of tobacco advertising bans on tobacco consumption." *Journal of health economics* (2000) 19(6): 1117-1137.

Sanner, T. and T. K. Grimsrud. "Nicotine: carcinogenicity and effects on response to cancer treatment—a review." *Frontiers in oncology* (2015) 5.

Sardas, S., G. Z. Omurtag, A. Tozan, H. Gül and D. Beyoglu. "Evaluation of DNA damage in construction-site workers occupationally exposed to welding fumes and solvent-based paints in Turkey." *Toxicology and Industrial Health* (2010) 26(9): 601-608.

Sasco, A., M. Secretan and K. Straif. "Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence." *Lung cancer* (2004) 45: S3-S9.

Schottenfeld, David. "Epidemiology of cancer of the esophagus." *Seminars in oncology*. Vol. 11. No. 2. Elsevier, 1984.

Schrek, Robert, et al. "Tobacco smoking as an etiologic factor in disease. I. Cancer." *Cancer research* 10.1 (1950): 49-58.

Sedelnikova, O. A., A. Nakamura, O. Kovalchuk, I. Koturbash, S. A. Mitchell, S. A. Marino, D. J. Brenner and W. M. Bonner. "DNA double-strand breaks form in bystander cells after microbeam irradiation of three-dimensional human tissue models." *Cancer research* (2007) 67(9): 4295-4302.

Shafey, O., E. Fernández, M. Thun, A. Schiaffino, S. Dolwick and V. Cokkinides. "Cigarette advertising and female smoking prevalence in Spain, 1982–1997." *Cancer* (2004) 100(8): 1744-1749.

Shafi, F. "The effects of smoking on micronucleus frequencies in buccal cells of healthy Iraqi individuals." *World Journal of Pharmaceutical Research* (2015) 4: 406-415.

Shimizu, N., N. Itoh, H. Utiyama and G. M. Wahl. "Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase." *The Journal of cell biology* (1998) 140(6): 1307-1320.

Siahpush, M., A. McNeill, D. Hammond and G. Fong. "Socioeconomic and country variations in knowledge of health risks of tobacco smoking and toxic constituents of smoke: results from the 2002 International Tobacco Control (ITC) Four Country Survey." *Tobacco control* (2006) 15(suppl 3): iii65-iii70.

Steptoe, A., J. Wardle, W. Cui, F. Bellisle, A.-M. Zotti, R. Baranyai and R. Sanderman. "Trends in smoking, diet, physical exercise, and attitudes toward health in European university students from 13 countries, 1990–2000." *Preventive medicine* (2002) 35(2): 97-104.

Stewart, B. W. and P. Kleihues (2003). *World cancer report*, IARC press Lyon.

Stice, E. and E. E. Martinez. "Cigarette smoking prospectively predicts retarded physical growth among female adolescents." *Journal of Adolescent Health* (2005) 37(5): 363-370.

Stich, H. F., J. R. Curtis and B. B. Parida. "Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers." *International Journal of Cancer* (1982) 30(5): 553-559.

Şardaş, S., S. Gök and A. Karakaya. "Increased frequency of sister chromatid exchanges in the peripheral lymphocytes of cigarette smokers." *Toxicology in vitro* (1991) 5(3): 263-265.

Taioli, E. and E. L. Wynder. "Effect of the age at which smoking begins on frequency of smoking in adulthood." *N Engl J Med* (1991) 325(13): 968-969.

Thomas, P., N. Holland, C. Bolognesi, M. Kirsch-Volders, S. Bonassi, E. Zeiger, S. Knasmueller and M. Fenech. "Buccal micronucleus cytome assay." *Nature protocols* (2009) 4(6): 825.

Thomas, P., K. Umegaki and M. Fenech. "Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay." *Mutagenesis* (2003) 18(2): 187-194.

Tolbert, P. E., C. M. Shy and J. W. Allen. "Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development." *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* (1992) 271(1): 69-77.

