

## Sigara İçenlerde Yanak Mukozası Epitel Hücrelerindeki Toksisitenin Belirlenmesi

### Determination of Toxicity in Epithelial Cells of Buccal Mucosa of Smokers

Kültiğın ÇAVUŞOĞLU<sup>1</sup>, Kürşad YAPAR<sup>2</sup>, Emine YALÇIN<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Giresun Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Giresun

<sup>2</sup>Giresun Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu, Giresun

<sup>3</sup>Kırıkkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kırıkkale

#### Özet

**Amaç:** Sigara içenlerde yanak mukozası epitel hücrelerinde oluşan toksisitenin mikronükleus testi uygulanarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Gruplar sigara kullanan (n=20) ve kullanmayan (n=20) bireylerden oluşturuldu ve bireylere mikronükleus testi uygulandı. Mikronükleus sıklığı, yanak mukozası yüzeyi taranarak elde edilen hücrelerin "Feulgen/Fast Green" ile boyanan yayma preparatlarında belirlendi. Gruplar arasındaki farklar varyans analizi ve Duncan testleri ile belirlendi.

**Bulgular:** Mikronükleuslu hücrelerin ortalama yüzdesi, sigara kullananlarda kullanmayanlara göre önemli oranda daha yüksekti (p<0.05). Ayrıca, sigara kullanan ve kullanmayan kadın ve erkeklerde mikronükleuslu hücrelerin ortalama yüzdeleri arasında fark yoktu (p>0.05).

**Sonuç:** Bu bulgular, mikronükleus testinin sigara tarafından oluşturulan toksisitenin belirlenmesinde biyolojik bir belirteç olarak kullanılabileceğini gösterdi.

**Anahtar Sözcükler:** mikronükleus testi, sigara, sitotoksisite, yanak mukoza epiteli

#### Abstract

**Objective:** In the present study, the micronucleus test was applied in epithelial cells of buccal mucosa to assess the cytotoxicity induced by cigarette.

**Method:** Therefore, donors were divided into two groups; as smokers and non-smokers. Micronucleus frequency was determined on "Feulgen/Fast Green"-stained smear preparations of epithelial cells obtained by scraping the surface of the buccal mucosa.

**Results:** The mean percentage of micronucleated cells were significantly higher in smokers than in non-smokers (p<0.05). Besides, there was no difference between the mean percentage of micronucleated cells in female and male smokers and non-smokers (p>0.05).

**Conclusion:** These findings suggest that micronucleus test may be used as a biological marker to determine the toxicity induced by cigarette.

**Key Words:** micronucleus test, cigarette, cytotoxicity, buccal mucosa epithelial

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg, 2008;1(2);26-29

Geliş Tarihi : 08.05.2008

Kabul Tarihi : 13.06.2008

#### Yazışma Adresi:

Dr. Kültiğın ÇAVUŞOĞLU

Giresun Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Debboy Mevkii, 28049 -Giresun

Tel : 0-454-2161255/160

Faks : 0-454-2164518

E-posta : kultigincavusoglu@mynet.com

## Giriş ve Amaç

Sigara içme alışkanlığı bireyin vazgeçmekte zorlandığı ve bu nedenle çeşitli sağlık problemleri ile karşı karşıya kaldığı en ciddi alışkanlıklardan biridir. Sigara bağımlılığı bugün tüm dünya ülkelerini yakından ilgilendiren ve gün geçtikçe oranı artan ortak bir sorundur. Özellikle de bu artış genç yaş grubunda kendini göstermektedir. Türkiye, kişi başına düşen sigara tüketimi bakımından Avrupa ülkeleri içerisinde Yunanistan'dan sonra ikinci sırada yer almaktadır (1).

Sigara dumanı farmakolojik, antijenik, mutajenik, karsinojenik ve sitotoksik özellikleri olan 5.000'den fazla kimyasal madde içermektedir. Bu maddelerden bazıları katran, fenol, benzo(a)pyrene gibi maddeler olup, hücre için son derece toksik bir özelliğe sahiptirler (2). Sigaranın içeriğinde bulunan tüm bu maddeler damar tıkanıklığı, kalp spazmı, astım, görme bozukluğu gibi hastalıklara neden olabildikleri gibi, başta akciğer kanseri olmak üzere mesane, böbrek, mide, pankreas, meme ve lösemi gibi çeşitli kanser tiplerinin meydana gelmesinde de aktif olarak rol oynarlar (3,4).

