

## AgNOR Yöntemi ile İnsan Epidermisinden Yaş Tespiti

Aysun BARANSEL ISIR<sup>a,1</sup>, Kemal BAKIR<sup>2</sup>, Ramazan UÇAK<sup>2</sup>, Hikmet Ergin DÜLGER<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı ve,

<sup>2</sup> Patoloji Anabilim Dalı, GAZİANTEP

### ÖZET

**Amaç:** Özellikle kimlik tespiti yapılamamış postmortem örneklerden, yaş tespiti yapılması adli tıp için henüz netlik ve pratik uygulamada kolaylık gösterememiş, oldukça önemli bir problem olmaya devam etmektedir. Bu amaçla normal hücrelerin proliferatif aktivitesine göre değerlendirilen kantitatif metodlar denenmektedir. Biz de çalışmamızda AgNOR boyama yöntemi ile insan epidermisinden alınan küçük doku örnekleri ile özellikle kimliği belirlenememiş postmortem olgularda yaş tespitinin yapılabilirliğini göstermeyi amaçladık.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çalışmada mitotik aktivite, nükleolar organize edici bölgelerin gümüşle boyanması esasına dayalı AgNOR yöntemiyle incelendi ve ortalama proliferatif indeks elde edildi. Bu indekse bağlı AgNOR dağılımları skoru yaş gruplarına göre ilişkilendirildi.

**Bulgular:** Çalışmaya geçmişinde herhangi bir tümoral hastalık hikayesi olmadığı öğrenilen postmortem örneklerin toplandığı, yeni doğan (0-12 ay), infant (1-5 yaş), erişkin (25-35 yaş), 50 yaş ve üzeri olmak üzere 23 Erkek (E), 15 Kadın (K) toplam 38 olgudan 4 yaş grubu oluşturuldu. Yaş gruplarına göre AgNOR dağılım skorları arasında fark saptandı ve istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulundu ( $p < 0.01$ ).

**Sonuç:** Bu çalışma ile postmortem küçük dokulardan AgNOR boyama yöntemi ile yaş tespiti yapılabileceği, ancak sağlıklı bir değerlendirme için daha geniş vaka serilerine ihtiyaç olduğu sonucuna varıldı. ©2004, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi

**Anahtar kelimeler:** AgNOR, yaş tespiti, adli tıp, küçük doku

### ABSTRACT

#### Age Estimation from Human Skins by Using AgNOR

**Objective:** The age estimation of postmortem diagnosis is a considerable problem in forensic issues. For age estimation, numerical methods that are evaluated according to proliferative activity of normal cells are tested. AgNOR was exceptionally applied for estimation of chronological ages of unidentified individuals in this study. Use of this method for forensic purposes is presented as an alternative method to determine the age of an individual. Some difficulties seen in the other methods used in routines tried to overcome.

**Method:** In this study, mitotic activity was examined by AgNOR method that was based on silver-staining of nucleolar organizer regions (NORs), and average proliferative index was obtained. These index datas were related eachother according to age groups.

**Results:** The study was conducted on 38 postmortem samples (23 males and 15 females) without any tumoral pathology in their past. Samples were divided into four age groups; which were newborns (0-12 months), infants (ages of 1-5), adults (ages of 25-35), and olds (ages of 50 and above). When a brief investigation was performed with AgNOR staining, age-related changes were certainly determined and were found a statistically significant correlation ( $p < 0.01$ ) in AgNOR.

**Conclusion:** In conclusion, although satisfaction in results was obtained for AgNOR, there was a need for further studies involving more individuals. Especially when the other morphological methods are of limited usefulness, AgNOR might be certainly a useful marker in estimating the age of human skin. ©2004, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi

**Key words:** AgNOR (Silver stained nucleolar organizer region), age estimation, forensic medicine, small tissue.

**A**dli tıpta yaş tayini oldukça önemli bir konudur. Yaş; cinsiyet, boy, vücut ağırlığı, saç, cilt, göz rengi, parmak izi, kemik ve dişler gibi bireyin tıbbi kimliğini oluşturan fiziksel yapılardan biridir.