Tønnesen, P. "How to reduce smoking among teenagers." *European Respiratory Journal* (2002) 19(1): 1-3.

Toubi, E. and Y. Shoenfeld. "Protective autoimmunity in cancer." *Oncology reports* (2007) 17(1): 245-251.

Trosko, James E., et al. "Ignored hallmarks of carcinogenesis: stem cells and cell-cell communication." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1028.1 (2004): 192-201.

Tso, T. "Seed to smoke." *Tobacco: production, chemistry and technology*. Oxford: Blackwell Science (1999): 1-31.

Vondracek, M., Z. Xi, P. Larsson, V. Baker, K. Mace, A. Pfeifer, H. Tjälve, M. T. Donato, M. J. Gomez-Lechon and R. C. Grafström. "Cytochrome P450 expression and related metabolism in human buccal mucosa." *Carcinogenesis* (2001) 22(3): 481-488.

Wang, X., P. Thomas, J. Xue and M. Fenech. "Folate deficiency induces aneuploidy in human lymphocytes in vitro—evidence using cytokinesis-blocked cells and probes specific for chromosomes 17 and 21." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* (2004) 551(1): 167-180.

Warren, C. W., N. R. Jones, A. Peruga, J. Chauvin, J.-P. Baptiste, d. S. V. Costa, F. el Awa, A. Tsouros, K. Rahman and B. Fishburn. "Global youth tobacco surveillance, 2000-2007." Morbidity and mortality weekly report. Surveillance summaries (Washington, DC: 2002) (2008) 57(1): 1-28.

Warren, C. W., L. Riley, S. Asma, M. P. Eriksen, L. Green, C. Blanton, C. Loo, S. Batchelor and D. Yach. "Tobacco use by youth: a surveillance report from the Global Youth Tobacco Survey project." Bulletin of the world Health Organization (2000) 78(7): 868-876.

Watson, J. D. and F. H. Crick. "Molecular structure of nucleic acids." Nature (1953) 171(4356): 737-738.

Witschi, H. "A short history of lung cancer." Toxicological sciences (2001) 64(1): 4-6.

Wu, Ping-An, et al. "Clastogenic effect for cigarette smoking but not areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosal cells." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 562.1 (2004): 27-38.

Zamani, Ayse G., et al. "Evaluation of smoking genotoxicity in Turkish young adults." Indian journal of human genetics 17.1 (2011): 7.

Zevin, S. and N. L. Benowitz. "Drug interactions with tobacco smoking." Clinical pharmacokinetics (1999) 36(6): 425-438.

## 9. EKLER

### 9.1 Anket Formu

#### ANKET FORMU

.. / .. / 2017

Kod: ....

Adı Soyadı: .....

Yaşı: ..... Cinsiyeti: .....

Doğum yeri: .....

Yaşadığınız şehir: .....

Telefon: .....

1. Nerede çalışıyorsunuz, göreviniz? Kaç yıldır?

.....

2. Eğitim düzeyiniz:

İlkokul ☐ Ortaokul ☐ Lise ☐ Üniversite ☐

3. Aile bireylerinde ve sizde genetik bir hastalık var mı? Tipi: .....

Yok ☐ Var ☐ Yakınlık derecesi:

4. Herhangi bir hastalığı olan (kendinizde ve/veya ailenizde):

Şeker hastası olan: ☐

Kalp hastalığı: ☐

Hipertansiyon ☐

Kanser ☐ Karaciğer ☐ Böbrek ☐ Alzheimer, erken bunama ☐ Parkinson ☐ Diğer ☐

Ailenizde:

Kanserden ölen:

Kalpten ölen:

5. Sürekli kullandığınız ilaç/vitamin var mı? Evet ☐ Hayır ☐ Adı:

Ne kadar zamandır kullanıyorsunuz:

6. Son iki yılda herhangi bir viral enfeksiyon geçirdiniz mi?

Influenza ☐ Sarılık ☐ Kızamık ☐ Kızamıkçık ☐ Su çiçeği ☐

Kabakulak ☐ Menenjit ☐

7. Sigara içme alışkanlığı:

Hiç içmedim ☐

Eskiden içerdim ☐

Ne zaman bıraktınız:.....