Sigaranın bir diğer etkisi ise mikronükleus (MN) oluşumu ile ilgilidir. MN, mitoz bölünmenin anafaz ya da metafaz safhaları sırasında, tüm bir kromozomun kaybı ya da kırılmasından sonra ana nükleus içerisine giremeyen asentrik bir kromozom parçasıdır (5). MN testi yaklaşık 35 yıl önce Schmid tarafından ortaya atılmıştır (6). Bu test sayımı oldukça kolay olan ve insanlarda lenfosit, fibroblast ve epitel hücreleri gibi değişik hücre tipleri için rahatlıkla uygulanabilen bir yöntemdir. Bu nedenle de, günümüzde insanlarda çeşitli ajanlar tarafından meydana getirilen toksisitenin belirlenmesinde kullanılan standart tekniklerden biri haline gelmiştir (7). Hatta kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayımına olanak sağlaması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar vermesi nedeniyle, sitotoksitenin tespitinde kullanılan diğer yöntemlere göre daha da avantajlı bir teknik haline almıştır.

Bu çalışmada, MN testi sitotoksitenin bir belirtici gibi kullanılarak, genç yaşta bireylerden alınan yanak mukozası epitel hücrelerinde sigara tarafından meydana getirilen toksisitenin boyutları belirlenmeye çalışılmıştır.

## Yöntem

### Bireylerin Seçimi

Bu çalışma sigara kullanan ve kullanmayan 40 birey ile gerçekleştirilmiştir. Bireylerden 20 tanesi kadın 20 tanesi ise erkektir. Erkek ve kadın bireylerden 10'ar tanesi sigara kullanan 10'ar tanesi ise kullanmayan bireylerdir. Gruplara dahil edilen bireyler belirlenirken, geçmişte viral bir hastalık geçirmemiş olmalarına (en azından bir yıl içerisinde), sigara kullanan bireyler için en azından 5 yıldır sigara içiyor olmalarına, sigaranın dışında alkol ve diğer tütün ürünlerini kullanmıyor olmalarına dikkat

edilmiştir. Seçilen bireylerin yaş ortalamaları  $23 \pm 1.6$ 'dır. Sigara içen ve içmeyen gruplar arasındaki yaş ortalamaları ise istatistiksel olarak anlamsızdır ( $p > 0.05$ ). Çalışmada kullanılan bireylerin yaş özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan bireylerin yaş özellikleri

Gruplar	Ortalama $\pm$ SS	Min-Maks
Grup I (n=10)	23.10 $\pm$ 1.60	21-25
Grup II (n=10)	23.40 $\pm$ 1.43	21-25
Grup III (n=10)	22.90 $\pm$ 1.20	21-25
Grup IV (n=10)	22.70 $\pm$ 2.21	20-25

\*Grup I (kontrol grubu): Sigara kullanmayan erkek bireyler, Grup II (kontrol grubu): Sigara kullanmayan kadın bireyler, Grup III: Sigara kullanan erkek bireyler, Grup IV: Sigara kullanan kadın bireyler

### Mikronükleus Testi

Bireylerden örnek alınmadan önce, her bir bireyin ağzını çeşme suyu ile çalkalanması sağlandı. Nemli bir kürdan yardımıyla yanak mukozasından sürüntü alındı. Hücreler temiz lamalar üzerine yerleştirildi ve havada kurutuldu. On dakika süreyle metanol-asetik asit (3 metanol:1 asetik asit) karışımında fikse edildi. Otuz dakika Feulgen ile muamele edildi ve %0.5'lik alkolde hazırlanan Fast Green ile boyandı (8).

MN sıklığını belirlemek için her bir preparatta 1000 hücre araştırıldı. Mikronükleuslu hücrelerin varlığı binoküler ışık mikroskopunda (Japan, Olymplus BX51) X100 büyütmede belirlendi ve X500 büyütmede fotoğraflandı. MN sayımı Fenech ve ark. (9) tarafından belirlenen kriterlere göre değerlendirildi. Bu kriterlere göre: (i) MN çapı ana nükleusun 1/3'ü olmalı, (ii) MN ile hücrenin temel çekirdeğinin kenarları birbirlerine temas edebileceği gibi etmeyebilir, fakat temas ettiği durumlarda bu aradaki sınırın belirgin bir şekilde ayırt edilmesi gerekmektedir, (iii) MN boyandığında temel çekirdeğin aldığı renge yakın bir renk almalıdır.