Özellikle Adli tıpta cezai sorumluluk, hukuki ehliyet, farik ve mümeyyizlik, ahlaki readet fiili, ruhsal yönden mukavemet, askere alınma, memuriyete girme, okula başlama, emekli olma, sürücü belgesi alma gibi durumlarda kişinin yaş tespiti yasalara uygunluk açısından gündeme gelmektedir (1). Bu konuda birçok yöntem bulunmakla birlikte küçük dokulardan yaş tayini yapabilmek, adli tabirlere büyük kolaylıklar getirebilecektir.

Tanı amacıyla neoplastik dokuların, nonneoplastik dokulardan veya benign lezyonların malign lezyonlardan ayrılmasında etkili bir yöntem olan AgNOR'un değişik yaş gruplarında lenfositlerde farklı sayıda NOR beneklerini boyaması nedeniyle (2-6) farklı dokularda da yaş tayinine yardımcı olabileceği düşünüldü.

Histopatologlar, hastalıkların etiopatogenezinde rol alan unsurların etkisi sonucu, nükleus, DNA ve hücre kinetiğine yönelik, DNA flow sitometri (DNA ploidi ve hücre proliferasyonu) hücre proliferasyon belirleyicisi olan Ki-67 monoklonal antikor çalışmaları ve DNA-RNA in situ hibridizasyon yöntemlerine, Nükleolar Organizasyon Bölgeleri

<sup>a</sup> Yazışma Adresi: Dr. Aysun Baransel Isır, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Adli Tıp Anabilim Dalı, 27060 GAZİANTEP  
Fax: 0 342 3385000 e-mail: aybaransel@yahoo.com

(NOR) üzerindeki değişimlerin araştırılmasını eklediler. Bu çalışmalarda hiperplastik ve neoplastik durumlarda nükleolus ve nükleolar aktivasyonun belirlenmesinin yararlı olduğu düşünülmüştür (2).

Mc Clintock 1934'de karyotipte 2.darlık olarak gözlediği kısma "Nükleolar organizasyon bölgeleri" (NORs) adını vermiştir. NOR terimi nükleolün köken aldığı bölgeyi tanımlamaktadır. Nükleolar Organizasyon Bölgeleri (NOR), ribozomal RNA'nın kodlandığı kromozomal segmentlerdir. RNA polimeraz 1, B23 protein ve C23 proteinler gibi non-histon proteinlerle asosiyasyon halindedirler. AgNOR boyama yönteminde özellikle non-histon proteinlerinin tepkimeye girdiği ortaya konmuştur (2-8). NORs proteinleri, ribozomal DNA veya olası transkripsiyon düzeyinin göstergesi olarak görülmekte olup, AgNOR bölgelerinin gösterilmesinin hücre proliferasyon hızı, ploidi, transkripsiyonel aktivite ve tümörün malignite potansiyelinin değerlendirilmesi açısından yararlı olduğuna dair (deri, meme, lenfoid doku, kadın genital sistem, mesane, GIS) yayınlar vardır (9).

Günümüzde çok yönlü sürdürülen çalışmalar, yaş tespiti için en uygun yöntemin araştırılması üzerine yoğunlaşmıştır (10, 11).

Bu çalışmada değişik yaş gruplarından alınan karın cildi örneklerinin, AgNOR boyama yöntemi ile gösterilen hücre proliferasyonuna göre yaş tespitinde kullanılabilirliğinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

1999-2002 tarihleri arasında çeşitli nedenlerden dolayı farklı yaş grubunda exs olan 23 E, 15 K toplam 38 olgu çalışmaya alındı. Olguların geçmişinde herhangi bir tümoral hastalık hikayesi taşımadığı yakınlarından öğrenildi. Yenidoğan (0-12 ay) 4 (2E, 2K) olgu, infantil dönem (1-5 yaş) 11 (4E, 7K) olgu, adult dönem (25-35 yaş) 16 (13E, 3K) olgu ve yaşlı (50 yaş ve üzeri) 7 olgu (4E, 3K) olarak dört ayrı yaş grubu oluşturuldu.

**AgNOR boyama yöntemi :** Olgulardan 1x1 cm ebadında abdominal cilt örnekleri alındı. Formaldehid (%10'luk) içinde fikse edildi. Toz jelatin, formik asit ve gümüş nitrat %70'lik alkol fiksasyonunda hazırlanmış parafin bloklardan 4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Kesitler etüv ve ksilende deparafinize edilip, sırasıyla alkol ve deiyonize sudan geçirilerek rehidrate edildi (12).

**Solüsyonlar:** 100 ml deiyonize suya 1 gr/dl olacak şekilde formik asit eklendi. Bu karışım içine 2 gr jelatin katıldı. Hafif ısıtılarak, tamamen çözünmesi sağlanıp, soğumaya bırakıldı. 50 gr/dl olacak şekilde gümüş nitrat, deiyonize su ile karıştırıldı. AgNOR solüsyonu yukarıda tanımlanan %2 toz jelatin içeren formik asit solüsyonundan 1 volüm, gümüş nitratlı solüsyondan 2 volüm, boyama sırasında karıştırılarak elde edildi. Uygun hacimlerde homojenize edilerek elde edilen solüsyonun, oda ısısında, karanlık ortamda, 35 dakika süre ile, önceden elde edilen preparatlar üzerindeki doku örneklerine damlatılarak uygulanması ile AgNOR boyama yöntemi gerçekleştirildi (12).

**Sonuç:** Cilt epidermisi çok katlı yassı epiteli malpigi tabakasındaki hücre nükleusları içinde yer alan NOR bölgeleri, siyah-kahverengi, diğer tüm alanlarda zemin açık sarı renkte izlendi.

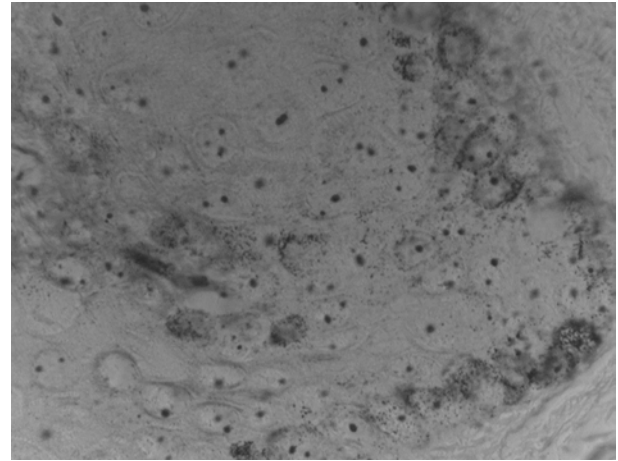
**Sayma işlemi:** Tüm olgularda x100 immersiyon objektifinde, her nükleus için nükleolar membran ve granüler

nükleolar matriksin net seçildiği ayar saptanarak, rastgele 100 hücre Howat'ın önerdiği şekilde sayıldı (12). AgNOR sayımı yapıldıktan sonra, her olgunun ortalama AgNOR skoru ve standart sapması belirlendi. İstatistiksel olarak yaş grupları arasında karşılaştırma yapıldı. Ayrıca cinsiyet ayırımına bağlı anlamlı bir fark olup olmadığı incelendi.

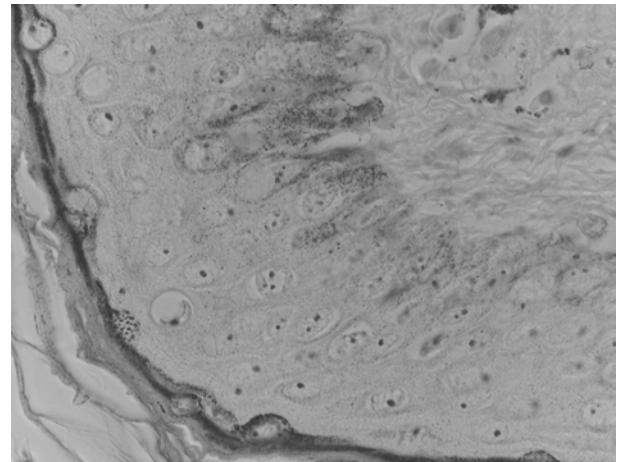
Verilerin istatistiksel karşılaştırmaları "SPSS 5.0 for windows" paket programı kullanılarak tespit edildi. İstatistiksel testler olarak da ki-kare ve Pearson korelasyonu kullanıldı.

## BULGULAR

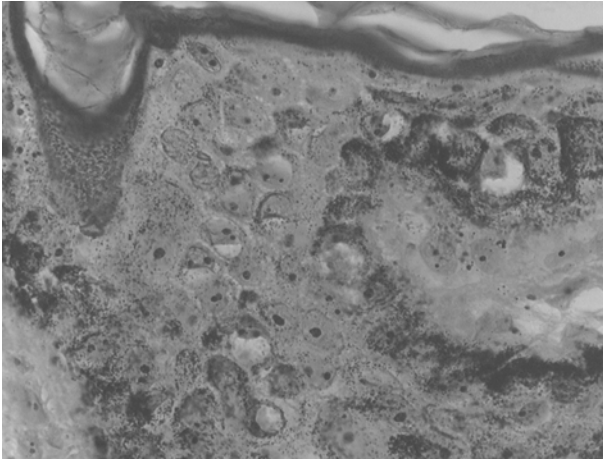
Çalışmaya alınan tüm örnekler farklı yaş gruplarına göre ayrıldı. Tüm olgularda nükleus içindeki NOR benekleri, rastgele 100 hücre Howat'ın önerdiği şekilde sayıldı. Bu sayım sırasında benekçikler şekil ve boyut farklılığı açısından da değerlendirildi. Yaş gruplarına göre tespit edilen ortalama AgNOR dağılım skoru belirlendi ve her yaş grubu için istatistiksel olarak anlamlı kabul edilebilir en düşük ve en yüksek sayısal değerler verildi. Yaş ortalaması arttıkça AgNOR boyama yöntemiyle azalan sayıda NOR benekleri boyanması tespit edildi (Şekil 1, 2, 3, 4).



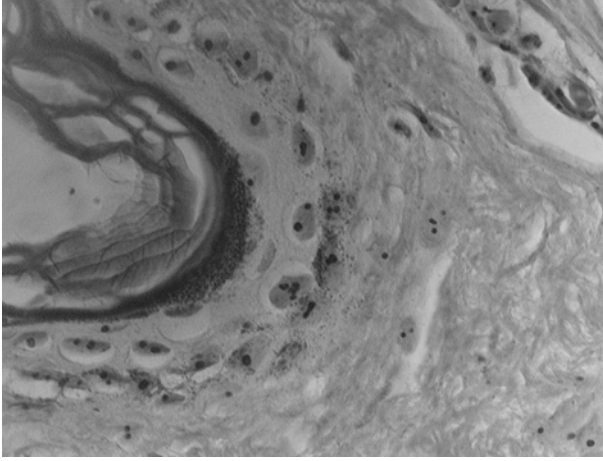
**Şekil 1.** Yenidoğan (0-12 ay) Yaş Grubuna Bağlı NOR Benekleri (sayıca fazla ve iri görünümlü)



**Şekil 2.** İnfant (1-5) Yaş Grubuna Bağlı NOR Benekleri (sayıca fazla ve küçük görünümlü)



**Şekil 3.** Adult (25-35) Yaş Grubuna Bağlı NOR Benekleri (tek tek ve iri görünümlü)



**Şekil 4.** Yaşlı (50 yaş ve üzeri) Yaş Grubuna Bağlı NOR Benekleri (tek tek ve küçük görünümlü)

Yenidoğan (0-12 ay) yaş grubunda NOR benekleri boyaması ortalama 2.15 olarak en yüksek oranda AgNOR dağılımı gösterdi. Bunu infant 1.89, adult 1.67 ve yaşlı yaş grubu 1.46 olmak üzere azalan ortalama değerleri ile izledi (Tablo 1).

**Tablo 1.** Yaş Grubuna Bağlı AgNOR Ortalaması ve Değer Aralığı

Yaş Grubu	AgNOR Ortalaması	Değer Aralığı
Yenidoğan (0-12 ay)	2.15	(2-2.45)
İnfant (1-5 yaş)	1.89	(1.65-1.98)
Adult (25-35 yaş)	1.67	(1.45-1.82)
Yaşlı (50 yaş ve üzeri)	1.46	(1.31-1.64)

Sonuç olarak tüm yaş gruplarında ortalama proliferatif indeks incelendiğinde, en genç yaş grubundan en büyük yaş grubuna doğru azalan oranda AgNOR dağılımları skoru ile yaş grupları arasında anlamlı bir ilişki vardı ( $p<0.01$ ). Bireylerin genç yaşlarda gelişme süreci içinde, hücrelerin hızlı proliferasyonu nedeni ile hücre bölünmesine katkıda bulunan NOR bölgelerinin arttığı, yaşlı popülasyonda ise hücre bölünme sayısı ve yeteneğinin azalması ile NOR bölgelerinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum yaş tespitinin histolojik tanısında, önemli bir belirleyici olarak değerlendirildi.

Böylece AgNOR yöntemiyle postmortem insan epidermisinde yaşla doğru orantılı değişiklikler açıkça gösterildi. Ki-kare testi uygulandığında her grup içinde ve genel ortalamaya bakıldığında cinsiyet ayırımına bağlı anlamlı bir fark saptanmadı.

## TARTIŞMA

Geçmişten günümüze kadar yapılan çeşitli çalışmalar ve morfolojik araştırmalar yaş tespitinde en doğru yaklaşımı bulmak için yapılmaktadır (13, 14). Epifiz, kemikleşme merkezleri ve kraniyal süturların kapanması, simfiz pubisteki değişiklikler, kostaların kalsifikasyon gösteren sternal birleşme noktaları ve çeşitli biyokimyasal çalışmalar yaş tespitinde tanımlayıcı tetkikler olarak uygulanmaktadır (13-19). Bu çalışmada AgNOR yöntemi, kronolojik yaş tespitinde istisnai bir araştırma olarak yapılmıştır. Özellikle adli amaçlı yapılan çalışmalarda bu yöntem bireylerin yaş tespitinde alternatif bir metot olarak sunulmuştur. Böylece, rutinde kullanılan diğer metotlarda yaşanan bazı güçlükler ve net olmayan veriler bu yöntem ile aşılmaya çalışılmıştır. Farklı yaş gruplarına ait 38 insan cildinden alınan örnekler AgNOR boyama yöntemi kullanılarak değerlendirilmiş ve sonuçları bu çalışmada sunulmuştur.

Tüm yaş grupları değerlendirildiğinde yeni doğan (0-12 ay) yaş grubunun sayısal AgNOR dağılım skoru % 10.5 olarak tespit edildi. Bu değer, diğer yaş grupları ile kıyaslandığında anlamlı değerlendirilebilecek ölçüde yüksekti. Ki-Kare ve Korelasyon değerleri istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.01$ ). Böylelikle, yaşa bağlı değişikliklerin AgNOR boyama yöntemi ile tespit edilebileceği görüldü. Bu çalışma ile, adli uygulamalarda karşılaşılan yaş tespiti vakalarında histokimyasal tanı yöntemi olarak AgNOR'un önemli bir alternatif yöntem olarak kullanılabilirliği gösterildi.

Butler ve arkadaşları (5), yaş ve cinsiyet arasında farklılık ve yaş ile AgNOR arasında negatif korelasyon olup olmadığını bulmak için AgNOR'u kromozomlarda kullanmışlar; ancak bulunan bu korelasyon istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmemiştir. Yaptığımız bu çalışmada ise, yaş ve AgNOR arasında anlamlı bir istatistiksel karşılaştırma elde edilmiştir. Das, lenfositlerle yaptığı çalışmada özellikle yenidoğan kord kanından elde ettiği lenfositlerin AgNOR boyaması neticesinde tespit edilen NOR beneklerinin 9.49 oranı ile diğer yaş gruplarına göre en yüksek sayısal ortalamayı verdiğini göstermiştir (6). Bizim çalışmamızda da bu çalışmada elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak benzer şekilde en genç yaş grubunu oluşturan yenidoğan (0-12 ay) grubundan, en büyük yaş grubunu oluşturan yaşlı (50 yaş ve üzeri) grubuna doğru azalan oranda AgNOR dağılımı sayısal ortalaması tespit edilmiştir.

AgNOR boyama yöntemi kullanılarak yapılan birçok çalışmada kan ve kan ürünleri kullanılmıştır (3-6). Bizim çalışmamızda kan örneği elde edilemeyen, hatta bireyin kendisinin de olmadığı durumlarda elde edilen veya delil olarak ele geçen deri gibi küçük doku parçalarına dahi yöntemin uygulanarak, yaş grubu hakkında yorum yapılabilmesi pratik uygulama için önemli bir avantaj ve gelişme olarak değerlendirilmiştir.

## SONUÇ

Bilindiği gibi adli uygulamalarda postmortem olguların ve özellikle kimlik tespiti yapılamayan bireylerin yaşlarının tespiti, araştırmalarla sınanmış ve etkinliği gösterilmiş

yöntemlerin rutin kullanıma giremeyişi nedeniyle hala sorun olarak devam etmektedir. Kimlik tespiti yapılamayan postmortem olguların karın cildi örneklerinden AgNOR boyama yöntemi ile yaş tespiti kullanışlı bir metottur. Bu metot yaşayan olguların cilt biyopsilerine de kolaylıkla uygulanabilmektedir. Karın cildinin çok esnek olması sebebiyle, bu bölgeden alınan örnekler probleme sebep olmamaktadır. Oldukça güvenilir sonuçlar elde edilen bu metotun rutinde kullanılan diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında gerekli ve yeterli ölçüde uygun ve kabul edilebilir bir yöntem olduğuna dair veriler elde edilmiştir.

## KAYNAKLAR

1. Aykaç M. Adli Tıp Ders Kitabı. İstanbul Üniversitesi Tıp Fak. Yayınlarından, Rektörlük no.3483, Fakülte no.170 İstanbul. 1987: 268-270.
2. Walker RA. The histopathological evaluation of nucleolar organizer region proteins. *Histopathology* 1988; 12: 221-223.
3. Fakan S, Verdun DH. The nucleolus and the nucleolar organizer regions. *Biol Cell* 1986; 56: 189-206.
4. Egan MJ, Raafat F, Crocker J, Smith K. Nucleolar organizer regions in small cell tumours of childhood. *J Pathol* 1987; 187: 275-280.
5. Butler MG, Lane JR. Effects of age, sex, and multiple endocrine neoplasia type-II on silver stained nucleolar organizer region. *Mech Ageing Dev* 1989; 47: 17-24.
6. Das BC, Rani R, Mitra AB, Luthra US. The number of silver staining NORs (rDNA) in lymphocytes of newborns and its relationship to human development. *Mech Ageing Dev* 1986; 36: 117-123.
7. Courvalin JC. A protein of Mr. 80000 is associated with the nucleolar organizer of human cell lines. *Chromosoma* 1986; 94: 353-361.
8. Hirai H. Paragonimus ohirai: Identification of nucleolar organizer regions (NORs) and silver nitrate staining pattern in spermatogenesis. *Exp Parasitol* 1988; 67: 281-286.
9. Hansen AB, Ostegard B. Nucleolar organiser regions in hyperplastic and neoplastic prostatic tissue. *Virch Arch A Pathol Anat* 1990; 417: 9-13
10. Stout SD. The use of histomorphology to estimate age. *J Forensic Sci* 1998; 33: 121-125.
11. Kirkeby S, Garbarsch C. Histochemical studies of the masseter, the temporal and small zygomaticomandibular, and the temporomandibular masticatory muscles from aged male and female humans. *Fiber types and myosin isoforms. Cranio* 2001; 19: 174-182.
12. Crocker J, Boldy DA, Egan MJ. How should we count AgNORS ? Proposals for a standardised approach. *J Pathol* 1989; 158: 185-188.
13. Oettle AC, Steyn M. Age estimation from sternal ends of ribs by phase analysis in South African blacks. *J Forensic Sci* 2000; 45:1071-1079.
14. Martin-de las Heras SM, Valenzuela A, Overall CM. Gelatinize A in human dentin as a new biochemical marker for age estimation. *J Forensic Sci* 2000; 45: 807-811.
15. Yoder C, Ubelaker DH, Powell JF. Examination of variation in sternal rib end morphology relevant to age assessment. *J Forensic Sci* 2001; 46: 223-227.
16. Sato Y, Kondo T, Ohshima T. Estimation of age of human cadavers by immunohistochemical assessment of advanced glycation end products in the hippocampus. *Histopathology* 2001; 38: 217-220.
17. Galera V, Ubelaker DH, Hayek LAC. Comparison of macroscopic cranial methods of age estimation applied to skeletons from the Terry collection. *J Forensic Sci* 1998; 43: 933-939.
18. Barchilon V, Hershkovitz I, Rothschild BM et al. Factors affecting the rate and pattern of the first costal cartilage ossification. *Am J Foren Med Path* 1996; 17: 239-247.
19. Ohtani S, Yamada Y, Yamamoto I. Improvement of age estimation using amino acid racemization in a case of pink teeth. *Am J Foren Med Path* 1998; 19: 77-79.

*Kabul Tarihi:18.08.2004*