Halen içiyorum ☐

Ne sıklıkta içiyorsunuz:.....sigara/gün

Kaç yıldır içiyorsunuz: ..... ☐ Filtreli ☐ Filtresiz

8. Sigara içilen ortamlarda sıkça bulunuyor musunuz? Evet ☐ Hayır ☐

9. Alkol kullanma alışkanlığınız var mı? Evet ☐ Hayır ☐

rakı ☐ şarap ☐ bira ☐ Diğer ☐

Ne sıklıkta; Nadiren ☐ Haftada 1 kez ☐ Haftada 2-3 kez ☐

Haftada 4-5 kez ☐ Haftada 6-7 kez ☐

10. Son yıllarda röntgen çektirdiniz mi?

Evet [Göğüs röntgeni ☐ Diş röntgeni ☐ Diğer ☐] Hayır ☐

11. Beslenme alışkanlığınız;

meyve-sebze ağırlıklı ☐

et protein ağırlıklı ☐

çay ve kahve ☐

12. Düzenli olarak egzersiz yapıyor musunuz?: Evet ☐ Hayır ☐

Haftada 3 kez 30 dakika tempolu yürüyüş: ☐

Haftada 1 kez ☐ Haftada 2-3 kez ☐ Daha fazla ☐

En son ne zaman yaptınız?.....



## 9.2 Etik Kurul Onayı



### Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

|                      |                               |                                                                                                                                                                |
|----------------------|-------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| BAŞVURU<br>BİLGİLERİ | PROTOKOL KODU                 | 09.2017.382                                                                                                                                                    |
|                      | PROJE ADI                     | Türkiye'de Sigara Kullanan Genç Bireylerin Bukkal Hücrelerinde Genotoksik Hasarın Mikroçirdek Yöntemi ile Belirlenmesi: Prospektif Randomize Kontrollü Çalışma |
|                      | SORUMLU ARAŞTIRICI ÖNVANI/ADI | Yrd. Doç. Dr. Ayfer BECEREN                                                                                                                                    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| KARAR BİLGİLERİ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Tarih: 05.05.2017 |
| Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, bölük vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurulu bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir. |                   |