### İstatistiksel Analiz

Gruplar arasındaki farklar Windows 10.0 versiyondaki SPSS programı yardımıyla, varyans analizi (ANOVA) ve Duncan testleri gerçekleştirilerek belirlendi. Elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SS) olarak gösterildi ve  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## Bulgular

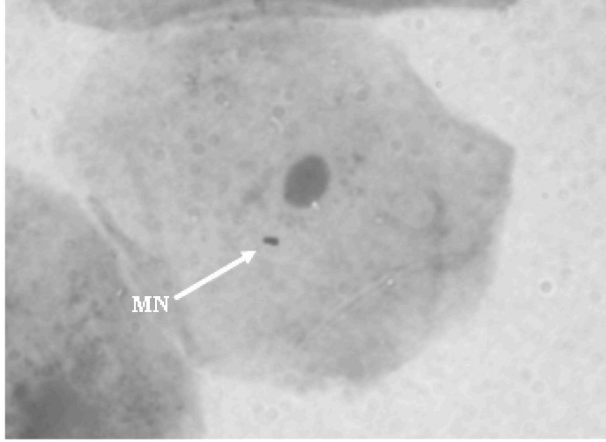
MN sıklığı ile ilgili veriler Tablo 2 ve Şekil 1'de gösterilmiştir. Bu verilerden de görülebileceği gibi MN sıklığı sigara kullanan bireylerde, sigara kullanmayan bireylere göre oldukça fazlaydı ( $p < 0.05$ ). Sigara kullanan erkek ve kadın bireylerde sırasıyla ortalama  $2.60 \pm 0.82$ ,

2.65±0.81, sigara kullanmayan bireylerde ise ortalama 15.90±1.89, 15.95±1.99 oranında MN oluşumu gözlemlendi. Ayrıca araştırma sonucunda kadın ve erkek bireyler arasındaki MN sayıları bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ( $p>0.05$ ).

**Tablo 2.** Sigara kullanan ve kullanmayan gruplara ait MN sıklığı

Gruplar	n	Erkek		Kadın	
		Ort ± SS	Min-Maks	Ort ± SS	Min-Maks
Sigara içmeyen	10	2.60±0.82 <sup>b</sup>	2-4	2.65±0.81 <sup>b</sup>	2-4
Sigara içen	10	15.90±1.89 <sup>a</sup>	12-18	15.95±1.99 <sup>a</sup>	11-19

<sup>a</sup>: Kontrol grubundan farkı istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0.05$ )



**Şekil 1.** Yanak mukozası epitel hücresinde MN'nin görünümü (Feulgen/Fast Green X 500)

## Tartışma ve Sonuç

Mikronükleus testi çevresel ajanlar tarafından meydana getirilen toksisitenin belirlenmesinde kullanılan hızlı, kolay ve oldukça hassas yöntemlerden biridir (8,10). Bu çalışmada MN testi yanak mukozasının epitel hücrelerine biyolojik bir belirteç olarak uygulanarak, sigara tarafından teşvik edilen sitotoksitenin boyutları belirlenmeye çalışıldı. Sonuçta MN sayılarının sigara kullanan bireylerde, sigara kullanmayan bireylere göre oldukça fazla olduğu, yani sigara kullanımının MN oluşum sayısını arttırdığı tespit edildi. Sigara kullanan bireylerde gözlenen bu artışın istatistiksel olarak da anlamlı olduğu belirlendi ( $p<0.05$ , Tablo 2 ). Bu sonuç şimdiye kadar bu konu ile ilgili rapor edilmiş benzer çalışmadaki sonuçlar ile paralellik göstermektedir. Özkul ve ark. (8) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada sigara ve tütün kullanan bireyler ile her ikisini de kullanmayan kontrol grubu bireylerin yanak epitel hücrelerinde MN sıklıkları karşılaştırılmış, sonuçta tütün ve sigara kullanan

bireylerde MN sıklığının kontrol grubuna göre oldukça arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Ancak sigara ve tütün kullanan bireylerde belirlenen MN sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı tespit edilmiştir. Benzer bir çalışmada ise, Hindistan'daki ağız kanserleri vakalarının en büyük sebebi olarak bilinen sigara kullanımının MN sıklığı üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla sigara bağımlısı olan 25 birey ile sigara kullanmayan kontrol grubu 25 bireyin dil, ağız ve yanak mukozası epitel hücrelerine MN testi uygulanmıştır. Sonuçta sigara kullanan bireylerin damak ve yanak mukozası epitel hücrelerinde tespit edilen MN sıklığının, kontrol grubundaki bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu, dil epitelindeki MN artışının ise anlamlı olmadığı bildirilmiştir (11).

Bazı yayınlarda MN sayısı ile cinsiyet arasında bir ilişkinin olduğu ve kadın bireylerde MN oluşum oranının, erkek bireylere oranla daha fazla olduğu rapor edilmektedir (12-15). Bu çalışmada, sigara kullanan kadın ve erkek bireylerde gözlenen MN sayıları arasında fark olup olmadığı da araştırıldı. Sonuçta bu iki grup arasında MN sayıları bakımından anlamlı bir fark gözlenmedi. Mikroskopik düzeyde gerçekleştirilen sayımlar sonucunda MN sıklığı ile cinsiyet arasında doğrudan bir ilişki tespit edilemedi.

Sonuç olarak, bu çalışmada sigara kullanan bireylerde mikronükleus testi ile saptanan MN sıklığındaki anlamlı artışın toksisite göstergesi olabileceği düşünüldü ve MN testinin sigara tarafından oluşturulan toksisitenin belirlenmesinde biyolojik bir belirteç olarak kullanılabileceği kanısına varıldı.

## Kaynaklar

1. Azak A. Sağlık Memurluğu Öğrencilerinin Sigara Kullanımını Etkileyen Faktörler. *Toraks Derg* 2006;7(2):120-4.
2. Behr J, Nowak D. Tobacco smoke and respiratory disease. *Eur Respir Monograph* 2002;21:161-79.
3. Sarıcaoğlu H. Sigaranın Deri Hastalıkları Üzerine Etkileri. *Türkderm* 2003;38:248-56.
4. Mayor S. Pregnancy and early smoking increases breast cancer risk. *BMJ* 2002;325(7368):793.
5. Demirel S, Zamani AG. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi* 2002;12(3):123-7.
6. Slowinski J, Bierzynska-Macyszyn G, Mazurek U, Widel M, Latocha M, Stomal M, Snietura M, Mrowka R. Cytokinesis block micronucleus assay in human glioma cells exposed to radiation. *Image Anal Stereol* 2004;23:159-65.

7. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res-Fund Mol M* 2006;600(1-2):58-66.
8. Özkul Y, Dönmez H, Erenmemişoğlu A, Demirtaş H, İmamoğlu N. Induction of micronuclei by smokeless tobacco on buccal mucosa cells of habitual users. *Mutagenesis* 1997;12(4):285-7.
9. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. Human Micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 2003;534:65-75.
10. Stich HF, Rosin MP. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *Int J Cancer* 1983;31:305-8.
11. Suhas S, Ganapathy KS, Gayatrivedi K, Ramesh C. Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. *Mutat Res-Gen Tox En* 2004;561 (1-2):15-21.
12. Çakmak G. Trafik polisleri ve taksi sürücülerinde hava kirliliği maruziyet'ine yönelik idrarda 1-hidroksipiren değerlerinin, periferik lenfositlerde kromozomal aberasyon ve mikroçekirdek sıklıklarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2000.
13. Burgaz S, Demircigil GÇ, Yılmaz M, Ertaş N, Kemaloğlu Y, Burgaz Y. Assessment of cytogenetic damage in lymphocytes and in exfoliated nasal cells of dental laboratory technicians exposed to chromium, cobalt and nickel. *Mutat Res* 2002;521:47-56.
14. Norppa H, Falk GC. What do human micronuclei contain? *Mutagenesis* 2003;18(3):221-3.
15. Thierens H, Aousalah B, Vral A, Ridder LD, Barbe M. A chromosomal radiosensitivity study of a population of a radiation workers using the micronucleus assay. *Int J of Low Radiation* 2003;1:102-12.