| Üyeler | Unvanı / Adı / Soyadı        | Uzmanlık Dalı                 | Kurumu / EK Üyeliği                   | Onaylanan Proje ile İlgisi | Toplantıya Katılım                                                      | İmza |
|--------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------|------|
|        | Prof.Dr. Hacer DİREKENELİ    | Romatoloji                    | M.Ü Tıp Fakültesi/ Başkan             | Var - Yok                  | <input type="checkbox"/> Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır |      |
|        | Prof.Dr. Yülin ERGUN         | Dermatoloji                   | M.Ü Tıp Fakültesi/ Başkan Yrd.        | Var - Yok                  | <input type="checkbox"/> Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır |      |
|        | Prof. Dr. Şefika GÖRKEY      | Tıp Tarihi ve Etik            | M.Ü Tıp Fakültesi/ Üye                | Var - Yok                  | <input type="checkbox"/> Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır |      |
|        | Prof.Dr. Handan KAYA         | Patoloji                      | M.Ü Tıp Fakültesi/ Üye                | Var - Yok                  | <input type="checkbox"/> Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır |      |
|        | Prof.Dr. M.Bahadır GÜLLÜOĞLU | Genel Cerrahi                 | M.Ü Tıp Fakültesi/ Üye                | Var - Yok                  | <input type="checkbox"/> Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır |      |
|        | Prof.Dr. Atilla KARAAALP     | Farmakoloji                   | M.Ü Tıp Fakültesi/ Üye                | Var - Yok                  | <input type="checkbox"/> Evet <input checked="" type="checkbox"/> HAYIR |      |
|        | Prof.Dr. Semra SARDAŞ        | Eczacı                        | M.Ü Eczacılık Fak. Üye                | Var - Yok                  | <input type="checkbox"/> Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır |      |
|        | Prof.Dr. Başak DOĞAN         | Diş Hekimi                    | M.Ü Diş Hekimliği Fak. Üye            | Var - Yok                  | <input type="checkbox"/> Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır |      |
|        | Prof. Dr. Beste Malek ATASOY | Radyasyon Onkolojisi          | M.Ü Tıp Fakültesi/ Üye                | Var - Yok                  | <input type="checkbox"/> Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır |      |
|        | Doç. Dr. EBF KARAKOÇ AYDINER | Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları | M.Ü Tıp Fakültesi/ Üye                | Var - Yok                  | <input type="checkbox"/> Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır |      |
|        | Doç.Dr. Meltem KORAY         | Diş Hekimi                    | İstanbul Üniv. Diş Hekimliği Fak. Üye | Var - Yok                  | <input type="checkbox"/> Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır |      |
|        | Doç. Dr. Gürkan SERT         | Hukukçu                       | M.Ü Tıp Fakültesi/ Üye                | Var - Yok                  | <input type="checkbox"/> Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır |      |
|        | Yrd.Doç.Dr. Figen DEMİR      | Halk Sağlığı                  | Acıbadem Üniv. Tıp Fak.               | Var - Yok                  | <input type="checkbox"/> Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır |      |
|        | Yrd.Doç.Dr. Pınar Mega TİBER | Biyoetik                      | M.Ü Tıp Fakültesi/ Üye                | Var - Yok                  | <input type="checkbox"/> Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır |      |
|        | Gülde Aynur MİRZA            | Sağlık Menajeri olmayan kişi  | Serbest                               | Var - Yok                  | <input type="checkbox"/> Evet <input checked="" type="checkbox"/> Hayır |      |

## 10. ÖZGEÇMİŞ

|            |             |              |                    |
|------------|-------------|--------------|--------------------|
| Adı        | Gülis Cansu | Soyadı       | Dökmeci            |
| Doğum Yeri | Ankara      | Doğum Tarihi | 25.10.1990         |
| Uyruğu     | TC          | Tel          | 02164142962 (1196) |
| E-mail     |             |              |                    |

### Eğitim Düzeyi

|               | Mezun Olduğu Kurumun Adı                                                                  | Mezuniyet Yılı |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| Yüksek Lisans | Pharmazeutische Chemie Rheinische Friedrich Wilhelms Universität Bonn                     | 2015-2016      |
| Lisans        | Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü | Haziran 2013   |
| Lise          | Edirne Anadolu Öğretmen Lisesi                                                            | Haziran 2009   |

### İş Deneyimi

|                 | Görevi            | Kurum    | Süre (Yıl - Yıl) |
|-----------------|-------------------|----------|------------------|
| Yabancı Dilleri | Okuduğunu Anlama* | Konuşma* | Yazma*           |
| İngilizce       | Çok İyi           | Çok İyi  | Çok İyi          |
| Almanca         | İyi               | İyi      | İyi              |

### Yabancı Dil Sınav Notu #

|       |     |       |           |           |           |     |     |     |
|-------|-----|-------|-----------|-----------|-----------|-----|-----|-----|
| YDS   | ÜDS | IELTS | TOEFL IBT | TOEFL PBT | TOEFL CBT | FCE | CAE | CPE |
| 63.75 |     | 6.5   |           |           |           |     |     |     |

|               | Sayısal | Eşit Ağırlık | Sözel |
|---------------|---------|--------------|-------|
| ALES Puanı    | 78.13   |              |       |
| (Diğer) Puanı |         |              |       |

### Bilgisayar Bilgisi

| Program                                  | Kullanma becerisi |
|------------------------------------------|-------------------|
| Microsoft Office Word, Excel, Powerpoint | Çok İyi           |

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz