



**ÇEVRESEL ASBESTE MARUZ KALMIŞ KİŞİLERDE
MİKRONÜKLEUS SIKLIĞININ
ARAŞTIRILMASI**

Meltem GÖVERCİN

**Temmuz, 2011
DENİZLİ**

**ÇEVRESEL ASBESTE MARUZ KALMIŞ KİŞİLERDE MİKRONÜKLEUS
SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**Pamukkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

Meltem GÖVERCİN

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ayşe Gaye TOMATIR

**Temmuz, 2011
DENİZLİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Meltem GÖVERCİN tarafından, Yrd. Doç. Dr. A. Gaye TOMATIR yönetiminde hazırlanan "Çevresel Asbeste Maruz kalmış Kisilerde Mikronükleus Sıklığının Araştırılması" başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Munis WINDAR
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Gülseren BAĞCI
Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. A. Gaye TOMATIR
Jüri Üyesi(Danışman)

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 4.18.11 tarih ve 11/11-5 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Doç. Dr. A. Cevik TUFAN
Müdür

TEŞEKKÜR

Bu tezin her aşamasında bilgi birikimi ve deneyimleriyle bana yol gösteren değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayşe Gaye TOMATIR'a, yine tez çalışmam sırasında, gönüllü sağlayarak klinik deneyimlerini ve yardımlarını esirgemeyen Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Fatma EVYAPAN ve öğretim elemanı Arş. Gör. Dr. Güven COŞKUN'a; bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve güler yüzlerini esirgemeyen Erciyes Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri; Sayın Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ, Yrd. Doç. Dr. Zuhale HAMURCU ve Arş. Gör. Nazmiye BİTGEN'e; Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Beyza AKDAĞ'a; yüksek lisans eğitimim boyunca bana emeği geçen değerli hocalarıma; tez çalışmama katılan gönüllülere, kan alma ekibi çalışanlarına ve beni destekleyen tüm arkadaşlarıma gönülden teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca karşılıksız sevgi ve destekleriyle daima yanımda olan canım annem, babam ve ablama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Saygılarımla

Temmuz, 2011

Meltem GÖVERCİN

Bu tez, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenen, 2009-SBE-005 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Bu tezin yapılmasına Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Etik Kurulu tarafından onay verilmiştir (27.05.2009/122).

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulguların analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza:



Öğrenci adı- soyadı: Meltem GÖVERCİN

ÖZET

ÇEVRESEL ASBESTE MARUZ KALMIŞ KİŞİLERDE MİKRONÜKLEUS SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI

GÖVERCİN, Meltem

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Yrd. Doç. Dr. Ayşe Gaye TOMATIR

Temmuz 2011, 59 Sayfa

Türkiye, zengin asbest yataklarıyla ilişkili endemik pulmoner hastalıklar açısından yüksek prevalansa sahiptir. Bu çalışmadaki amacımız; Denizli ili Bekilli ve Süller civarında yaşayan, çevresel asbeste bağlı plevral hastalık tanısı alan kişilerde mikronükleus (MN) sıklığını belirleyerek genotoksik hasarı değerlendirmektir.

Araştırmada, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı tarafından asbest maruziyetine bağlı kalsifik plevral plak tanısı (KPP) konmuş, sigara ve alkol kullanmayan, 59-86 yaşları arasında 16 kadın 14 erkek gönüllü toplam 30 kişinin periferik kanları alındı. Denizli merkezinde yaşayan, yaş, cinsiyet dağılımı ve sosyo-ekonomik bakımdan benzer, sigara ve alkol kullanmayan, 16 kadın 14 erkek gönüllü toplam 30 kişi de kontrol grubu olarak seçildi. Gönüllülerden alınan periferik kan örnekleri, fitohemaglutinin içeren medyumlara ekildi, kültüre 44. saatte Sitokalazin-B (Cyt-B) eklendi ve 72 saatlik kültür işlemlerinden sonra hazırlanan preparatlarda 1, 2 veya daha çok nükleuslu hücreler ışık mikroskopunda incelendi ve kaydedildi; sayılan 1000 binükleer hücrede mikronükleuslu hücreler ve mikronükleuslar sayıldı. MN değerlerinin yanı sıra, nükleer bölünme indeksi (NDI), mitotik indeks (MI) ve metafaz (M) sayıları da belirlendi. Sonuçlar, iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi ve Mann-Whitney U testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

Asbeste maruz kalan kadın ve erkekler kendi aralarında karşılaştırıldığında; yaş ortalaması, MN değeri, NDI, MI ve metafaz sayısı bakımından bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Aynı şekilde kontrol grubundaki kadın ve erkekler de kendi arasında karşılaştırıldığında bir fark saptanmadı ($p>0,05$). Ancak asbeste maruz kalan gönüllülerle ve kontrol grubu karşılaştırıldığında; MN, NDI, MI, Metafaz sayısı bakımından anlamlı fark bulundu ($p=0,001$).

Sonuç olarak; bu çalışmada asbeste bağlı plevral hastalık tanısı alan grupta, MN sayısındaki artış ve diğer bulgular, asbestin genotoksik etkisini desteklemektedir. Bu bölgede, mezotelyoma riski taşıyanların belirlenmesi ve izlenmesi, halkın asbestin neden olduğu hastalıklar konusunda eğitilmesi yararlı olur.

Anahtar Kelimeler: Asbest, Kalsifik Plevral Plak (KPP), Lenfosit, Mikronükleus, Denizli-Bekilli, Süller.

ABSTRACT**THE INVESTIGATION OF MICRONUCLEUS FREQUENCY OF THOSE WHO HAVE BEEN EXPOSED TO ENVIRONMENTAL ASBESTOS**

GÖVERCİN, Meltem

Master Dissertation, Department of Medical Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Ayşe Gaye TOMATIR

July 2011, 59 pages

Turkey has high prevalence of endemic pulmonary diseases related to rich asbestos sources. Our aim in this study is to identify the micronucleus (MN) frequency and to analyze the genotoxic damage in the subjects who live in Bekilli and Süller districts and have been exposed to environmental asbestos.

In this research, the peripheral blood of 30 volunteers consisting of 16 females and 14 males aged between 59-86 who never smoke and use alcohol, and diagnosed by the Department of Chest Diseases with pleural plaque with the inhalation of asbestos was drawn. A total of 30 volunteer subjects living in Denizli, aged 37-84, consisting of 16 females and 14 males, similar in their age, sex distribution and socio-economic situation and never smoke and use alcohol were chosen as control group. The samples of the peripheral blood were cultured in mediums involving phytohemagglutinin; Cytochalasin-B (Cyt-B) was cultured in 44th hour and after the 72-hour-culturation, one, two or more multi-nucleated cells on the preparations were analyzed on light microscope and recorded; micronucleus on 1000 bi-nuclear cells were counted. Besides MN values, NDI, MI and M numbers were also identified. Results were evaluated statistically via Significance test for difference between two means and Mann-Whitney U Test.

When the men and women who were exposed to asbestos were compared within themselves, there was found no difference in terms of age mean, MN values, NDI, MI and metaphase number ($p>0,05$). Likewise, when the men and women in the control group were compared within themselves, no difference was identified ($p>0,05$). On the other hand, when the volunteers that were exposed to asbestos and the control group were compared, significant difference was found in terms of MN, NDI values ($p=0,001$).

In conclusion, in this study, the increase in the number of MN and the other findings indicate the genotoxic effect of asbestos for the group diagnosed with pleural disease related to asbestos. It is beneficial to identify and watch those who have the risk of mesotelioma and also to educate people about the diseases caused by asbestos in the region.

Key Words: Asbestos, Calcific Pleural Plaque (CPP), Lymphocyte, Micronucleus, Denizli-Bekilli, Süller.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Teşekkür.....	i
Proje Desteği ve Etik İzin.....	ii
Bilimsel Etik Sayfası.....	iii
Özet.....	iv
Abstract.....	v
İçindekiler	vi
Şekiller Dizini.....	viii
Tablolar Dizini.....	ix
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	x
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMALARI.....	4
2.1. Asbest.....	4
2.1.1. Asbestin Özellikleri ve Sınıflandırılması.....	4
2.1.2. Asbestin Kullanım Alanları.....	6
2.1.3. Asbest Rezervleri ve Sebep Olduğu Hastalıklar.....	6
2.2. Kalsifik Plevral Plak.....	11
2.3.Mikronükleus (MN) Oluşumu	14
2.3.1. İnsan Lenfositlerindeki MN Sıklığının Diğer Faktörlerle İlişkisi.....	16
2.3.1.1. MN Sıklığı ve Yaş ve Cinsiyet Arasındaki İlişki.....	16
2.3.1.2. MN Sıklığı ile Sigara, Alkol ve Yasa Dışı İlaç Kullanımı Arasındaki İlişki.....	16
2.3.1.3. MN Sıklığı ile Fiziksel Ekzersiz ve Yaşam Koşulları Arasındaki İlişki.....	17
2.3.1.4. MN sıklığı ve Beslenme Arasındaki İlişki.....	17
2.3.1.5. MN sıklığı ve X-ışınları arasındaki ilişki.....	18
2.3.1.6. MN Sıklığı ve Asbest Arasındaki İlişki.....	18
2.3.1.7. MN Sıklığı ve Kanser Arasındaki İlişki.....	19
2.4. Sitokinez-Blok Yöntemi.....	19
3. MATERYAL ve METOT.....	25
3.1. Materyaller.....	25
3.1.1. Demirbaş Malzemeler.....	25
3.1.2. Sarf Malzemeler.....	25
3.2. Metot.....	27
3.2.1. Mikronükleus Elde Etme Yöntemi.....	27
3.2.1.1. Kültür Ortamının (Besiyeri) Hazırlanması.....	28
3.2.1.2. Kan Örneklerinin Alınması.....	28
3.2.1.3. Kültür Tekniği.....	28
3.2.1.4. Çıkarım İşlemleri.....	29
3.2.1.5. Preparat Hazırlama.....	29
3.2.1.6. Preparatların Boyanması ve Saklanması.....	30
3.2.1.7. Sitokinezi Bloke Edilmiş Binükleer Hücreleri Tanımlama	

Kriterleri.....	30
3.2.1.8. Mikronükleus Sayımı.....	31
3.3. Işık Mikroskobunda Değerlendirme.....	32
4. BULGULAR.....	35
5. TARTIŞMA.....	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	46
7. KAYNAKLAR.....	48
8. ÖZGEÇMİŞ.....	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.1.1. Tremolit asbest minerali.....	4
Şekil 2.1.1.2. Asbest liflerinin sınıflandırılması.....	5
Şekil 2.1.3.1. Bekilli - Süller ve yakın çevresinin jeoloji haritası ve asbest oluşum alanları	8
Şekil 2.3.1. Geri kalan asentrik kromozom fragmanlarından kaynaklanan MN oluşumu.....	15
Şekil 2.3.2. Tüm Kromozom kaybından kaynaklanan MN oluşumu.....	15
Şekil 2.4.1. Sitotoksik / Genotoksik ajanlara maruz kalmış sitokinez-blok kültür hücrelerindeki çeşitli oluşumların nedenlerinin gösterilmesi.....	21
Şekil 2.4.2. Disentrik kromozomlardan kaynaklanan NPB oluşumu.....	21
Şekil 2.4.3. Sitokalazin-B kullanılarak iki çekirdekli (binükleer) hücre oluşumu...	22
Şekil 2.4.4. MN ve NPB oluşumunun sentromerik ve telomerik problemlerle gösterilmesi.....	23
Şekil 3.3.1. Mononükleer hücre oluşumları.....	33
Şekil 3.3.2. Binükleer hücre ve 3'lü MN oluşumu.....	33
Şekil 3.3.3. Trinükleer hücre oluşumu.....	33
Şekil 3.3.4. Tetranükleer hücre oluşumu.....	34
Şekil 3.3.5. Binükleer hücredeki NBud oluşumu.....	34
Şekil 3.3.6. Binükleer hücredeki NPB oluşumu.....	34

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.2.1. KPP ile ilgili çalışmaların karşılaştırılması.....	13
Tablo 4.1. Gönüllülerin demografik özellikleri.....	36
Tablo 4.2. Asbeste maruz kalan kişilerin lenfositlerindeki total binükleer hücre sayıları, MN'lu binükleer hücrelerin sayısı, toplam MN, MN frekans % ortalama sayısı.....	37
Tablo 4.3. Asbeste maruz kalan hastaların lenfositlerindeki 500 mononükleer hücre sayısındaki, binükleer, trinükleer, tetranükleer, Nbud, NPB, NDI ve metafaz sayısı.....	38
Tablo 4.4. Kontrol grubundaki kişilerin lenfositlerindeki toplam binükleer hücre sayıları, MN'lu binükleer hücrelerin sayısı, toplam MN, MN frekans % ortalama sayısı.....	39
Tablo 4.5. Kontrol grubundaki kişilerin lenfositlerindeki 500 mononükleer hücre sayısındaki, binükleer (BN), trinükleer (TRN), tetranükleer (TN), Nbud, NPB, nükleer bölünme indeksi (NDI) ve metafaz sayısı (M).....	40
Tablo 4.6. Asbeste maruz kalan grup ile kontrol grubundaki kişilerin MN değerleri.....	41
Tablo 4.7. Asbeste maruz kalan kişilerle kontrol grubundaki kişilerin cinsiyete göre NDI değerleri.....	41
Tablo 4.8. Asbeste maruz kalan kişilerle kontrol grubundaki kişilerin cinsiyete göre MI değerleri.....	42
Tablo 4.9. Asbeste maruz kalan kişilerin yaş ortalamaları.....	42
Tablo 4.10. Kontrol grubundaki kişilerin yaş ortalamaları.....	42

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

- Al:** Alüminyum
BN: Binükleer Hücre
Ca: Kalsiyum
CHL: Klorofil (Chlorophile)
CBMN: Sitokinez Bloklü Mikronükleus
CREST: Anti-kinetektor Serum
Cyt-B: Sitokalazin B (Cytochalacin B)
DMSO: Dimetil-sülfoksit
DPK: Diffüz Plevral Kalınlaşma
Fe: Demir
FISH: *Floresan In Situ Hibridizasyon*
IARC: *International Agency Research on Cancer*
ISH: *In Situ Hibridizasyon*
KKD: Kardeş Kromatid Değişimi
KPP: Kalsifiye Plevral Plak
M: Molar
METH: Metamfetamin
Mg: Magnezyum
MI: Mitotik İndeks
MN: Mikronükleus
MNBN: Mikronükleuslu Binükleer Hücre
MPM: Malign Plevral Mezotelyoma
NBud: Nükleer Bud
NDI: Nükleer Bölünme İndeksi (Nucleer Division Index)
Ni: Nikel
PKH: Periferak Kan Hücreleri
NPB: Nükleer Plazmik Köprü (Nucleer Plasmic Bridge)
PHA: Fitohemaglutinin (Phytohemagglutinin)
PK: Plevral Kalınlaşma
SHE: *Syrian Hamster Embryo*
SPSS: *Statistical Package for Social Sciences*

UV: Ultraviole

VA: Valin

YRBT: Yüksek Rezolüsyonlu Bilgisayarlı Tomogrofide

TRN: Trinükleer Hücre

TH: Tetranükleer Hücre

1. GİRİŞ

Asbest; doğada yaygın olarak bulunan lif şeklindeki kristalize silikat minerallerinin genel adıdır (Temur S 1994). Yüksek ısı, sürtünme gibi fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı oldukça dayanıklı, ucuz, kolay elde edilebilen ve işlenebilen bir mineral olması nedeniyle pek çok ülkede ve Türkiye’de endüstriyel kullanım alanı da geniştir (Barış Yİ 1987, Kılıçaslan Z 2002).

Doğadaki asbest minerali; serpantin ve amfibol grubu olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. Serpantin, demet şeklinde kıvrımlı liflere sahipken, amfibol türü düz lifli yapıdadır. En yaygın kullanılan asbest türü serpantin grubunda yer alan krizotildir (beyaz asbest). Bu gruptaki diğer mineraller ise lizardit ve antigorit. Amfibol türünde ise; krokidolit (mavi asbest), amozit (kahverengi asbest), antofilit, tremolit, aktinolit olmak üzere 5 farklı tür asbest bulunmaktadır (<http://ekutup.dpt.gov.tr/madencil/sanayiha/oik629.pdf>, Atabey E 2009).

Denizli – Bekilli ve Süller çevresinde de amfibol asbest oluşumları görülmektedir (Atabey E, 2009). Bekilli, Denizli ilinin kuzeyinde ve Denizli’ye 86 km. Uşak iline ise 83 km. uzaklıktadır. İlçenin kuzeyinde Karahallı ilçesi, güneyinde Çal İlçesi, batısında Ulubey İlçesi ve doğusunda da Çivril İlçesi bulunmaktadır. Yaklaşık 11.000 nüfusa sahiptir (http://www.bekilli.bel.tr/bekilli.asp?id=1&alt_id=5). Süller, Denizli ili merkezine 80 km uzaklıktadır. Kuzeyinde Bükrüce köyü ile Bekilli ilçesi, doğusunda Kavaklar ve Beyelli, güneyinde Kocaköy ve Çal ilçesi, batısında ise Akkent ve Hançalar kasabaları arasında yer almaktadır. Yerleşim alanının yeri; kuzeyinde bulunun Sarıkaya’nın eteklerinde kurulmuştur. Yaklaşık 4.000 nüfusa sahiptir (<http://www.suller.bel.tr/index.php?cid=68>).

Bekilli civarındaki amfibol asbest oluşumları klorit-tremolit-aktinolit-serisit şistler içinde, mavimsi, beyaz, yeşilimsi renklere, 5-10 cm lif uzunluğunda tremolit ve aktinolit cinsindedir. Bekilli ilçesi Poyrazlı, Üçkuyu, İkizbaba, Gömce ile Süller yerleşimlerinde tremolit, aktinolit oluşumları mevcuttur (Atabey E 2009).

Çevresel ya da endüstriyel (mesleksi) yolla asbeste maruz kalan kişilerde, normal popülasyona göre oldukça yüksek oranda akciğer ve plevra malignitelerinin

yanısıra (Barış Yİ 1987, Barış Yİ vd 1998) genotoksik hasarlarda oluşmaktadır (Dusinska M vd 2004). Krokidolit, amozit ve tremolit en zararlı asbest türleridir. Asbestin tüm lifleri akciğer kanserine neden olabilmektedir (Demiroğlu H 1998). Uluslararası Kansere Araştırmaları Ajansı (IARC) kanserojen maddeler listesinde asbesti, "*kesin kanserojen*" tanımlanması ile 1. grupta sınıflandırılmıştır. Asbest lifleri değişik büyüklüklerde olabilirler (<http://ekutup.dpt.gov.tr/madencil/sanayiha/oik629.pdf>, Robledo R vd 1999). Liflerin çapı ve uzunluğu, maruziyetin dozu ve süresi asbestin patojenitesini etkiler (Şenyiğit A vd 2000). Çapı 0.25 mikron'dan daha az ve boyu 8 mikron'dan daha uzun olan ince uzun lifler tümör oluşumunda daha etkindir. Liflerin kısa ve kalın olanları daha az kansorejendir.

Endüstride kullanılan asbestin %90'ını oluşturan krizotil (beyaz asbest) akciğerde hacim kaybederek erimesi ve parçalanması nedeniyle en az zararlı asbest türüdür (Barış Yİ 1987, Niklinski J vd 2004, Tuğ T ve Tuğ E 2005, Demiroğlu H 1998, Robledo R vd 1999, Şenyiğit A vd 2000, Barış Yİ vd 1995). Asbestin amfibol tipi sahip olduğu geometrik özelliğinden dolayı subplevral boşluğa kadar ulaşarak devamlı karsinojen olarak rol oynamaktadır (Yüksel M ve Kalaycı N. G 2001). Asbestin amfibol lifleri, özellikle krokidolit asbest malign mezotelyomaya yol açarken, krizotil lifleri akciğer kanseri gelişiminde rol oynamaktadır (Yüksel M ve Kalaycı N. G 2001, Şenyiğit A vd 2004).

Asbestli topraktan havaya yayılan asbest liflerinin solunması sonucu kişilerde öldürücü Malign Plevral Mezotelyoma (MPM) gelişme sıklığı normal popülasyona göre 20 kat ve/veya daha fazla artmaktadır (Light RW 1995). Türkiye'de yılda en az 500 kişide bu hastalık görülmektedir (www.mesothelioma-tr.org/ulusal/asbest2.html). MPM insidansı, Türkiye'nin güneydoğusunda yaşayan bireylerde 43/1milyon'dur (Emri S ve Demir AU 2004). Türkiye'de Orta Anadolu kırsalında yaşayan yirmi yaşın üstündeki kişilerde ise yaklaşık % 25 asbeste bağlı benign plevral hastalıklar bulunmaktadır. Bu oran yaş ilerledikçe lineer olarak artmakta ve % 80' lere ulaşabilmektedir. (www.mesothelioma-tr.org/ulusal/asbest2.html).

Dünyada geniş asbest yatağına sahip olan pek çok ülke arasında Türkiye asbestle ilişkili endemik pulmoner hastalıklar açısından en yüksek prevalansa sahiptir (Karakoca Y vd 1997). Asbest maruziyetine bağlı gelişen plevro-pulmoner hastalıklar; Diffüz Plevral Plaklar, Benign Asbest Plörezi, Malign Plevral Mezotelyoma, Akciğer Karsinomu, Asbestozis'dir (Akkurt İ 2006, Kılıçaslan Z 2002). Türkiye'de Konya, Diyarbakır, Sivas, Burdur, Çankırı, Yozgat, Eskişehir, Ankara ve Denizli'nin kırsal

yörelere çevresel kökenli asbestle ilgili hastalıkların bulunduğu gösterilmiştir (Şenyigit A vd 2004, Şenyigit A vd 2000, Barış Yİ vd 1998). Denizli Bekilli-Süller civarı, asbest oluşumu bakımından incelenmiş ve zararlı asbest liflerine bağlı plevra-pulmoner hastalıklar belirlenmiştir (Evyapan B. F vd 2008, Özpınar Y ve Eğri M 2009).

Asbest maruziyetine bağlı insanda oluşan genotoksik etkiler bilinmektedir (Dusinska M vd 2004). Dönmez-Altuntaş H vd (2007)'nin yaptığı bir çalışmada mikronükleus (MN) sıklığında bir fark gözlenmezken; Lu J vd (1994) kontrol grubuna göre mikronükleus (MN) sıklığında artış olduğunu bildirmişlerdir. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Mikronükleuslar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom parçalarından köken alan oluşumlardır. Lenfosit kültürlerinde MN belirleme tekniği, 1982 yılında ilk defa Stich HF vd (1982) tarafından uygulanmıştır. Bu teknik, dokularda meydana gelen morfoloji bozukluğunu, kromozom kırıklarını, premalign değişiklikleri ve karsinojenlere maruz kalmış bireylerde artmış kanser riskini göstermek amacıyla biyomarkır olarak kullanılabilir (Demirel S ve Zamani AG 2002).

Çevresel asbest maruziyetine bağlı plevral hastalık oluşumunda genotoksik etkiyi inceleyen sınırlı sayıda çalışmalara rastlanmaktadır (Tuğ T ve Tuğ E 2005, Dönmez-Altuntaş H 2007). Denizli ili sınırları dâhilinde ve yakın dolayında (Bekilli, Çal, Süller, Tavas) asbeste bağlı mesotelyoma, akciğer kanseri ve asbestosis ile ilgili vakalar bildirilmiştir (Evyapan B. F vd 2008, Özpınar Y ve Eğri M 2009, Çelik R 1967). Denizli coğrafyasında asbest oluşumlarının varlığı ve asbeste bağlı hastalıklar bilinmesine rağmen, asbest liflerinin genotoksik etkileri bilinmemektedir. Bu çalışmadaki amacımız: Bekilli ve Süller yerleşim alanlarında yaşayan ve Plevral Plak tanısı almış asbeste maruz kalan kişilerin lenfositlerinde, yaygın olarak kullanılan bir mutajenite testi olan Sitokinez-Blok Mikronükleus (CBMN) testini kullanarak lenfositlerdeki genotoksik etkiyi incelemektir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMALARI

2.1. Asbest

2.1.1. Asbestin Özellikleri ve Sınıflandırılması

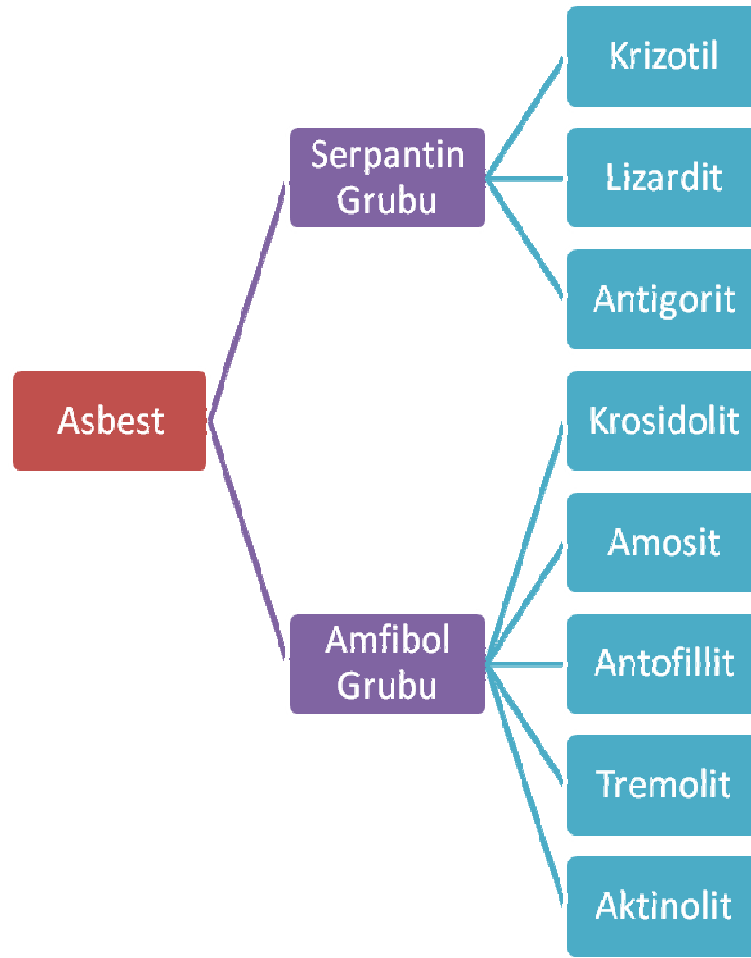


Şekil 2.1.1.1. Tremolit asbest minerali
(<http://ershov-geomuz.narod.ru/sistemat.htm>)

Asbest, Yunanca'da yanmaz anlamında olan 'asbestinon' kelimesinden köken almaktadır ve lifli yapıda silikat minerali olarak doğada bulunmaktadır. Bu hammadde piyasada amyant olarak adlandırılırken; halk arasında Ak, Gök, Höllük, Çelpek, Ceren ya da Geren Toprağı olarak bilinir. Ucuz, kolay elde edilebilen ve işlenebilen bir mineraldir. Yüksek ısı, sürtünme, asit, alkali gibi fiziksel ve kimyasal etkenlere karşı oldukça dayanıklı olması nedeniyle

endüstriyel kullanım alanı geniş olup; dünyada 3000'i aşan üründe kullanıldığı bilinmektedir (Barış Yİ 1987, Balcı K 1993, Kılıçaslan Z 2002).

Asbest tek bir madde olmayıp Ca (kalsiyum), Mg (magnezyum), Al (alüminyum) silikatların bir karışımıdır. Tiplerine göre içlerinde Fe (demir), Ni (nikel) gibi metaller de bulunabilir. Asbest mineralleri, liflerinin eğri-kavisli veya düz oluşlarına göre amfibol ve serpantin olarak iki ana gruba ayrılır (Şekil 2.1.1.2.) (Barış Yİ 1987, Balcı K 1993, Kılıçaslan Z 2002, West JB 1994, Gaines R vd 1997, Hartgerink JD vd 2001).



Şekil 2.1.1.2. Asbest liflerinin sınıflandırılması (Atabey E 2009)

Asbest mineralleri bazik ve ultrabazik kayalarda çeşitli tenörlerde bulunur. Lifler kayaç içinde damarlar, bazen tabakalar halinde, çoğu zaman ise stokverk (ağsal) bir durumda ortaya çıkarlar (Atabey E 2009). Krizotil minerali (beyaz lifli asbest), yüksek gerilme direncine sahip, kısa yapıda ve alkali ortama karşı dirençlidir. Ayrıca yüksek eğilme-bükülme kabiliyeti bulunmaktadır. Krizotil, serpantin asbest türüdür ve beyaz renklidir, ticari yaşamda en sık kullanılan tür olmasına rağmen sıklıkla diğer tehlikeli asbest türleri ile karışım biçiminde bulunması nedeniyle önemi artar. Amfibol asbest türleri ise daha uzun, ince ve düz kristal yapı gösterir ve bunlar daha etkilidir. Tremolit (Şekil 2.1.1.1), krosidolit (mavi), antofolit, amozit (kahverengi) ve aktinolit asbest amfibol türleridir. Krosidolit (mavi) asbest, esneklik özelliğine sahip, lifleri en sağlam olan asbest çeşididir. Ancak alkali ve asit ortamlarında kolaylıkla etkilenebilirler. Gerilme direnci azdır. Buna karşın en yüksek bükülme özelliği gösteren liflere sahiptir (Şenyiğit A vd 2004).

2.1.2. Asbestin Kullanım Alanları

Arkeolojik çalışmalar asbest kullanımının 2500 yıl öncelerine kadar gittiğini göstermektedir. Preshistorik Fin seramiklerinde, lamba fitillerinde, Yunan ve Roma uygarlıkları döneminde üretilen çeşitli dokumalarda asbest lifleri kullanılmıştır. Roma'da hükümdar ölülerinin sarıldıkları örtülerin asbest kumaşından yapıldığına dair kayıtlar bulunmuştur. Marco Polo 1250 yılına ait yazılarında Sibirya'da asbestli dokumalar üretildiğinden söz etmektedir. Yunan ve Mısır tarihinin ilk devirlerinde de asbeste rastlanmış, Çin medeniyetinin ilk çağlarında hasır ve keçelerde asbest kullanılmıştır. 18. yüzyılda kalıcı olmalarını sağlamak için bazı eserler asbestten yapılmış kağıtlara basılmıştır. Ancak asbest yataklarının ticari boyutlarda işletmeye alınması 19. yüzyıla rastlamaktadır. Yirminci yüzyılın başlarından itibaren ise asbest mineralleri endüstride yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (<http://ekutup.dpt.gov.tr/madencil/sanayiha/oik629.pdf>).

Günümüzde asbest, inşaat sektöründe, gemi, uçak, otomobil gibi taşıtların ve uzay araçlarının yapımında, su ve atıkların taşınmasında kullanılan boruların yapımında, ısı ve ses izolasyonunda, tekstil ve yanmaz elbise yapımı gibi pek çok endüstri alanında kullanılmaktadır (Rom WN 1998, Barış Yİ 1987).

Asbest endüstriyel alanın yanı sıra evde ve tarımsal alanda da önemli bir role sahiptir (Müller KM ve Fischer M 2000). Evlerin taş duvarları ve sıvaları (badanalanması) ve dişlerin temizlenmesi asbestli topraklar ile yapılmaktadır. (Fraser RG vd 1990). Kırsal yerleşim alanlarında özellikle eski evlerin damları asbestli topraklar ile kaplanarak, “dam örtüsü” ile geçirimsizlik sağlanmaktadır. Ayrıca talk-asbest oluşumlarının da bebeklere pudra olarak kullanıldığı ifade edilmektedir. Bundan dolayı bu bölgelerde yaşayan kişiler çocukluklarından itibaren asbest solunak durumunda kalmaktadır (Barış Yİ 1987, Özkurt S vd 2003).

2.1.3. Asbest Rezervleri ve Sebep Olduğu Hastalıklar

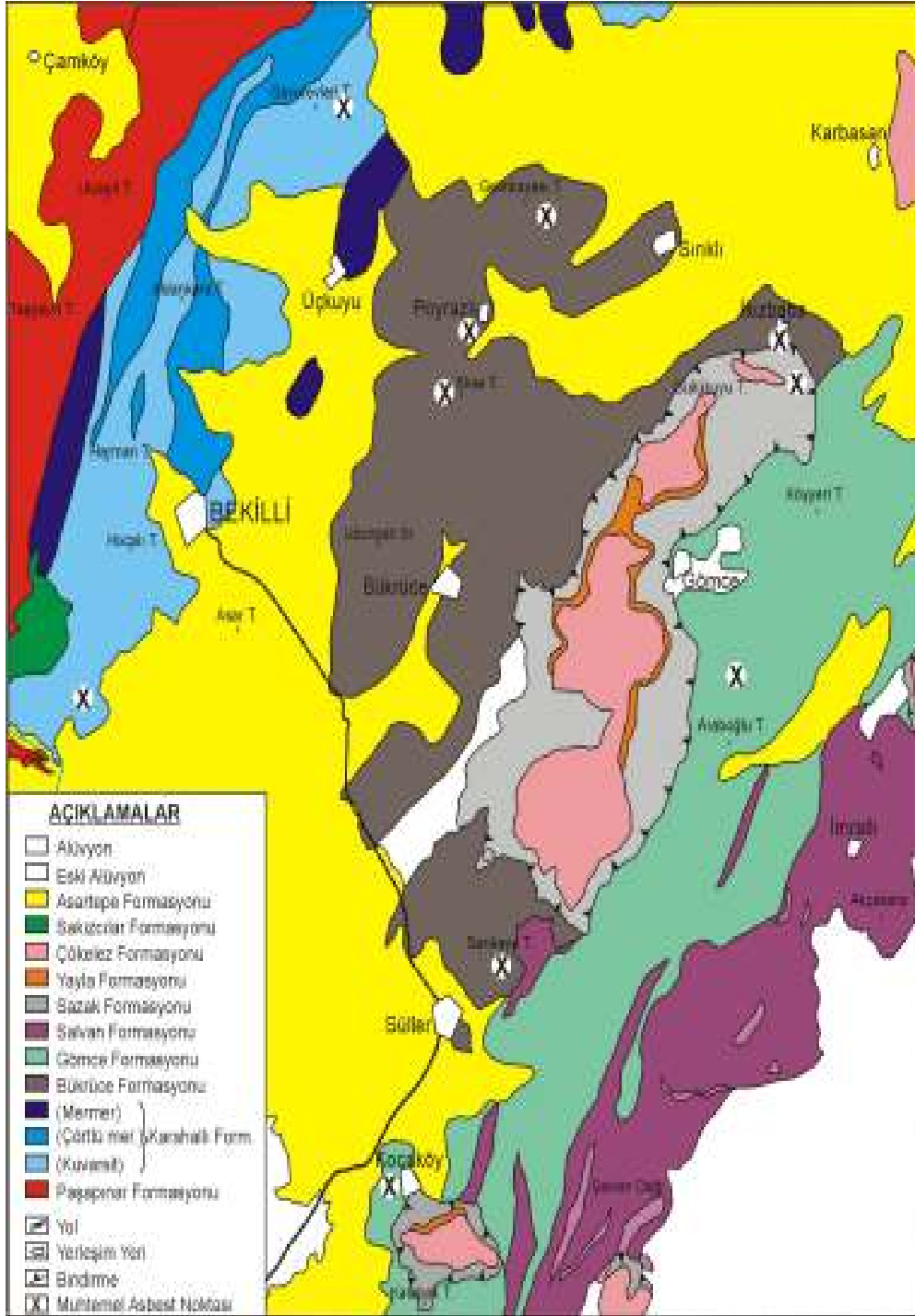
Dünyadaki asbest rezervlerinin %95'i krizotil, %5'i ise amfibol asbesttir. Dünya krizotil asbest rezervleri 200 milyon ton civarındadır. Dünyanın en zengin asbest yatakları

Kanada'dadır. Asbestin bulunduğu diğer ülkeler; Rusya, Kazakistan, Rodezya'daki Shabani, Mashaba, Güney Afrika, Amerika Birleşik Devletleri, İtalya, Fransa, Kıbrıs, Brezilya, Avustralya, İspanya, Japonya, Tayland, Güney Kore, Çin, Endonezya, Yunanistan, Hindistan ve Finlandiya'dır (<http://ekutup.dpt.gov.tr/madencil/sanayiha/oik629.pdf>).

Türkiye, fibrojenik ve karsinojenik iki fibröz mineral olan asbest ve fibröz zeolite (erionite) bakımından oldukça zengindir (<http://www.mesothelioma-tr.org/ulusal/asbest2.html>). Asbest rezervleri büyüklükleri ve kalitesi bakımından sıralandığında; ülkemizin dünyada asbest bakımından en zengin ilk 10 ülke içinde yer aldığını göstermektedir (<http://ekutup.dpt.gov.tr/madencil/sanayiha/oik629.pdf>).

Türkiye'de yaklaşık 113 asbest deposu (yığıntısı) bilinmektedir. Bunların %65'i krizotil, %39'u tremolit ve %1'i krokidolit içermektedir (Barış Yİ 1987). Bu bölgeler arasında; Antakya, Amasya, Sivas, Erzincan, Bursa, Eskişehir, Yozgat, Uşak, Erzincan Tokat, Hatay, Bitlis, İzmir, Çanakkale, Konya, Kayseri, Çorum, Çankırı, Adana ve Diyarbakır'ın kırsal yöreleri çevresel kökenli asbestle ilgili mineral depoları olarak bilinir (Ulus E ve Yılmaz S 1975, <http://ekutup.dpt.gov.tr/madencil/sanayiha/oik629>).

Denizli ili Çal, Bekilli, Süller ve yakın çevresinde çevresel sağlık sorunları meydana getiren mineral oluşumlarına yönelik incelemede; Bekilli, Süller ve Akkent dolaylarında Tremolit, aktinolit sistler yer yer talk-aktinolit sistlerin yaygın olarak bulunduğu belirtilmiştir (Şekil 2.1.3.1.) (bsemiz.pamukkale.edu.tr/Yayinlar%C4%B1m_2007/B.I.a.5.pdf).



Şekil 2.1.3.1. Bekilli - Süller ve yakın çevresinin jeoloji haritası ve asbest oluşum alanları (bsemiz.pamukkale.edu.tr/Yayinlar%C4%B1m_2007/B.I.a.5.pdf).

Dünyada, çevresel yolla asbestin hastalıklara sebep olduğu ülkeler; İsveç ve Finlandiya gibi kuzey ülkeleri, Bulgaristan, Yunanistan, Pakistan, Kıbrıs, Fransa, Rusya, Japonya, Güney Afrika, Çin ve Türkiye'dir (Hillerdal G 2002).

Çevresel ya da mesleki yolla asbeste maruz kalan kişilerde, mineral tozlarının solunması sonucu, organik ve fonksiyonel patolojiler yanında, normal popülasyona göre oldukça yüksek oranda akciğer ve plevra maligniteleri oluşmaktadır (Barış Yİ 1987, Barış Yİ vd 1998). Asbest liflerinin çapı ve uzunluğu, maruziyetin dozu ve süresi, makrofajların fagosite yeteneğini düşürmesi asbestin patojenitesini etkiler (Şenyiğit A vd 2000). Asbeste bağlı hastalıklar tozun solunmasından 10-40 yıl sonra ortaya çıkabilmektedir (Barış Yİ vd 1995, Light RW 1995).

Wagner vd (1960)'nin bir çalışmasında asbestin sağlık üzerine potansiyel olumsuz etkileri ele alınmıştır. Bu çalışmada; asbest ile kontamine olmuş maden ocağında çalışan işçilerde görülen plevral mezotelyoma vakaları çalışılmıştır. Newhouse ve Thompson (1965) ise meslek haricinde bölgesel olarak da artmış mezotelyoma insidansını belirten bir çalışma yapmıştır. Selikoff'un (1968) yayınladığı makaleden sonra asbest üreten ülkelerde asbestin mesleksel ve çevresel potansiyel sağlık sorunlarına yol açtığı konusu tartışılmaya ve bu konu ile ilgili araştırmalar yapılmaya başlanmıştır.

Ülkemizde bu çalışmaları yapanların öncülerinden Barış Yİ (1979) çevresel yolla asbest solunmasına bağlı hastalıkların en yoğun olduğu bölgeleri şu şekilde sıralamaktadır: Eskişehir'in Mihallıççık ilçe ve köyleri, Konya Ereğli'sinin Halkapınar ve Ayrancı köyleri, Çankırı'nın Ilgaz ve Şabanözü köyleri ve Yozgat'ın Sorgun ilçesi ve köyleri, Sivas'ın Yıldızeli ve Şarkışla köyleri, Güney Doğu Anadolu bölgesinde Diyarbakır'ın batısındaki Ergani ve köyleri, Elazığ'ın Maden ve Polu köyleri, Malatya, Adıyaman ve Urfa'nın Siverek ilçesi yer almaktadır. Karadeniz'in sahil bölgeleri ve Doğu Anadolu yerleşim yerlerinde asbestle ilgili hastalık bulunmamaktadır. Trakya'nın birkaç köyünde asbest solunmasına bağlı benîgn plevral değişikliklere rastlanmıştır (www.mesothelioma-tr.org/halk/halkicin.php).

Ege bölgesinde sadece Denizli'nin Tavas ilçesi köylerinde, Burdur'un Yeşilova bölgesi, Kütahya'nın Aslanapa ve Gediz ilçesi, Afyon'un Elmadağ ilçesi köylerinde sporadik asbestle ilgili hastalıklar bulunmuştur. Akdeniz bölgesinde, Toros dağları

yamaçlarındaki köyler ve Hatay'ın Kırıkhan ve Reyhanlı köylerinin bazılarında tremolit asbest içiren toprağın kullanılması ve solunmasıyla asbestle ilgili hastalıklar gelişmektedir (www.mesothelioma-tr.org/ulusal/asbest2.html).

Jamrozik E vd (2011) solunan asbest liflerinin çeşitli hastalıklara sebep olduğunu bildirmişlerdir. Yirminci yüzyılın ilk üç çeyreğinde asbestin kullanımının çok yaygınlaşması, bu minerale maruz kalan kişilerin sayısında dramatik artışa yol açmış ve plevro-pulmoner hastalık insidansını artırmıştır. İnhalasyonla alınan asbest liflerinin çoğu mukosilyer klirensle akciğerlerden atılsa bile, bazıları interstisyuma makrofajların içine girer ve bu şekilde hastalık oluşumu ile ilgili yolak başlamış olur. Yoğun asbest konsantrasyonuna maruz kalan her kişide asbestosis gelişmemektedir, bunun nedeni hastalığın patogenezinde kişiye ait faktörlerin önemli rol alma olasılığının bulunmasıdır (Akkurt İ 2006, Kılıçaslan Z 2002).

Asbest maruziyeti birlikte sigara kullanımı sinerjistik etkileşimle akciğer kanseri riskini artırmaktadır (Rom WN 1998). Hiç sigara içmeyen ve endüstriyel ilişkisi olmayan kişilerde akciğer kanser riski 1 kabul edilirse, bu oran günde 20 sigara içenlerde 45'e, hem sigara içen ve hem de asbest tozu soluyanlarda ise 92 katına çıkmaktadır. Kanserojen olan sigara ve asbest birlikte olduğu zaman insan sağlığı için çok tehlikeli bir mineral olabilmektedir. Türkiye'de kırsal bölge erkeklerinin sigara içme oranı %70'leri bulduğunu ve bununla birlikte asbest lifi soluduğunu varsayarsak halkımızın ne kadar yüksek kansere yakalanma şansı olduğu ortaya çıkmaktadır (www.mesothelioma-tr.org/ulusal/asbest2.html).

Asbestin bütün çeşitleri karsinogeniktir. Yapılan araştırmalar bunların en kanserojen türünün kromidolit olduğunu göstermiştir (Gibbs AR ve Wagner JC 1992). Kromidolit, amozit ve tremolit en zararlı türlerdir. Kromidolit, kromitlerden 2 ila 4 kat daha güçlü olduğu görülmeye rağmen asbestin bütün çeşitleri akciğer kanserine neden olmada aynı kapasiteye sahiptirler (Demiroğlu H 1988).

1980' li yılların sonlarına doğru asbest kullanımı pek çok ülkede yasaklanmıştır. Benzer şekilde 1 Ocak 2005 yılında yasa ile asbest üretimi ve tüketimi tüm Avrupa'da yasaklanmıştır (http://www.jmo.org.tr/resimler/ekler/34fdbf83b74c193_ek.pdf). Asbest lifleri farklı büyüklüklerde olabilir (Robledo R ve Mossman B. 1999). Liflerin çapı ve uzunluğu, maruziyetin dozu ve süresi, makrofajların fagosite yeteneğini düşürmesi asbestin patojenitesini etkiler (Şenyiğit A vd 2000).

Hansen J vd (1998)'nin yaptıkları bir çalışmada krokidolite çevresel olarak maruz kalan kişilerde mezotelyoma insidansı araştırılmıştır. Maruziyet derecesi; periodik çevresel ölçümler ve ikamet süresi ile tahmin edilmiştir. Araştırma sonucunda ilk maruz kalınan zaman, maruz kalma süresi ve maruz kalınan miktarın mezotelioma gelişmesinde anlamlı derecede artışa yol açtığı tespit edilmiştir. İntraplevral veya intraperitoneal olarak asbest lifi uygulanan deneysel modellerde mezotelioma insidansının liflerin dozu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Davis JM vd 1991). Çapı 0.25 mikron'dan daha az ve boyu 8 mikron'dan daha uzun olan ince uzun lifler tümör oluşumunda daha etkindir (Dogan M 2002, Berman DW vd 1995).

Liflerin kısa ve kalın olanları daha az kanserojendir. Endüstride kullanılan asbestin %90'ını oluşturan krizotil (beyaz asbest) akciğerde hacim kaybederek erimesi ve parçalanması nedeniyle en az zararlı asbest türüdür (Barış Yİ 1987, Barış Yİ vd 1995).

Hume LA ve Rimstidt JD (1992)'in çalışmalarında, insan akciğer dokusundaki 1 µm çapındaki krizotil lifinin ortalama 9±4.5 ay sonra tamamen eridiği hipotezine varılmıştır. Asbestin amfibol tipi sahip olduğu geometrik özelliğinden dolayı subplevral boşluğa kadar ulaşarak devamlı karsinojen olarak rol oynamaktadır. Asbestin amfibol lifleri, özellikle krokidolit asbest malign mezotelyomaya yol açarken, krizotil lifleri akciğer kanseri gelişiminde rol oynamaktadır (Yüksel M ve Kalaycı NG 2001, Lee SH vd 1999).

Asbest temasının insanlarda en sık manifestasyonu plevral plak (PP) ve diffüz plevral kalınlaşmayı (DPK) içeren plevral hastalıktır (American Thoracic Society 2004, Miles SE vd 2008).

2.2. Kalsifik Plevral Plak

Plevral plaklar, asbest temasının biomarkını olarak bilinmektedirler (Luo S vd 2003). Asbeste maruziyetiyle oluşan subplevral hyalinize alanlardır. Genellikle her iki hemitoraksta birlikte gelişirler, plakların yapısında lifsel biçimli amfibollerin bol miktarda, serpantin asbest liflerinin çok az miktarda bulunduğu görülmüştür (Boffetta P vd 1998, Chapman SJ vd 2003).

Plevral plakların çoğu ön-arka göğüs duvarından çok, lateral göğüs duvarında yer almaktadırlar. Genellikle bazal bölgede ve parietal plevra üzerinde yerleşirler. Yaygınsa restriktif tipte fonksiyon kaybına neden olabilir (Mutlu B 2001). Plevral plakların şekilleri değişken olup, daha ciddi olgularda harita benzeri patern gösterirler. Plevral plaklar perikarda ve mediastende yer aldıklarında, perikard ve diyaframın gergin görünümünün sonucu olarak düz bir hat şeklini alırlar Plaklar göğüs duvarı, diyaframa, perikard ve mediastende lokalize, sınırlanmış veya ayrık, düzgün veya nodüler iç yüzeyiyle dens plevral opasiteler ve lineer yapılarıdır (Statement of the American Thoracic Society 1986).

Plevral plakların genellikle temas dozundan çok ilk temastan itibaren geçen temas süresiyle ilişkili oldukları kabul edilmektedir. Plevral plaklar uzun bir latent periyoda sahiptirler, 10 yıldan önce görülmezler, 20 yıldan sonra ve çoğu da 30 yıllık temas süresinden sonra görülürler (Hillerdal G ve Hendeson DW 1997, Hillerdal G 2002, Nishimura SL vd 1998). Türkiye’de ilk kez Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları’ndan Prof. Dr. Selahattin Yazıcıoğlu tarafından çevresel asbest temasının plevral kalsifikasyon, malign mezotelyoma ve bronş kanserine yol açtığı uluslararası alanda bildirilmiştir (Yıldız T vd 2010). Ülkemizde endemik kalsifik plevral plaklardan (KPP) asbest ve non-asbest mineral olan erionit olmak üzere en azından iki farklı mineral sorumludur (Yazıcıoğlu S vd 1976/78/80, Barış Yİ vd 1978/79).

Asbeste maruz kalanlarda plevra kalsifikasyonu görülme oranı yüksektir. Bunlar genellikle küçük veya yaygın plaklar şeklindedir. Yıllarla yoğunlukları ve yaygınlıkları artar. Özellikle tremolit tipinde görülür. Patagenez tam bilinmemekle birlikte liflerin visseral plevraya gelip sonra parietal plevrada mikroskobik yırtılmalar ve plevral plaklar oluşturduğu bilinmektedir. Yaşla birlikte kalsifiye olurlar. Asemptomatiktir ve rutin akciğer grafisinde tesadüfen görülürler. Asbest temasının doğrudan kanıtları akciğer dokusunda (cerrahi veya post-mortem), bronko alveoler lavajda ve balgamda lif sayısı ve asbest cisimciklerinin varlığıdır (Bergamo L vd 2010, Ramazzini C vd 2010). Bilgisayarlı tomografide; perivertebral ve perikardiak plaklar, yüksek rezolüsyonlu kompüterize tomografide ise diyaframatik plaklar görülür (Mutlu B 2001). Asbest ile temas eden olgularda asbestoz gelişip gelişmediğini belirlemek amacıyla YRBT (Yüksek Rezonanslı Bilgisayarlı Tomografide) kullanıldığında, aynı zamanda plevrada

oluşabilecek plaklar gibi çeşitli patolojilerin değerlendirilmesi yapılabilmektedir (Erbay Polat G vd 2002). Benign asbest plevral effüzyonlarından sonra malign mezotelyoma gelişmez. Buna karşın benign asbest plevral efüzyonu, plevral kalınlaşma ve diffüz plevral fibrozis gelişimi için risk faktörüdür (Rom WN 2008).

Türkiye’de daha önce birçok çalışmada çevresel fibröz minerallere bağlı endemik kalsifik plevral plak (KPP) gözlenen yerleşim birimleri ve bölgeler tanımlanmıştır (Tablo 2.2.1.) (Barış Yİ vd 1987/88, Keyf İ.A vd 1994, Özesmi M vd 1990, Seven A vd 2000).

Tablo 2.2.1: KPP ile ilgili çalışmaların karşılaştırılması

Yerleşim yeri	Araştırmacı	Çekilen Grafi (n)	KPP (%)
Gürpınar-Şabanözü-Çankırı	Barış Yİ (1987)	150	14.6
Çermik-Diyarbakır	Yazıcıoğlu S (1976)	5400	3.8
Sarıkaya-Çekerek-Yozgat	Artvinli M (Barış Yİ (1987)	120	8.3
Hacıhasan-İlgaz-Çankırı	Barış Yİ (1987)	285	5.2
Horasanlı-Tavas	Arpaz S (1999)	381	12.9
Mihallıççık-Eskişehir	Barış Yİ (1987)	3880	10
Eskihisar-Ereğli-Konya	Barış Yİ (1987)	200	6.0
Bedirili-Yeşilova-Burdur	Barış Yİ (1987)	199	24.0
Edige- Elmadağ-Ankara	Keyf İA (1994)	76	42.3

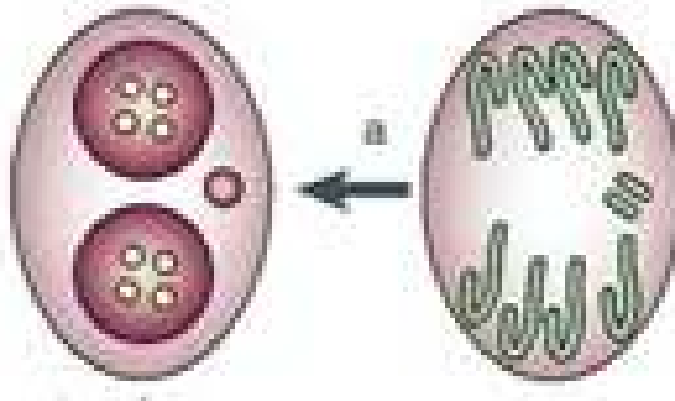
Ates G vd (2010)’nin Çermik civarında köylülerde %29,9 KPP ve %4,7 DPK saptamışlardır. Nazilli Verem Savaşı Dispanserinin Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıları Anabilim Dalı ile ortaklaşa yaptıkları bir çalışmada; Denizli ili Tavas ilçesi Horasanlı Köyü’nde %12,9 oranında KPP saptandığı bildirilmiştir. (Arpaz S vd 1999). Özkurt vd (2003) Tavas Yukarıboğaz köyünde; 21’i çocuk, 118’i erişkin olan 139 kişiden, sekiz kişide KPP (%7,5) belirlemiştir. Çalışmada toprak örneklerinde; dolomit, kalsit, feldispat, kuvars, klorit ve montmorillonit gibi minerallere

rastlanmıştır. Bunlardan dolomit, tremolite asbest içerebilmektedir. Ayrıca Denizli Çal ilçesi köyleri de asbest oluşumu bakımından incelenmiş ve sağlığa zararlı asbest lifleri oluşumu belirlenmiştir (http://bsemiz.pamukkale.edu.tr/Yayinlar%C4%B1m_2007/B.I.a.5.pdf).

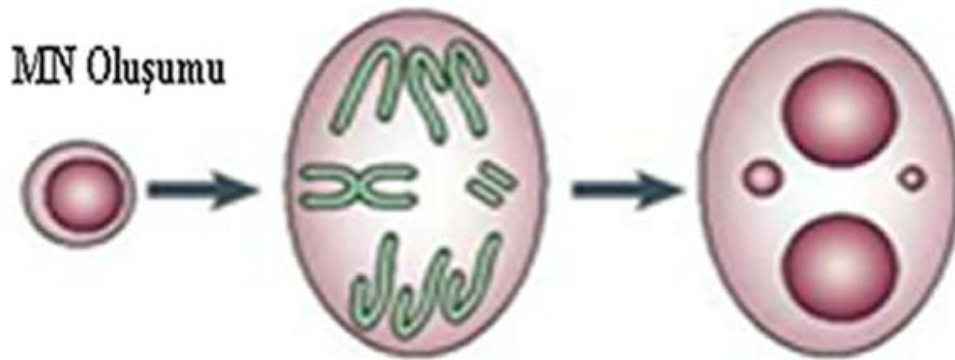
2.3. Mikronükleus (MN) oluşumu

Dopp ve Schiffmann (1998), Rahman vd (2000), Poser vd (2004), farklı hücre tiplerindeki klastojenik olayları incelerken; mikronükleus oluşumuna krizotil asbestin sebep olduğunu belirtmişlerdir. Mikronükleuslar (MN), mitozun telofaz evresinden geri kalan asentrik kromozom fragmentleri, asentrik kromatid fragmentleri ve tüm kromozomdan köken alır (Şekil 2.3.1; Şekil 2.3.2) (Fenech M 2007). Rasyasyon biyolojisi çalışmaları, DNA çift iplik kırıklarının tamirinin simetrik asimetrik kromatit ve kromozom değişikliklerinin yanı sıra kromozom ve kromatid fragmentlerine yol açtığını göstermiştir. Asentrik kromozom fragmentlerinin küçük bir kısmı tamir edilemeyen DNA çift iplik kırıklarından kaynaklanır. İnterfazın S evresinde *in vivo* olarak kimyasallara maruz kalan bir hücre bölündüğü zaman, kromatid tipte hataların (kromatid delesyonları, akromatik lezyonlar ya da boşluklar ve kardeş kromatid değişimi gibi) yaygın olduğu görülmektedir. Bu hasarlardan sorumlu moleküller açıkça anlaşılammış olsa da akromatik lezyonlar; baz hasar bölgesi ya da tek zincir kırığı ile temsil edilirken, delesyonun; çift zincir kırığı ile sonuçlandığı kabul edilir. Sonuç olarak, kimyasalların neden olduğu çeşitli sitogenetik hatalar sadece kromatid tipindekilere değil aynı zamanda geri kalmış kromozom parçalarına dönüşebilir ve MN olarak ifade edilebilir (Fenech M 1993).

Hücre sitoplazmasında içinde yer alan MN, membran içinde kromatin materyali içerir ve ana nükleusa benzer fakat ana nükleustan daha küçüktür bu yüzden kolaylıkla tanınabilir (Möller M 1995). MN oluşumu, mitozun başarıyla tamamlanmasına bağlıdır. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Lohani M 2000).



Şekil 2.3.1. Geri kalan asentrik kromozom parçalarından kaynaklanan MN oluşumu (Fenech 2007)



Şekil 2.3.2. Tüm kromozom kaybından kaynaklanan MN oluşumu (Fenech 2007)

Lenfositler mitojenik bir uyarıya karşı aynı şekilde (birbirine benzer tarzda) cevap vermezler. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Zijno A vd 1994).

2.3.1. İnsan Lenfositlerindeki MN Sıklığının Diğer Faktörlerle İlişkisi

MN frekansını etkileyen; yaş, cinsiyet, sigara kullanımı, alkol tüketimi, X ışınları gibi birçok faktör vardır (Müller WU vd 1996). Bu faktörler ve MN frekansı arasındaki ilişki ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır (Kazimirova vd 2009, Huang vd 2009, Alvarenga vd 2010).

2.3.1.1. MN Sıklığı ve Yaş ve Cinsiyet Arasındaki İlişki

Kazimirova vd (2009) yaşlılarda gençlere göre, kadınlarda ise erkeklere göre daha fazla mikronükleus olduğunu bildirmişlerdir. Diğer bazı araştırmalarda da MN sıklığının yaşla birlikte arttığı saptanmıştır (Fenech ve Bonassi 2011, Kirsch-Volders M vd 2006).

Periferal kan lenfositlerindeki MN sıklığının hem erkek hem de bayanlarda çok genç yaşlarda ortaya çıktığı gözlenmiştir. Araştırmacılar bunu, sağlıksız yaşam faktörleri, yetersiz beslenme ve endojen genotoksinler gibi çeşitli faktörlerin oluşturduğu DNA tamir genlerindeki mutasyon, kromozom segregasyonu, hücre döngüsündeki checkpoint, sayısal ve yapısal kromozom anomalilerinin kümülatif etkisiyle oluşmasına bağlamıştır. Ayrıca kadınlardaki MN sıklığının artmasının X kromozomunun inaktivasyonundan kaynaklandığını belirtmişlerdir. Erkeklerde bir tane X kromozomu bulunduğu için MN sıklığı da daha azdır (Fenech ve Bonassi 2011).

2.3.1.2. MN Sıklığı ile Sigara, Alkol ve Yasadışı İlaç Kullanımı Arasındaki İlişki

MN sıklığı ve sigara kullanımı karşılaştırıldığında; günde 30 ve daha fazla sigara içen kişilerde MN sıklığında artış gözlenirken, 30'dan az içen kişilerde bir fark gözlenmemiştir (Fenech ve Bonassi 2011). Başka bir çalışmada ise; kadınlarda hem sigara kullanan, hem de sigara kullanmayanlarda MN frekansının yaşla birlikte arttığı gözlenmiştir (Vaglenov AK ve Karadjov AG 1997).

Aşırı alkol tüketimi kanser için risk faktörü olarak bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda; alkol kullanan kişilerde kontrol grubuna göre MN sıklığında artış gözlenmiştir (Ishikawa H vd 2007).

METH (Metamfetamin), kokoin, eroin, esrar gibi yasadışı ilaçların genotoksik etkilerinin olduğu bilinmektedir (Alvarenga vd 2010). Li vd (2003) ve Fenech ve Bonassi (2011) METH kullanıcılarında MN sıklığında artış olduğunu bildirmişlerdir.

2.3.1.3. MN Sıklığı ile Fiziksel Ekzersiz ve Yaşam Koşulları Arasındaki İlişki

Fiziksel ekzersizlerin MN üzerindeki etkisini tanımlayan çalışmalarda; Huang P vd (2009), Stefanie R vd (2008) orta düzeyde ekzersiz yapan kişilerde MN sıklığında azalma, Schiffli C vd (1997) ve Umegaki K vd (1998) ise aşırı ekzersiz yapan sağlıklı kişilerde MN sıklığında artış olduğu ve bu etkilerin ekzersiz sonrası ilk 24'te gözlenebileceği belirtmişlerdir. Huang vd (2009) ise; dengeli beslenme, düzenli ekzersizlerin yetersizliği (haftada 2'den az), yetersiz uyku (günde 6 saatten az) ve çalışılan saat (günde 9 saatten fazla) gibi faktörlerin her birinin MN sıklığının artmasına sebep olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca yaşam koşullarının kötü olduğu durumlarda MN sıklığının arttığı gözlenmiştir.

2.3.1.4. MN Sıklığı ve Beslenme Arasındaki İlişki

Besinlerin miktarı ve seçimi; DNA tamiri ve sentezindeki kofaktör olarak gereken maddelerin hücrel konsantrasyonunda güçlü bir etkiye sahiptir. DNA sentezi ve tamiri ya da kromozom segregasyonundaki enzim ve proteinler; mikroproteinlerin ya substrat, kofaktör olarak ya da enzimin integral parçası olarak alınmasını gerektirir (Fenech ve Bonassi 2011).

Beslenme ve MN arasındaki ilişkiyi tanımlayan ilk çalışma B12 vitamini ve folatla yapılmıştır (Fenech ve Bonassi 2011).. Bu besinlerin azlığı eritrosit hücrelerinde, MN oluşumuna sebep olmaktadır. İnsanlardaki in vivo çalışmalar PKH'deki MN sıklığı

ile folat, B12 vitamini, riboflavin, biotin, pantotenik asit, beta-caroten, E vitamini, retinol ve kalsiyumun plazma konsantrasyonu ya da beslenme düzeyi ile önemli bir ilişkisinin olduğunu göstermektedir (Fenech ve Bonassi 2011).

Fenech ve Rinaldi (1995) Fenech vd. (1997), Blount vd. (1997), Fenech vd (1994), MN'un kandaki vitamin ve folate konsantrasyonu ile çok kuvvetli ilişkisi bulunduğunu, bunların azlığının bazı kanser tiplerinde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir.

2.3.1.5. MN Sıklığı ve X-ışınları Arasındaki İlişki

1987 yılında Brezilya'da meydana gelen radyolojik kazanın DNA'da oluşturduğu zararı belirlemek için MN sıklığına bakılmıştır. MN sıklığında, iyonizan radyasyonuna bağlı anlamlı bir artış gözlenmiştir (Cruz AD vd 1994). Diğer yapılan çalışmalarda da in vitro olarak radyasyon alan lenfositlerde oluşan MN sayısı ile radyasyon dozu arasında doğrusal bir ilişki bulunmuştur (Müller WU vd 1996). Kanserli hastalarla yapılan bir çalışmada, radyoterapi sırasında hastaların tümünde MN frekansında dozla ilişkili bir artış bulunmuştur (Fenech M 1993).

Bir başka çalışmada ise, Demirel S vd (1993) fototerapinin organizma üzerine etkilerini araştırmak için MN testi ve kardeş kromatid değişimi (KKD) kullanılmıştır. Florasan ışığının KKD oranını etkilemediği ancak MN sıklığını istatistiksel anlamda artırdığını bulmuşlardır.

2.3.1.6. MN Sıklığı ve Asbest Arasındaki İlişki

Canlı hücrelerle yapılan önceki çalışmalar, asbestin spesifik mitotik baskılamaya neden olduğunu göstermiştir ve bu etkiler sonucunda MN oluşmaktadır (Ault JG vd 1995, Dopp E vd 1995). Mitoz sırasında, asbestin fiziksel varlığı kromozomların yanlış ayrılmasına neden olur. Ayrıca, 66. saatte maximum MN sayısı üretilir. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Lohani M vd 2000).

Asbest mitozun normal yönüne müdahale ederek primer olarak anöploidiye sebep olur. Anöploidi, asbest nedenli tümörlerin yaygın bir karakteristiğidir ve neoplastik gelişimin erken safhalarında kromozomu komple değiştirerek major bir rol oynadığı öne sürülmüştür (Oshimura M vd 1984, Barrett JC vd 1989).

Asbestin karsinojenik etki mekanizması hala tam olarak anlaşılmış değildir. Asbest lifleri diğer karsinojenlerin tersine, gen mutasyonlarına neden olmaz fakat tümör promotörü olarak etki gösterebilir (Oshimura M vd 1984, Barrett JC vd 1989).

2.3.1.7. MN Sıklığı ve Kansere Arasındaki İlişki

MN frekansı ile kanser gelişimi arasındaki direkt ilişki birçok bulgu ile desteklenmektedir. *Bloom sendromu* veya *Ataxia telangiectasia* gibi hastalıklardan etkilenen bireyler de, yüksek MN frekansı ve kanser riski taşımaktadırlar (Fenech vd 1999). Chang vd (1996)'ne göre; kanser hastalarında periferik lenfositlerde olduğu gibi hedef dokuda da MN frekansı artmaktadır. Randa vd (2006) tarafından akciğer kanserli hastalarda MN sıklığı, NBud ve NPB (Nükleer plazmik köprü)'lerin, kontrol grubuna göre önemli derecede yüksek olduğu gösterilmiştir.

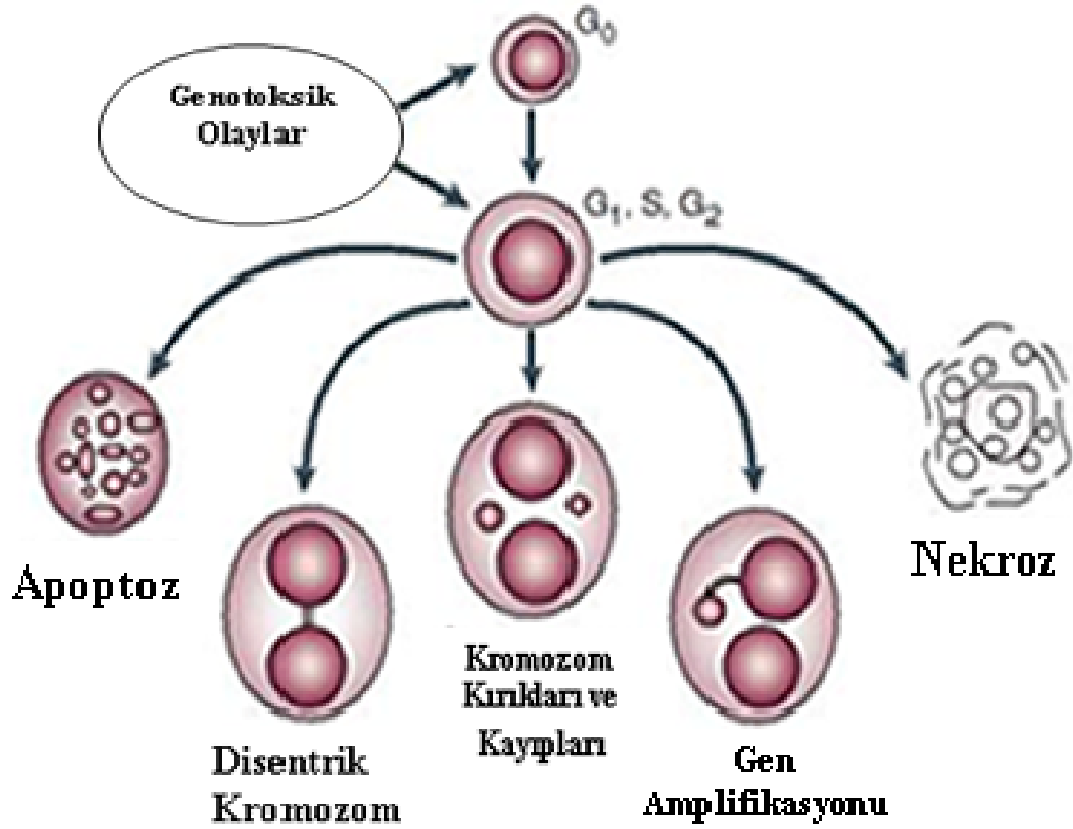
2.4. Sitokinez-Blok Yöntemi

MN testi ilk olarak 1950'lerde bitki hücrelerinde X-ışınlarının neden olduğu kromozom hasarının ölçülmesi için, 1970'lerde hayvan hücrelerinde (Widel M vd 2001, Jagetia GC vd 2001) ve daha sonraki yıllarda Schmid W (1975) tarafından kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemek amacıyla kullanılmaya başlanmıştır. Bazı araştırmacılar (Von Ledebur MM ve Schmid W 1973, Högstädt B ve Karlsson A 1985) geliştirdikleri modifiye metotlarla anöploidiye yol açan ajanlar ile klastojenleri birbirinden ayırmada MN büyüklük farkından yararlanarak; klastojenlerce uyarılan MN'lerin asentrik kromozomal fragmanlar içeren küçük, anojenlerce uyarılan MN'lerin ise tam kromozomlar içeren daha büyük ebatlı olduğunu göstermişlerdir (Catena C 1994).

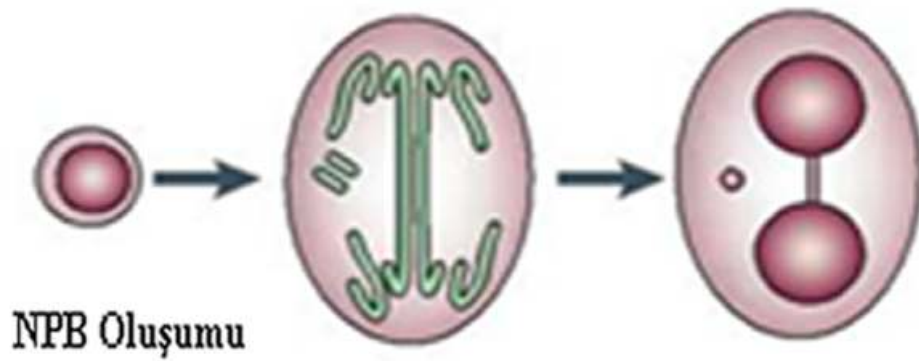
1980'li yılların başında Prof. Alec Morley, Countryman ve Heddle'in (1976) çalışmalarından yola çıkarak Sitokinez-Blok Metodu'nu geliştirmiştir. Daha sonra yönetimin, bölünen ve bölünmeyen hücreler arasında ayırım yapmayan, ayrıca bu alışılmış MN yöntemlerine göre daha doğru ve daha duyarlı bir yol olduğu gösterilmiştir (Fenech M ve Morley A 1986/91).

Sitokinez-Bloklu Mikronükleus (CBMN) yönteminin gelişimini, yapılan kromozom sapması (aberration) yöntemleriyle doğrudan ve geçerli karşılaştırmalar takip etmiştir. Kromatid ve kromozom delesyonlarının nisbi verimi henüz tanımlanamamış olsa da Littlefield GL vd (1989) ve Ramalho A vd (1988); CBMN yönteminin, asentrik parçaları %60 ile %90 arasında belirleyebildiği kesin olarak gösterilmiştir. Kirsch-Volders vd (1997)'de, Fenech vd (1997)'ne göre; bu yöntem klastojenik ve aneujenik etkileri birbirinden ayırabilmektedir. Ayrıca, Elhajouji vd (1997); doz-cevap eğrisinin, tam kromozom ve kromozom ayrılmaması sonuçlarına uygulanabileceğini bildirmiştir. Bundan dolayı *in vitro* MN test yöntemi bilimsel olarak yeterli ve güçlü kabul edilmektedir (Kirsch-Volders vd 2003).

Lenfosit kültürlerindeki çalışmalarda MN tekniği, 1982 yılında ilk defa Stich HF vd (1982) tarafından uygulanmıştır. MN tekniği insandaki, *in vivo* ve *in vitro* genotoksik (Binükleer hücrelerdeki MN, NBud (Nükleer Bud) ve NPB (nükleoplazmik Köprü) (Serrano-Garcia L vd 2001), sitotoksik (nekrotik ve apoptik hücrelerin oranı) (Şekil 2.4.1, Şekil 2.4.2.) ve sitostatik (bir, iki ve çok çekirdekli hücrelerin oranı) olayları tanımlayan en iyi biyomarkırlardan biridir (Fenech ve Bonassi 2011). Ayrıca elde edilen verilerin çok sayıda olması istatistiksel dayanağının güçlü olmasını sağlar (Fenech M vd 1999). Kromozom kırıkları, DNA yanlış eşleşmesi, kromozom kayıpları, non-disjunction, nekroz, apoptoz ve sitostazın tanımlanmasında kapsamlı bir metottur (Fenech M vd 2007). Ayrıca, dokularda meydana gelen morfoloji bozukluğunu, premalign değişiklikleri ve karsinogenlere maruz kalmış bireylerde artmış kanser riskini göstermek amacıyla da biyomarkır olarak kullanılabilir (Demirel S ve Zamani A.G 2002).



Şekil 2.4.1 Sitotoksik / Genotoksik ajanlara maruz kalmış sitokinez-blok kültür hücrelerindeki çeşitli oluşumların nedenlerinin gösterilmesi (Fenech 2007)



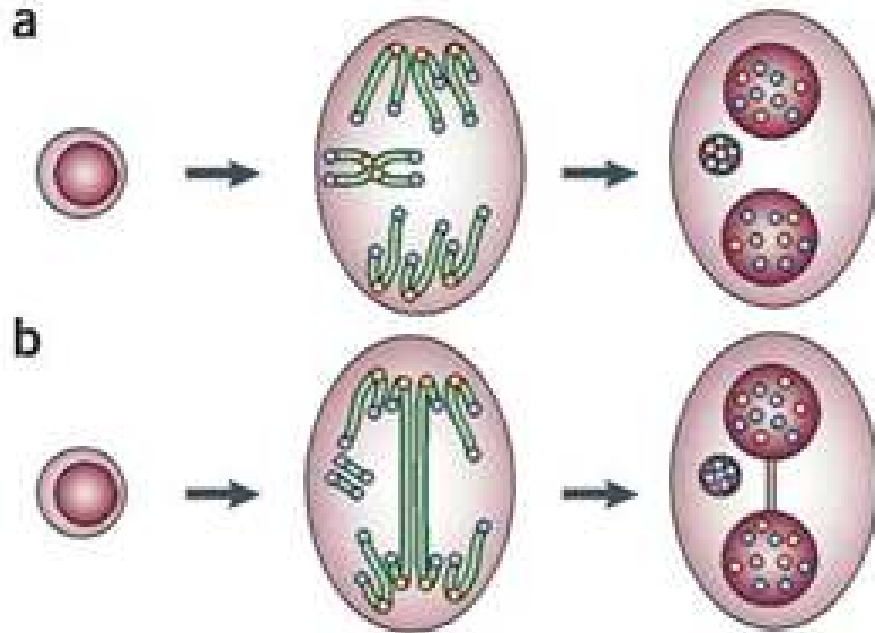
Şekil 2.4.2. Disentrik kromozomlardan kaynaklanan NPB oluşumu (Fenech 2007)

Sitokinez-Blok metodu, küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan *Sitokalasin-B* (Cyt-B) ile mitoz geçiren memeli hücrelerinde sitokinezi bölünmesi esasına dayanmaktadır. Belli orandaki lenfosit kültürüne uygun konsantrasyonda Cyt-B eklenir. Cyt-B, mikroflamentleri baskılayarak, çekirdek bölünmesine (karyokinez) izin verip, sitoplazma bölünmesini (sitokinez) engeller ve böylece en azından bir kere bölünme geçiren binükleer hücreler oluşur (Şekil 2.4.3) (Fenech 2007, Ramalho A vd 1998, Müller WU vd 1996, Demirel S ve Zamani AG 2002).



Şekil 2.4.3 Sitokalazin-B kullanılarak iki çekirdekli (binükleer) hücre oluşumu (Uzun S 2007)

MN frekansı, temelde tüm interfaz hücrelerinde hesaplanabilir (Ramalho A vd 1998). Lenfosit kültürlerinde, bireyler arasındaki farklılıklar ve kültür şartlarının hücre döngüsü kinetiğini değiştirdiği gözlenmiştir (Fenech M ve Morley A 1986). MN frekanslarının ideal olarak hesaplanmasında, bir kere bölünme geçiren hücreler incelenmeye alınır (Fenech M ve Morley A 1986, Ramalho A vd 1998). Bölünmeyen bir hücrede kromozom hasarları MN olarak ifade edilemez, sadece bölünen hücrelerde tanımlanabilir (Migliore L vd 1989). İncelenen alanda kültür süresinde ikinci bölünmesini tamamlamış 4 çekirdekli hücrelerde bulunmaktadır fakat bu hücrelerde görülen MN'ler değerlendirmeye alınamaz (Fenech M 2007).



Şekil 2.4.4. MN ve NPB oluşumunun sentromerik ve telomerik problemlerle gösterilmesi
(Fenech M 2007)

Fenech (1997)'de, Kirsch-Volders (1997)'de, Eastmond ve Tucker 1989'de MN test yönteminde kinetokor veya sentromeri belirleyen metodlar kullanarak; kromozom kırığı nedeniyle MN ile kromozom geri kalması nedeniyle MN'ları birbirinden ayırmanın kolay olduğunu belirtmişlerdir. İmmüno kimyasal işaretleme metodları ile CBMN test yöntemi, MN oluşumundan sorumlu esas mekanizmanın anlaşılmasını sağlar. Çift iplik DNA kırıkları, asentrik fragmentli MN oluşumuna ve mitotik evredeki hata tam kromozomlu MN oluşumuna neden olmaktadır (Kirsch-Volders vd 2003).

MN araştırmalarında *in situ* hibridizasyon (ISH) tekniği de kromozomların sentromerini tanımlamak için kullanılmaktadır. Sentromerik problu *Floresan In Situ Hibridizasyon* (FISH) metodu (Şekil 2.4.4.), aneuploidiyi indükleyen bileşiklerin değerlendirilmesinde yer almaktadır (Papapaulou vd 2001). Ayrıca, FISH tekniği ile MN oluşturan kromozomların her birinin kimliğini belirleyebilecek teknolojik gelişmeler de sağlanmıştır (Richard F vd 1994).

Kültürü yapılan insan lenfositlerinde oluşan spontan MN frekansı, lenfositlerin hayat süresi boyunca oluşan genetik hasar birikiminin bir göstergesidir. Çevresel ve mesleki olarak çeşitli mutajenlere maruz kalmadan gözlenen MN insidansı “*Spontan MN frekansı*” olarak tanımlanır. Bilinen herhangi bir etkene maruz kalmadan önce ve sonra değerlendirilen MN frekanslarının mutajenite göstergesi olduğu belirtilmektedir. Spontan MN oluşumuna neden olan mutasyon tipleri: Kinetokor proteinlerinde, sentromerde oluşan ve anafazda kromozom kaybı ya da eşit olmayan kromozom dağılımına yol açabilen iğ iplikçiklerindeki mutasyonlar ve çevresel mutajenlere maruz kalmanın bir sonucu olarak asentrik kromozomların oluşumuna neden olan, tamir edilemeyen DNA zincir kırıklarıdır (Fenech M 1993). Fenech (1999) ve Eastmond ve Tucker (1989) tam kromozomu tanımlamak için yaptıkları çalışmalarda; kinetokor antibadilerini kullanmışlar ve spontan olarak meydana gelen MN’ların ~ %50’sinin tam kromozom kaybı sonucunda oluştuğunu ve asentrik kromozom parçalarından köken aldığını bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1.MATERYALLER

3.1.1. Demirbaş Malzemeler:

1. Etüv (Nüve N-500)
2. Otomatik pipet
3. Vorteks (Janke & Kunkel VF2)
4. Mikroskop (Olympus model CX31)
5. Santrifüj (SIGMA 4K15)
6. Hassas terazi (Kern S 2000)
7. Derin dondurucu (-20)
8. Buzdolabı
9. Fotoğraf Makinası (Samsung ES25)

3.1.2. Sarf Malzemeler:

1. Peripheral Blood Karyotyping Medium (Complete culture medium w/o phytohemagglutinin) (01-198-1B)
2. Fitohemagglutinin (Biological Industries B1-12-006-1H)
3. Sitokalazin-B (Sigma, C-6762, AppliChem UN1544)
4. Giemsa (Merck, 5400512)
5. KH_2PO_4 (SIGMA-ALDRICH® 04243)
6. $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA -ALDRICH® 04272)
7. Glacial asetik asit (SIGMA -ALDRICH® 27225)
8. Metanol (SIGMA -ALDRICH® 24229)

9. Ksilol (SIGMA –ALDRICH® 16446)
10. Entellan® (Merck, 640171987)
11. İmmersiyon yağı® (Merck, 09403569)
12. KCL (SIGMA –ALDRICH® 12639)
13. Etil Alkol (%99,5; Smyras®)
14. Distile su
15. Tüplük
16. Çeşitli cam malzemeler (Mezur, şişe, beher, dik ve yatay şale)
17. Konik tabanlı 10ml'lik steril kültür tüpü
18. Enjektör
19. Çeşitli ebatlarda puarlar
20. Pastör pipeti
21. Buzlu Lam (Geschliffen-Mattarant, objectrager 76x26 mm)
22. Lamel (Menzel-Glasser 24x32)
23. Spanç
24. Bulb
24. Eldiven
25. Filtre kağıdı
26. Preparat kutusu
27. Parafilm
28. Kullanılıp atılabilir (Disposable) pipet
29. Heparin

3.2. Metot

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları tarafından plevral plak tanısı konmuş asbeste maruz kalan, yaşları 59-86 arasında değişen ve Denizli ili Bekilli ve Süller yerleşim merkezlerinde ikamet eden 16 kadın, 14 erkek toplam 30 gönüllü kişi araştırmaya alındı. Kontrol grubu olarak; yaş, cinsiyet ve sosyo-ekonomik açıdan benzer olan ve son üç ayda herhangi bir ilaç, sigara ve alkol kullanmayan ve toprak yapısında asbest bulunmayan 37-84 yaşlarında 16 kadın, 14 erkek toplam 30 sağlıklı kişi seçildi. Gönüllülerin tamamı göğüs hastalıkları uzmanı tarafından incelendi ve kaydedildi. Kişilerin alkol, sigara, ilaç kullanımı, çay - kahve alışkanlıkları ve radyasyona maruz kalıp kalmadıkları, asbestli bölgedeki yaşam süreleri, geçmişte ya da şimdi bir hastalık geçirip geçirmediği anketle sorgulandı. Her iki gruptaki gönüllülerden deneyimli personel tarafından periferik kan örnekleri alındı. Alınan örneklerden lenfosit kültürü elde edilerek preparat hazırlandı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda mikronükleus (MN) değerleri bakımından incelendi. Araştırma, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan izin alındıktan sonra Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2010-SBE-017 no'lu proje kapsamında desteklendi.

Biyoistatistiksel değerlendirmeler, SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) 10.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar, ortalama \pm standart hata (SH) olarak verildi. İstatistik yöntemler olarak; iki ortalama arasındaki farkın önemlilik testi ve Mann-Whitney U Testi'den faydalanıldı ve $p=0,0001$ ve $p>0,05$ değerleri arasındaki değerler önemli kabul edildi.

3.2.1. Mikronükleus Elde Etme Yöntemi

Mikronükleus yöntemi, periferik kandan kromozom analizi yapmak için kullanılan yöntem (kültür ortamının hazırlanması, örneklerin alınması, ekim yapılması... vb) benzemekte sadece çıkarım ve preparat hazırlama işlemlerinde ayrılmaktadır. Ayrıca mitozu durdurmak için kolçisin yerine 44. saatte Sitokalazin-B (Cyt-B) eklenmektedir (Baran M 2004). İşlem basamakları aşağıdaki şekildedir:

3.2.1.1. Kültür Ortamının (Besiyeri) Hazırlanması

Besiyeri için periferik kan medyumunu kullanıldı. Bu medyum hazır olarak alındığı için içine (100 cc medyuma) 2,5 ml fitohemaglutinin dışında herhangi bir malzeme (*Fetal calf serumu, streptomisin...* vb) eklenmedi.

Fitohemaglutinin hazırlanışı: İçinde fitohemaglutinin bulunan şişeye 5 ml distile su eklenerek hazırlanır.

100 cc medyum; steril ortamda, steril vidalı kapaklı, konik tabanlı kültür tüplerine 5'er cc olmak üzere bölünüp, 10-15 dakika laboratuvarında bekletildikten sonra kan örneklerinin ekimi yapıldı ya da -20°C'de dondurularak saklandı. Gelen hasta sayısına göre -20 den çıkarılıp 37 °C etüve koyuldu.

3.2.1.2. Kan Örneklerinin Alınması

Asbeste maruz kalan (30 kişi) ve kontrol grubu (30 kişi) ndaki kişilerden, 5 ml'lik steril ve 0.1-0.2 cc heparin içeren enjektörler kullanılarak periferik kanlar alındı. Daha sonra kan örnekleri hemen laboratuvara getirildi ve bekletilmeden kültür ortamlarına ekimi yapıldı. Ekimin yapılamadığı bazı durumlarda ise kanlar 25°C'de 1 gün bekletildikten sonra ekim yapıldı.

3.2.1.3. Kültür Tekniği

Önceden 37 °C'ye getirilmiş olan 5 cc medyum içeren kültür tüplerine steril ortamda, alınan kan örneklerinin 3-4 damlası spanç üzerine damlatıldıktan sonra, 12 damla (0.4 ml) kan ilave edildi. Her bir kişi için 2 tüpe ekim yapıldı ve tüplerin üzerine hasta adı, tarih ve numara yazıldı. Tüpler hafifçe karıştırılarak 37°C'lik etüvde 44. saatte Cyt-B eklenmek koşuluyla 72 saat bekletildi.

1mg Cyt-B 1 ml dimetil-sülfoksitte (DMSO) çözdürüldükten sonra 4cc ham medyum eklenerek ya da 1mg Cyt-B ye 5 ml DMSO eklenerek hazırlanır. Çıkarımın 44. Saatinde kültür tüpleri etüvden çıkartılarak steril ortamda her bir tüpe 80 µl (final konsantrasyon=3µg/ml) Cyt-B ilave edilerek tekrar etüve konuldu.

3.2.1.4. Çıkarım İşlemleri

Fenech'e göre (1986, 1993, 2007) MN elde edildikten sonra bazı modifikasyonlarla çıkarım işlemleri yapıldı.

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

1-72 saat inkubasyondan sonra kültür tüpleri etüvden çıkartılarak 1200 rpm'de 6 dakika santrifüj yapıldı.

2- Dipte 0.6-0.7 ml kalıncaya kadar üstteki süpernatantlar atıldı.

3-Daha sonra hücelere laboratuvar ısısında beklemiş olan 0.1 M hipotonik solüsyonundan 6 cc eklenerek 4 dakika laboratuvar ısısında bekletildi.

4- Hücreler hipotonik solüsyonunda bekletildikten sonra 6 dakika 1200 rpm'de santrifüj edildi.

5- Süpernatantları atılıp üzerine taze hazırlanmış soğuk fiksatiften 6 cc (3:1, metanol:glasial asetik asit) yavaşça damla damla ilave edilip bekletmeden 6 dakika 1200 rpm'de santrifüj yapıldı.

6- Süpernatantları tekrar atılıp üzerine aynı fiksatiften 6 cc ilave edilip, 6 dakika 1200 rpm'de santrifüj edildi.

7- Dipte 0.7 ml fiksatifli hücre bırakılarak süpernatantları tekrar atıldı ve bir gün buzdolabında (+4 °C) bekletildi.

3.2.1.5. Preparat Hazırlama

Lamlar temizlenerek içinde %70'lik metanol bulunan şaleye yerleştirilip soğuyuncaya kadar buzdolabında -20 de bekletildi. Daha sonra şaleden çıkarılan lamlar iyice kurulandı. Pastör pipeti ile fiksatifli hücre içeren kültür tüplerine pipetaj yapılarak hücre süspansiyonundan pastör pipeti yardımıyla lamlara yakın mesafeden (1-2 cm yukarıdan) 10-12 damla damlatıldı. Lamlara kuvvetlice üflenerek hücrelerin lam üzerine iyice dağılması sağlandı ve 37°C de olan su banyosunun üst kısmına düz bir şekilde koyularak kurumaya bırakıldı. Her kültür tüpü için ayrı pastör pipeti kullanılarak farklı

preparatlar hazırlandı ve lamlar ayrı ayrı kodlandı. Daha sonra tüplerin ağzı parafilm ile kapatılarak +4°C’de saklandı.

3.2.1.6. Preparatların Boyanması ve Saklanması

Giemsa (%6’lık) boyama için Sorenson tamponu hazırlandı.

Sorenson boya tamponu (pH=7.0): 5.26 g KH_2P_0_4 ve 8.65 g $\text{Na}_2\text{HP}_0_4, 2\text{H}_2\text{O}$ tartılıp distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlanmaktadır.

Daha sonra 80 ml Sorenson tamponu ile 5 ml Giemsa mezur içinde karıştırıldı ve süzgeç kağıdı ile şaleye süzdürüldü.

Kurumuş olan preparatlar yeni hazırlanan % 6’lık Giemsa içeren şalede 8 dakika boyandıktan hemen sonra 2 kez distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar ksilolden geçirildi ve kanada balsamı (entellan) damlatılarak lamelle kapatıldı.

3.2.1.7. Sitokinezi Bloke Edilmiş Binükleer Hücreleri Tanımlama Kriterleri:

Sitokinezi engellenmiş hücrelerde hesaplanan MN sıklığı, aşağıdaki kriterleri içermek zorundadır.

1. İki çekirdek içeren binükleer hücrelerin zarı, sağlam olmalı ve yanındaki hücrelerden net bir şekilde ayırt edilebilir olmalıdır.
2. Hücrelerin hemen hemen eşit büyüklükte iki nükleusa sahip olması gerekir. İki nükleus sağlam bir çekirdek zarına sahip olmalı ve aynı sitoplazmik zar içinde olmalıdır.
3. İki nükleusun yapısı ve boyanma yoğunluğu aynı olmalıdır.
4. Hücrelerin 6 tane MN’den daha fazlasını içermemesi gerekir.
5. İki nükleus, çekirdek çapının dörtte birinden daha büyük olmayan nükleoplazmik bir köprü ile bağlı olabilir.

6. İki nükleus, hafifçe üst üste katlanabilir veya kenarlarından birbirine değebilir. Üste üste iki çekirdeğin denk geldiği bir hücre sadece her bir nükleusun kendi zarının ayırt edici olmasıyla sayılabilir.

7. Tek çekirdekli ya da çok çekirdekli (üç ya da daha fazla) hücreler ile apoptik ve nekrotik olan hücreler MN, NPBs ve NBUDs sıklığı için hücre sayımına dahil edilemez (Fenech M 2007).

3.2.1.8. Mikronükleus Sayımı

Sayılan çekirdeklerin tekrar sayılmaması için 40'lık objektifte sitoplazması dağılmayıp sınırları belli olan çekirdekler belirlendi ve sadece bunlar sayıldı.

MN'u tanımlamak için kriterler şunlardır;

1. Sadece sitoplazması iyi korunmuş hücreler değerlendirmeye alınmalıdır.
2. MN morfolojisi ve boyanma özelliği nükleer materyale benzer olmalıdır.
3. MN ana çekirdekten ayrılmalıdır. MN bazen ana nükleusun sınırları ile üst üste gelebilir.
4. MN morfolojik olarak normal nükleusa özdeştir, fakat normal nükleusdan küçüktür ve bazı zamanlarda daha yoğun boyanabilir. Ana çekirdeğin maksimum çapının yarısını aşmamalı ve çapı yaklaşık ana nükleusun 1/16'si ile 1/3'ü arasında olmalıdır.
5. MN bir nükleoplazmik köprü yolu ile ana nükleusa bağlı olmamalıdır.
6. Nükleer olmayan partiküllerden farklı olarak ışığı yansıtılmamalıdır (Fenech M 1993, Möller M vd 1995, Köksal G vd 1996, Fenech M 2007).

Asbeste maruz kalan ve kontrol grubundaki kişilerin tümü için 1000 binükleer (2 nükleuslu) hücre sayıldı ve MN sayıları belirlendi. Aynı zamanda 1000 binükleer hücre sayılırken kaç tane trinükleer (3 nükleuslu) ve tetranükleer (4 nükleuslu) hücre varsa sayıldı ve kaydedildi.

Nükleer Bölünme İndekslerini (NDI) bulmak için; 500 mononükleer hücre başına, kaç tane binükleer, trinükleer ve tetranükleer hücre varsa sayıldı ve aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Eastmond ve Tucker 1989).

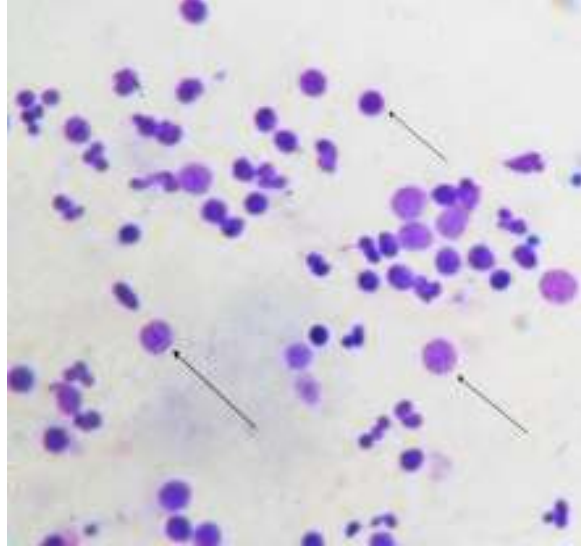
$$NDI = \{1N + (2 \times 2N) + (3 \times 3N) + (4 \times 4N)\} / \text{Total hücre sayısı}$$

N = Nükleus sayısı

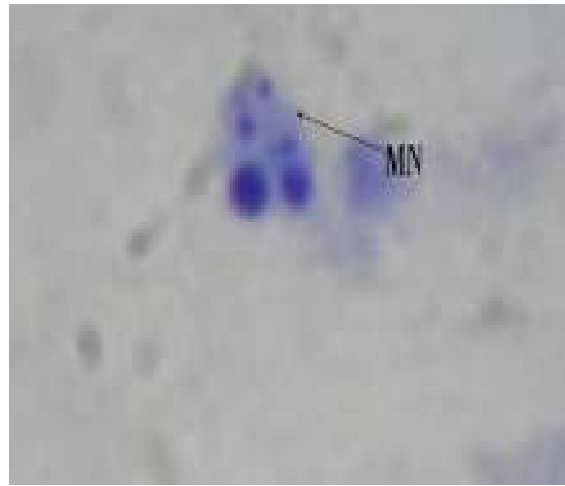
Sitokinezi-blok döneminde bütün hücreler bölünememişse; NDI nin en düşük değeri 1 dir. Bu yüzden tek nükleusludur. Eğer bütün hücreler 1 nükleotid bölünmeyi tamamlayabilmişse ve bu yüzden BN olmuşsa NDI değeri 2 dir. Bu faz aşamasında hücreler 2 den fazla çekirdek bölünmesi geçirmişse 2 den fazla çekirdek oluşur ve NDI değeri de 2 den büyüktür (Fenech M 2007). NDI, yöntemde incelenmiş olan lenfosit hücrelerin mitojenik yanıtı ve ajanların sitotoksik etkilerini karşılaştıran faydalı bir parametredir (Fenech M 2007).

3.3. Işık Mikroskobunda Değerlendirme

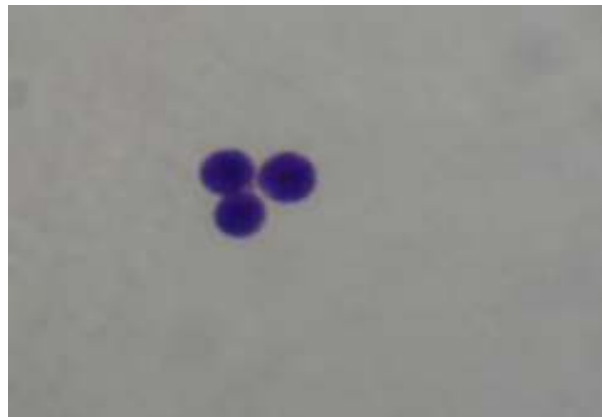
Gönüllülerden alınan periferik kan örnekleri hazırlanan kültür ortamlarına ekildikten sonra hazırlanan preparatlarda; mononükleer, binükleer, trinükleer, tetranükleer hücreler, metafazdaki hücreler, NBud (Nükleer Bud) ve NPB (Nükleoplazmik köprü) oluşumları ışık mikroskobunda belirlendi (Şekil 3.3.1-3.3.6) ve MN sayıları değerlendirildi.



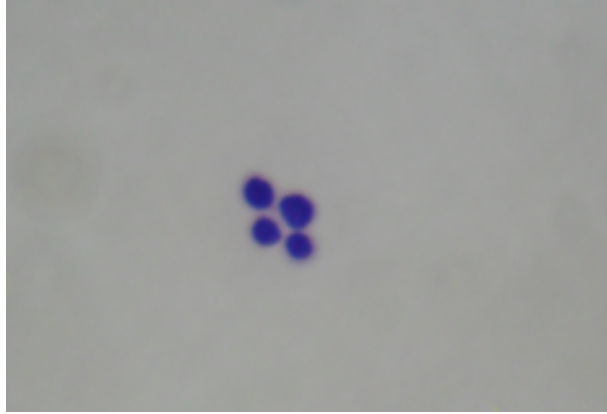
Şekil 3.3.1. Mononükleer hücre oluşumları (1000X)



Şekil 3.3.2. Binükleer hücre ve 3'lü MN oluşumu (1000X)



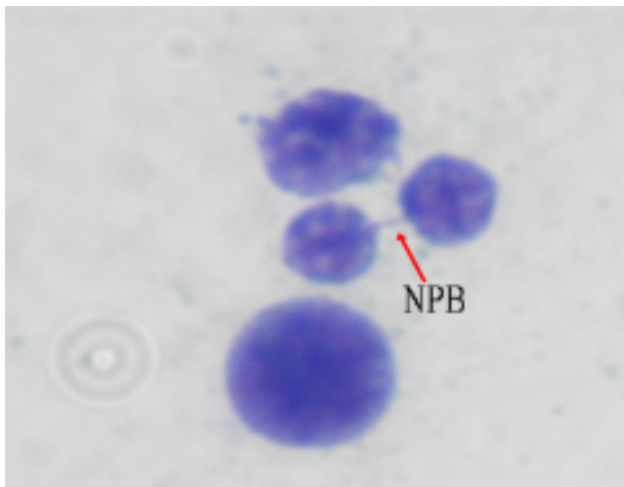
Şekil 3.3.3. Trinükleer hücre oluşumu (1000X)



Şekil 3.3.4. Tetranükleer hücre oluşumu (1000X)



Şekil 3.3.5. Binükleer hücredeki NBud oluşumu (1000X)



Şekil 3.3.6. Binükleer hücredeki NPB oluşumu (1000X)

4. BULGULAR

Pamukkale Üniversitesi Hastanesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran ve çevresel asbeste bağlı kalsifik plevrak plak tanısı alan 30 gönüllü ve çevresel asbeste maruz kalmamış kontrol olarak seçilen 30 gönüllü araştırmaya alındı. Asbeste maruz kalan kişilerin yaş ortalaması $70.83 \pm 1,16$ ve kontrol grubundaki kişilerin yaş ortalaması $53,97 \pm 2,12$ olarak bulundu. Asbeste maruz kalan kişilerin 16'sı kadın (% 53,33) ve 14'ü erkektir (% 46,66). Kadınların yaşı 63-79 ($69.25 \pm 1,24$; ort \pm SH) arasında, erkeklerin yaşı ise 59-80 ($72,64 \pm 1,99$; ort \pm SH) aralıklarında değişmektedir. Kontrol grubunda bulunan kişilerin 14'u erkek (% 46,66) ve 16'sı kadındır (%53,33). Erkeklerin yaşı 37-84 ($55,14 \pm 3,05$; ort \pm SH); kadınların yaşı ise 37-73 ($52,94 \pm 3,01$; ort \pm SH) aralıklarındadır (Tablo 4.1.). Asbeste maruz kalan kadın ve erkeklerin tamamının çay ya da kahve içme oranı günde toplam 0-3 bardak, kontrol grubunun ise 2-7 bardak arasında değişmektedir. Asbeste maruz kalan kişiler son 3 yıldır sigara ya da alkol kullanmamaktadır. Fakat geçmişte sigara içenler bulunmaktadır. Erkeklerin 11'i geçmişte geçimini çiftçilikten sağlamakta, 2'si şoför, 1'i ise peynir yapımıyla uğraşmıştır. Bayanlarda ise; 10'u çiftçilik ve halı dokumacılığı, 6'sı ise sadece çiftçilik yapmışlardır. Günlük olarak yaptıkları herhangi bir ekzersiz bulunmamaktadır. Erkeklerin; 7 (%50)'sinde yüksek tansiyon, 5 (%35)'inde ise şeker hastalığı bulunurken, kadınların; 11 (%68.75)'inde yüksek tansiyon, 4 (% 25)'inde şeker hastalığı belirlendi.

Tablo 4.1. Gönüllülerin demografik özellikleri

Özellik	Asbeste Maruz Kalan Grup	Kontrol Grubu
Yaş (Ortalama ±SH)		
Kadın	69.25±1,24	52,94±3,01
Erkek	72,64±1,99	55,14±3,05
Toplam(Ortalama ±SH)	70.83±1,16	53,97±2,12
Cinsiyet n/(%)		
Kadın	16 /(53,33)	16/(53,33)
Erkek	14 /(46,67)	14/ (46,67)
Toplam	30 /(100)	30 /(100)

Asbeste maruz kalan 16 kadın ve 14 erkek olmak üzere toplam 30 kişinin ve kontrol grubundaki 16 kadın ve 14 erkek 30 kişinin lenfositlerindeki MN değerleri ve diğer özellikleri (yaş, cinsiyet) sırası ile Tablo 4.2. ve 4.4.'de gösterildi. Asbeste maruz kalan kişilerin MN değerleri ortalaması $4,60 \pm 0,15$ ve kontrol kişilerin MN değerleri ortalaması $0,38 \pm 0,02$ olarak bulundu. Asbeste maruz kalan kişilerle kontrol olarak seçilen grubun MN frekansları karşılaştırıldığında MN değerleri arasında önemli bir fark bulundu ($p=0,0001$). Her iki grubun binükleer hücreleri değerlendirilirken 500 mononükleer hücrede kaç tane trinükleer ve tetranükleer hücre olduğu hesaplandı. Ayrıca 1000 binükleer hücredeki toplam NBP ve NBud sayıları saptandı. Tablo 4.3 ve 4.5'de gösterildi. Asbeste maruz kalan kişilerin 3 nükleuslu hücrelerindeki MN sayısı ve 4 nükleuslu hücrelerdeki MN sayısına nadir olarak rastlandı; kontrol grubundaki kişilerin 3 nükleuslu ve 4 nükleuslu hücrelerinde MN gözlenmedi. Asbeste maruz kalan ve kontrol grubu olarak seçilen kişilerin NDI değerleri sırasıyla Tablo 4.3. ve 4.5.'de gösterildi.

Tablo 4.2. Asbeste maruz kalan kişilerin lenfositlerindeki toplam binükleer hücre sayıları, MN'lu binükleer hücrelerin sayısı, toplam MN, MN frekans % ortalama sayısı

Sıra No	Yaş (Yıl)	Cinsiyet	Toplam binükleer hücrelerin sayısı	MN'lu binükleer hücrelerin sayısı			Toplam MN Sayısı	MN frekans % Ortalama
				MN	MN	3 MN		
1	64	K	1039	32	2	1	39	3,75
2	79	K	1073	40	6	1	58	5,40
3	66	K	1003	37	5	-	47	4,68
4	68	K	1055	40	5	1	53	5,02
5	63	K	1034	35	1	1	40	3,86
6	69	K	1089	29	1	1	34	3,12
7	68	K	1000	26	3	1	35	3,50
8	73	K	1005	38	7	-	52	5,17
9	71	K	1008	38	6	-	50	4,96
10	66	K	1039	34	3	-	40	3,85
11	64	K	1033	29	3	1	38	3,67
12	70	K	1034	42	6	-	54	5,22
13	75	K	1033	42	5	1	55	5,32
14	64	K	1027	39	2	-	43	4,19
15	70	K	1045	43	5	1	56	5,35
16	78	K	1072	45	5	1	58	5,41
17	80	E	1007	52	7	-	66	6,55
18	71	E	1030	43	3	-	49	4,75
19	64	E	1004	29	4	-	37	3,69
20	76	E	1017	38	4	-	46	4,52
21	63	E	1007	31	5	-	41	4,07
22	71	E	1000	37	5	-	47	4,70
23	59	E	1000	37	1	-	39	3,90
24	76	E	1008	40	5	-	50	4,96
25	78	E	1008	39	3	-	45	4,46
26	86	E	1001	35	6	-	47	4,70
27	72	E	1003	40	3	-	46	4,59
28	79	E	1014	49	9	2	67	6,61
29	75	E	1008	36	2	-	40	3,97
30	67	E	1054	38	2	1	45	4,23
TOP-LAM (ort±SS±SH)	-	-	-	-	-	-	-	138,17 (4,61±0,81 ±0,15)

Tablo 4.3. Asbeste maruz kalan kişilerin lenfositlerindeki 500 mononükleer hücre sayısındaki, binükleer, trinükleer, tetranükleer, Nbud, NPB, NDI ve metafaz sayısı

Sıra No (H)	Mono-nükleer Hücre	Bi-nükleer Hücre	Tri-nükleer Hücre	Tetra-nükleer Hücre	Nbud	NPB	Nükleer Bölünme İndeksi (NDI)	Meta faz
1	500	143	12	8	3	7	1,28	7
2	500	124	11	4	3	6	1,24	4
3	500	66	13	6	2	5	1,18	3
4	500	75	3	1	-	2	1,15	5
5	500	141	13	9	2	8	1,29	6
6	500	77	8	6	2	3	1,17	3
7	500	69	12	6	2	4	1,19	4
8	500	138	22	8	3	2	1,30	9
9	500	135	21	7	3	1	1,29	7
10	500	140	11	10	2	7	1,32	6
11	500	140	12	10	1	8	1,29	5
12	500	92	8	5	3	4	1,20	4
13	500	97	7	3	3	5	1,20	5
14	500	137	13	7	2	5	1,28	6
15	500	86	9	4	2	3	1,17	3
16	500	124	11	4	3	6	1,24	7
17	500	108	12	4	4	4	1,23	6
18	500	89	7	3	4	12	1,19	4
19	500	85	9	3	1	4	1,18	4
20	500	85	6	3	1	5	1,17	3
21	500	88	9	3	1	4	1,19	7
22	500	86	7	2	1	4	1,17	3
23	500	80	7	1	-	3	1,17	4
24	500	71	7	3	2	5	1,16	4
25	500	131	20	22	-	4	1,35	12
26	500	120	11	3	1	4	1,24	11
27	500	82	7	3	4	13	1,17	6
28	500	96	12	5	4	3	1,22	10
29	500	78	8	4	3	6	1,17	7
30	500	90	11	4	1	6	1,20	9
TOPLAM AM (ort±S S±SH)							36,6 (1,22±0,06 ±0,01)	(5,80± 2,46±0, 45)

Tablo 4.4. Kontrol grubundaki kişilerin lenfositlerindeki toplam binökleer hücre sayıları, MN'lu binökleer hücrelerin sayısı, toplam MN, MN frekans % ortalama sayısı

Sıra No (K)	Yaş (Yıl)	Cinsiyet	Toplam binökleer hücreleri n sayısı	MN'lu binökleer hücrelerin sayısı			Toplam MN sayısı	MN frekans % ortalama
				1 MN	2 MN	3 MN		
1	62	K	1022	4	-	-	4	0,39
2	44	K	1005	3	-	-	3	0,30
3	57	K	1048	5	-	-	5	0,48
4	73	K	1003	6	-	-	6	0,60
5	57	K	1006	6	-	-	6	0,60
6	72	K	1019	6	-	-	6	0,59
7	69	K	1000	4	-	-	4	0,40
8	37	K	1002	3	-	-	3	0,30
9	50	K	1002	2	-	-	2	0,20
10	42	K	1018	3	-	-	3	0,29
11	56	K	1045	4	-	-	4	0,38
12	40	K	1009	3	-	-	3	0,30
13	57	K	1079	4	-	-	4	0,37
14	37	K	1000	2	-	-	2	0,20
15	42	K	1020	3	-	-	3	0,29
16	52	K	1088	5	-	-	5	0,46
17	84	E	1015	4	-	-	4	0,39
18	37	E	1002	4	-	-	4	0,40
19	60	E	1002	3	1	-	5	0,50
20	51	E	1005	4	-	-	4	0,40
21	59	E	1002	4	-	-	4	0,40
22	60	E	1008	4	-	-	4	0,40
23	56	E	1003	2	1	-	4	0,40
24	57	E	1011	-	2	-	4	0,40
25	45	E	1019	3	-	-	3	0,29
26	63	E	1005	5	-	-	5	0,50
27	57	E	1008	3	-	-	3	0,30
28	42	E	1018	3	-	-	3	0,29
29	56	E	1013	4	-	-	4	0,39
30	45	E	1007	3	-	-	3	0,30
TOPLAM								11,51 (0,38±0,11 ±0,02)

Tablo 4.5. Kontrol grubundaki kişilerin lenfositlerindeki 500 mononükleer hücre sayısındaki, binükleer (BN), trinükleer (TRN), tetranükleer (TN), Nbud, NPB, nükleer bölünme İndeksi (NDI) ve metafaz sayısı (M)

Sıra No (K)	MN	BN	TRN	TN	Nbud	NPB	(NDI)	M
1	500	230	14	5	-	1	1,37	94
2	500	217	6	7	1	-	1,34	83
3	500	131	8	4	1	1	1,24	79
4	500	193	12	2	4	4	1,32	48
5	500	135	7	5	-	1	1,25	65
6	500	192	11	4	1 ²	-	1,32	44
7	500	200	13	4	-	-	1,33	44
8	500	220	7	8	10	2	1,35	101
9	500	225	18	4	3	1	1,37	46
10	500	261	21	9	1	-	1,42	70
11	500	242	15	6	-	2	1,38	57
12	500	239	18	11	-	1	1,40	66
13	500	195	13	8	-	2	1,34	59
14	500	269	24	11	-	-	1,44	68
15	500	214	17	12	-	1	1,38	54
16	500	137	8	6	1	2	1,26	54
17	500	169	13	3	1	3	1,30	72
18	500	220	19	9	-	-	1,38	76
19	500	137	7	1	-	-	1,24	83
20	500	254	10	7	-	-	1,38	70
21	500	223	19	5	-	1	1,37	48
22	500	218	19	7	1	2	1,37	78
23	500	261	23	3	-	1	1,40	49
24	500	254	22	5	1	-	1,40	29
25	500	263	19	10	-	-	1,42	68
26	500	172	11	6	-	-	1,31	78
27	500	248	21	4	1	1	1,40	38
28	500	261	21	9	-	1	1,42	72
29	500	255	25	4	3	2	1,40	41
30	500	257	22	9	-	1	1,42	69
TOPLAM ort±S S±SH							40,72 (1,36± 0,06 ±0,01)	(63,43± 17,19 ±3,14)

Asbeste maruz kalan kişilerle asbeste maruz kalmayan kontrol grubundaki kişilerin periferik kan lenfosit kültürlerinde MN sıklığını araştırdığımız çalışmamızda aşağıdaki sonuçlar elde edildi:

1- Hasta ve kontrol grubundaki kişilerin MN frekansı, yaş ortalamaları ve standart hataları Student t testi ile hesaplandı. MN değerleri açısından asbeste maruz kalan kişilerle kontrol grubundaki kişileri karşılaştırdığımızda aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p=0,0001$). Asbeste maruz kalan kişilerle kontrol grubundaki kişiler MN değeri bakımından kendi içinde ayrı ayrı karşılaştırıldıklarında kadın ve erkekler arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$, Tablo 4.6.).

Tablo 4.6. Asbeste maruz kalan grup ile kontrol grubundaki kişilerin MN değerleri

Grup	Cinsiyet	MN değerleri (Ortalama± Standart hata)
Asbeste Maruz Kalan Grup	Kadın	4,53±0,20
	Erkek	4,69±0,20
Kontrol Grubu	Kadın	0,38±0,033
	Erkek	0,38±0,018

2- Asbestin hücre döngüsü üzerine etkisi olup olmadığını araştırmak için NDI değerleri hesaplandı. NDI değerleri açısından asbeste maruz kalan kişilerle kontrol grubundaki kişileri karşılaştırdığımızda aralarında anlamlı bir fark bulundu kontrol grubundaki kişilerin, NDI değerlerinin asbeste maruz kalanlara göre daha büyük olduğu saptandı ($p=0.001$). Asbeste maruz kalan kişilerde NDI değerlerinde azalma (Tablo 4.3.); kontrol grubundaki kişilerde ise artış gözlemlendi (Tablo 4.5.). Her iki grup ayrı ayrı değerlendirildiğinde kadın ve erkekler arasında fark bulunmadı ($p>0,05$, Tablo 4.7.).

Tablo 4.7. Asbeste maruz kalan kişilerle kontrol grubundaki kişilerin cinsiyete göre NDI değerleri

Grup	Cinsiyet	NDI değerleri (Ortalama± Standart hata)
Asbeste Maruz Kalan Grup	Kadın	1,24±0,014
	Erkek	1,20±0,013
Kontrol Grubu	Kadın	1,34±0,015
	Erkek	1,37±0,014

3- Asbeste maruz kalan kişiler ile kontrol olarak seçilen kişiler arasında gözlenen metafaz sayısına göre Mitotik İndeks (MI) oranları açısından istatistik olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0,0001$). Kontrol grubundaki kişilerdeki MI'in asbeste maruz kalan kişilere göre arttığı gözlemlendi. Her iki grup kendi içinde cinsiyet bakımından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0,05$, Tablo 4.8.).

Tablo 4.8. Asbeste maruz kalan kişilerle kontrol grubundaki kişilerin cinsiyete göre MI değerleri

Grup	Cinsiyet	MI değerleri (Ortalama± Standart hata)
Asbeste Maruz Kalan Grup	Kadın	5,25±0,43
	Erkek	6,43±0,81
Kontrol Grubu	Kadın	64,5±4,36
	Erkek	62,21±4,67

4- Her iki grup yaş bakımından karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir fark bulundu ($p=0,0001$). Ayrıca; ayrı ayrı her iki grupta bulunan kişilerin yaşları cinsiyet açısından karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmadı. ($p>0,05$) (Tablo 4.9. ve 4.10).

Tablo 4.9. Asbeste maruz kalan kişilerin yaş ortalamaları

CİNSİYET	n	Yaş (Ortalama± Standart hata)
Kadın	16	69,25±1,24
Erkek	14	72,64±1,19

Tablo 4.10. Kontrol grubundaki kişilerin yaş ortalamaları

CİNSİYET	n	Yaş (Ortalama± Standart hata)
Kadın	16	52,94±3,01
Erkek	14	55,14±3,05

5. TARTIŞMA

Asbest solunması sonucu insanlarda en sık gözlenen hastalıkların başında plevral plak (PP) ve diffüz plevral kalınlaşma (DPK) gelmektedir. (American Thoracic Society 2004, Miles SE vd 2008). Plevral plaklar, asbest temasının biyomarkır olarak bilinmektedirler (Statement of the American Thoracic Society 1986). Asbeste bağlı plevral hastalıklar tozun solunmasından 10-40 yıl sonra ortaya çıkabilmektedir (Barış Yİ vd 1995, Light RW 1995).

Asbest ile temas sonucunda insanda oluşan genotoksik etkiler de bilinmektedir (Dusinska M vd 2004). Asbest, spesifik mitotik baskılamaya neden olur ve bu etkiler sonucunda MN oluşur (Ault JG vd 1995, Dopp E vd 1995). Pek çok çalışmada MN sıklığının yaşla birlikte arttığı gözlenmiştir (Fenech ve Bonassi 2011, Kirsch-Volders M vd 2006, Kazimirova A vd 2006). Yaşlılarda yapılan diğer bir çalışmada kadınlarda MN sıklığının yaşlanma ile birlikte arttığı, yine yaşlı kadınlarda X kromozomlarının otozomal kromozomlardan daha fazla MN oluşumuna katıldığı gözlenmiştir (Richard F vd 1994). Kazimirova vd (2009) XPC ve XPD polimorfizimli kişilerde MN sıklığı karşılaştırılmıştır. Yaşlılarda gençlere göre, kadınlarda ise erkeklere göre daha fazla mikronükleus gösterilmiştir (Vaglenov AK vd 1997). Bu çalışmada, asbeste bağlı plevral plak tanısı alan kişilerde MN sayısı ile yaş ve cinsiyet arasında bir ilişki bulunmadı.

İnsan lenfositlerinde yapılan MN çalışmalarında kromozomal aberasyonlarla birlikte sınırlı sayıdaki moleküler sitogenetik çalışmada, 1p, 3p, 6q, 9p, 13q, 14q, 15q, ve 22q mikrolezyonlar ve bu bölgelerdeki tümör süpressör genlerde allelik kayıp veya inaktivasyon bildirilmektedir (Lee SH vd 1999, Ruosaari TS vd 2008). Dopp E vd (1998)'nin yaptıkları bir çalışmada insan amniyotik sıvı hücrelerinin *Suriye Hamster Embriyo* (SHE) fibroblast hücrelerine göre; asbest liflerine maruziyet sonrası oluşan MN induksiyonuna karşı çok daha az duyarlı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca 1.ve 9. kromozomların perisentrik heterokromatin bölgelerinde kromozomal kırılmaların sayısında bir artış olduğu görülmüştür. Başka bir çalışmada ise hem krizotil asbestin hem de kerosen külünün doza bağlı olarak SHE hücrelerinde MN oluşumunu indüklediği bildirilmiştir (Heddle JA vd 1983). MN belirleme tekniği, insandaki *in vivo* ve *in vitro* genotoksik (Serrano-Garcia L ve Montero-Montoya R 2001), sitotoksik ve

sitostatik olayları tanımlayan en iyi biyomarkırlardan biri olarak kullanılmaktadır (Fenech ve Bonassi 2011). Bu çalışmada, asbest maruziyetine bağlı mikronukleus artışı belirlendi ve asbestin genotosik etkisi saptandı.

Baran M. (2004)'nin yaptığı çalışmada; Asbestin, NDI değerlerini ve mitotik indekslerini azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, asbeste maruz kalan kişilerle kontrol grubu NDI değerleri bakımından karşılaştırıldığında aralarında fark olduğu ve kontrol grubundaki kişilerin, NDI değerlerinin asbeste maruz kalanlara göre daha büyük olduğu saptandı.

Hart vd tarafından (1992)'de *Chinese Hamster Over* hücrelerinde, Hestenberk vd (1987)'de ratlarda trakea epitelyum hücrelerinde, Wydler vd (1988)'de ratlarda ve Dong vd (1994)'te ratlarda plevral mezotelyal hücrelerde krizotil mineraline maruz kalan fibroblastlarda Mitotik İndeks (MI)'in azaldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada, asbeste maruz kalan grupta MI anlamlı bir azalma gözlemlendi. Bu bulgular daha önceki araştırmalarla uyumlu bulundu.

Asbestin; krizotil, aktinolit, tremolit, antofillit, krokidolit ve amosit minerallerin etkisi altında kalan insanlarda mide ve pankreas kanserlerinden ölüm oranının bu minerallerin etkisine maruz kalmayanlardan daha fazla olduğu bildirilmiştir (Alguacil J vd 2003). Diğer bir araştırmada; ortalama yıllık mezotelyoma insidans hızının, çevresel beyaz asbest teması olan köylülerde benzer temas oranlarına rağmen, dünyadaki bilinen insidans hızlarıyla karşılaştırdıklarında erkeklerde 88,3 kat, kadınlarda ise 799 kat gibi oldukça yüksek oranlar bildirmişlerdir (Metintaş S vd 2002). Bu çalışmada kanser nedeniyle ölüm oranları araştırılmadı ama çalışma sırasında bazı kişiler kanserden kaybedildi.

Thierens H vd (1996), sigara içmenin MN üzerinde önemli etkisi olmadığını rapor ederek diğer bulgularla çelişkiye neden olmuşlardır. Bunun aksine Rom vd (1998)'nin yaptığı çalışmada; asbest maruziyeti ve sigara içimi birlikteliği akciğer kanseri riskini sinerjistik etkileriyle daha da arttırdığı bildirilmektedir. Hiç sigara içmeyen ve endüstriyel ilişkisi olmayan kişilerde akciğer kanser riski 1 kabul edilirse, bu oran günde 20 sigara içenlerde 45'e, hem sigara içen ve hem de asbest tozu

soluyanlarda ise 92 katına çıkmaktadır (<http://www.mesothelioma-tr.org/ulusal/asbest2.html>). Bu araştırmada hasta ve kontrol grubundaki kişiler sigara ve alkol kullanmamaktadır. Bu nedenle sigara içenler ile MN değerleri arasında bir karşılaştırma yapılamadı. Ancak asbeste maruz kalan kişilerde geçmişte sigara içme öyküsü vardır.

Yapılan bazı çalışmalarda fiziksel ekzersizlerin MN sıklığını azalttığı bilinirken (Huang P vd 2009, Stefanie R vd 2008), başka bir çalışmada aşırı ekzersiz yapan sağlıklı kişilerde MN sıklığında artış olduğu ve bu etkilerin ekzersiz sonrası ilk 24 saatte gözlenebileceği belirtilmiştir (Schiff C vd 1997 ve Umegaki K vd 1998). Bu araştırmada her iki grupta da düzenli ekzersiz yapan kişiler saptanmadı.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Asbeste maruz kalan kadın ve erkekler kendi aralarında; yaş, MN değeri, NDI, MI ve metafaz sayısı bakımından karşılaştırıldığında fark bulunmadı Aynı şekilde kontrol grubundaki kadın ve erkekler arasında da fark saptanmadı. Ancak iki grup arasında MN, NDI, MI ve Metafaz sayısı bakımından fark vardı. Mikronukleus sayısı asbeste maruz kalan grupta arttı. Asbeste maruz kalan kişilerde NDI, MI ve Metafaz sayılarında kontrole göre azalma saptandı. Bu sonuçlar asbestin genotoksik etkisini destekler nitelikteydi.

Bölge halkının geç yaşlara kadar çiftçilikle uğraşmaları ve geçmişteki uzun maruziyet MN oluşumun ve artışının başlıca sebebi olabilir. Ayrıca bu kişilerin çoğunda yüksek tansiyon ve şeker hastalığı da bulunmaktadır. Çalışmamızda hasta ya da kontrol grubundaki kişiler sigara ve alkol kullanmamaktadır bu yüzden sigara içenler ile MN değerleri arasında bir karşılaştırma yapılamamıştır.

Denizli ili Bekilli-Süller civarında yaşayan halk; asbesti, artık halı dokumacılığında, badana ve pudra olarak kullanmasa da bazı evlerde hala sıva olarak bulunmaktadır. Asbest kullanımı yasaklansa da önümüzdeki birkaç yıl için geçmişteki maruziyetten dolayı hastalık ve ölümler görülebilir.

Ülkemizde geniş yayılıma sahip asbest oluşumlarının, genotoksik etkileri ve dolayısıyla toplum sağlığı açısından olası riskleri öngörülmele birlikte bu konudaki araştırmalar sınırlı sayıdadır. Ancak yine de asbest kullanımının tekstil vb. alanlarda yasaklanmış olması, artık asbestli toprakların evlerde badana malzemesi olarak kullanılmaması, eskiden olduğu gibi şimdi evlerin hem alt hem de üst katlarında tabanların ve tavanların tahta ile döşenip üzeri asbestli toprak sıvanmaması, çevredeki asbest liflerinin azalmış olması, hem kadınlarda hem de erkeklerde gelecekte plevral hastalıklara yakalanma oranının giderek azalacağını düşündürmektedir. Tüm bunların yanı sıra ülkemizdeki çevresel asbestin geniş yayılımı nedeniyle asbeste bağlı plevral hastalıklar için bazı önlemler alınmalıdır. Örneğin;

- Asbeste bağlı hastalıklar konusunda halk ve hekimler özel olarak eğitilmelidir.
- Asbest bulunan yerleşim yerleri saptanmalı, asbestli toprağın halk tarafından kullanılması engellenmeli ve hatta yerleşim yerleri değiştirilmelidir.
- Asbestli toprakla sıvanmış ya da badana yapılmış evlerin duvarları farklı bir boya ile yeniden boyanmalıdır.
- Plevral hastalıklar, genotoksik etkileşimler, mezotelyoma riski taşıyanlar belirlenmeli ve bunlar yakından izlenmelidir.

7. KAYNAKLAR

- Akkurt İ. (2006) İnorganik tozlara bağlı akciğer hastalıkları. Synopsis of diseases of the chest, ed: **Türktaş H. Güneş Kitabevi Ltd. Şti.** 3. baskı. Ankara, p. 714-743.
- Alguacil, J., Porta, M., Kauppinen, T., et al. (2003). Occupational exposure to dyes, metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and other agents and K-ras activation in human exocrine pancreatic cancer. **Int J Cancer.**, 107:635-641.
- Alvarenga, T. A., Andersen, M. L., Ribeiro, D. A., Araujo, P., Hirotsu, C., Costa, J. L., Battisti, M. C. and Tufik, S (2010). Single exposure to cocaine or ecstasy induces DNA damage in brain and other organs of mice. **Addict. Biol.**, 15, 96–99.
- American Thoracic Society (2004). Diagnosis and initial management of nonmalignant diseases related to asbestos. **Am J Respir Crit Care Med.**, 170(6):691-715.
- Arpaz, S., Sevinç, C., Uçan, E.S., ve ark. (1999). Horasanlı Köylülerinde çevresel maruziyete bağlı plevral kalsifikasyon sıklığı. **Solunum Hastalıkları**, 10:159-162.
- Atabey, E. (2005) Tıbbi Jeoloji. **TMMOB Jeoloji Mühendisleri Odası Yayınları**, No:88, 194 s., Ankara.
- Atabey E. (2009). Türkiye’de Asbest, Eriyonit, Kuvars ve diğer mineral tozları ve etkileri. Maden tetkik ve arama genel müdürlüğü. **Ares Basım Reklam Prodüksiyon Hizmetleri San. Tic. Ltd. Şti.**, Ankara, s;7.
- Ates, G., Yildiz, T., Akyildiz, L. et al. (2010). Environmental asbestos-related pleural plaque in southeast of Turkey. **Archives of Environmental & Occupational Health.**1:34-37.
- Ault, JG., Cole, RW., Jensen, CG., Jensen, LCW., Bachert, LA., et al. (1995). Behavior of crocidolite asbestos during mitosis in living vertebrate lung epithelial cells. **Cancer Res.**, 55: 792-798.
- Balaseem, AN. and Ali AS. (1991) Establishment of dose-response relationships between doses of CS-317 γ -rays and frequencies of micronuclei in human peripheral blood. **Mutat Res.**, 259:133-138.
- Balcı, K. (1993). Göğüs Hastalıkları. **Atlas Kitabevi**, Konya, 575-593.
- Baran M. (2004). Çevresel olarak asbeste maruz kalan kişilerin lenfositlerindeki sitogenetik değişikliklerin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, **Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Kayseri, 52 sy.
- Barett, JC., Lamb, PW., Wiseman, RW. (1989). Multiple mechanisms for the carcinogenic effects of asbestos and other mineral fibers. **Environ Health Perspect** , 81: 81-89.

- Baris, Yİ., Sahin, AA., Özesmi, M., et al. (1978) An outbreak of pleural mesothelioma and chronic fibrosing pleurisy in the village of Karain/ Orgup in Anatolia. *Thorax.*, 33:181-92.
- Baris, Yİ., Artvinli, M., Şahin, AA., (1979). Environmental mesothelioma in Turkey. *Ann N.Y. Acad Sci* ., 330:423-32
- Barış, Yİ. (1987). Asbestos and erionite related chest diseases. *Semih Ofset*, Ankara, 36-102.
- Barış, Yİ., Bilir, N., Artvinli, M., Şahin, AA., Kalyoncu, F., Sebastien, F. (1988). An epidemiological study in an Anatolian village enviromentally exposed to tremolite asbestos. *Br J Ind Med.*, 45:838-840.
- Barış, Yİ., Karakoca, Y., Demir, U. (1995). Çevresel ve mesleksel akciğer hastalıkları. Ed: Barış Yİ. Solunum Hastalıkları Temel Yaklaşım. *Kent Matbaa*, Ankara, 247-276.
- Barış, Yİ., Karakoca, Y., Demir, U. (1998). Çevresel ve mesleksel akciğer hastalıkları. In: Barış, ed. *Solunum Hastalıkları*. 3rd ed. Atlas Kitapçılık, Ankara, 251-280.
- Bergamo, L. and Murer, B. (2010). Occupational toxicology of asbestos-related malignancies. *Clinical Toxicology*. 48:485– 496.
- Berman, DW., Crump, KS., Chatfield, EJ., Davis Jm., Jones, AD. (1995). The sizes, shapes, and mineralogy of asbestos structures that induce lung tumors or mesothelioma in AF/HAN rats following inhalation. *Risk Anal*, 15:181-95.
- Blount, BC., Mack, MM., Wehr, CM., MacGregor, JT., Hiatt, RA., Wang, G., Wickramasinghe SN, Everson RB, Ames B (1997). Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage, Proc. Natl. *Acad. Sci.* U.S.A. 94, 3290–3295.
- Boffetta, P. (1998). Health effects of asbestos exposure in humans:a quantitative assessment. *Med Lav.*, 89:471-480.
- Catena, C., Conti, D., Villani, P., Nastasia, R., Archliei, R., Righi, E. (1994). Micronuclei and 3 AB index in human and canine lymphocytes after in vitro X-irradiation. *Mutation Res.*, 312: 1-8.
- Chapman, SJ., Cookson, WO., Musk, AW., Lee, YC. (2003). Benign asbestos pleural diseases. Curr opin *Pulm Med.*, 9:266-271.
- Chang, W. P., Lee, S., Tu, J. and Hseu, S. (1996) Increased micronucleus formation in nurses with occupational nitrous oxide exposure in operating theaters. *Environ. Mol. Mutagen.*, 27, 93–97.
- Countryman, P. I. and Heddle, J.A. (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 41, 321–332.

- Cruz, AD., McArthur, AG., Silva, CC., Curado, MP., Glickman, BW. (1994). Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiania (Brazil) radiological accident. *Mutat Res* , 313:57-68.
- Çelik, R. (1967) Denizli Çal İlçesindeki Asbest zuhurları etüdü, MTA Derleme, Rapor no: 4234 (*Yayınlanmamıştır*), Ankara.
- Davis, JM., Bolton, RE., Miller, BG., Niven, K. (1991.) Mesothelioma dose response following intraperitoneal injection of mineral fibres. *Int JExp Pathol*, 72:263-74.
- Demiroğlu, H. (1988). Hazards of white asbestos. *Lancet* , 352: 322-323.
- Demirel, S., Çora, T., Acar, A., Acar, H., Çalışkan, Ü., Öner, AF., et al. (1993). Evaluation of the effects of photo therapy on chromosomes with sister chromatid exchange and micronucleus method. *Tr J Medical Sci* 1993;17:109-16.
- Demirel, S., Zamani, A.G. (2002). Mikronucleus tekniği ve kullanım alanları, *Genel Tıp Dergisi*, 12:123-127.
- Dogan, AU., Dogan, M., Emri, S. (2005). Erionite. 2nd ed. In: Wexler P, editor. Encyclopedia of toxicology. *Oxford: Elsevier*; 237-41.
- Dogan, M. (2002). Environmental pulmonary health problems related to mineral dusts: Examples from central Anatolia, Turkey, *Environmental Geology*, 41/5, 511-579.
- Dong H, Buard A, Renier A, Levy F, Saint-Etienne L, Janurand MC.(1994) Role of oxygen derivatives in the cytotoxicity and DNA damage produced by asbestos on rat pleural mesothelial cells in vitro. *Carcinogenesis*; 15: 1251-1255.
- Dopp, E., Saedler, J., Stoper, H., Weiss, DG., Schiffmann, D. (1995). Mitotic disturbances and micronucleus induction in Syrian Hamster Embryo (SHE) fibroblast cells caused by different types of asbestos fibers. *Environ Health Perspect*, 103: 268-271.
- Dopp, E., Schiffmann, D. (1998). Analysis of chromosomal alterations induced by asbestos and ceramic fibers. *Toxicology Letters*, 96,97: 155-162.
- Dopp, E., Yadav, S., Ansari, FA., Bhattacharya, K., Recklinghausen, U., Rauen, U., Rödelberger, K., Shokouhi, B., Geh, S., Rahman, Q. (2005). ROS-mediated genotoxicity of asbestos-cement in mammalian lung cells *in vitro*. *Particle and Fibre Toxicology*, 1-9.
- Dönmez-Altuntaş, H., Baran, M., Oymak, FS., Hamurcu, Z., İmamoğlu, N., Özesmi, M., Demirtaş, H. (2007). Investigation of micronucleus frequencies in lymphocytes of inhabitants environmentally exposed to chrysotile asbestos. *International Journal of Environmental Health Research*, 17: 45-51.
- Dusinska, M., Collins, A., Kazimirova, A., et al. (2004). Genotoxic effects of Asbestos in Humans. *Mutat Res.*, 553:91-102.

- Eastmond, DA. and Tucker, JD. (1989). Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an anti-kinetochore antibody. *Environ Mol. Mutagenesis*, 13: 34-43.
- Elhajouji, A., Tibaldi, F., Kirsch-Volders, M. (1997) Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human lymphocytes, *Mutagenesis*, 12, 133–140.
- Emri, S. and Demir, A.U. (2004). Malignant pleural mesothelioma in Turkey, 2000-2002, *Lung Cancer*, 45, 17-20.
- Erbay Polat, G., Şahin, N., Yılmaz, U., Utkaner, G., Yalnız, E., Soy, Ö. (2002) Diffüz plevral hastalıkların ayırıcı tanısında bilgisayarlı tomografi. *Toraks Dergisi*, 3(2):138-145.
- Evyapan, B. F., Özpınar, Y.&Egri, M. (2008). Denizli ilinde çevresel asbest maruziyeti ve solunum sistemi etkileri, (*TUBITAK 107S270 (SBAG-3763)*). Denizli, p.145.
- Fenech, M., Morley, A. (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes. Effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutation Research*, 161: 193-199.
- Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*, 285:35-44.
- Fenech, M. and Rinaldi, J. (1994) The relationship between micronuclei in human lymphocytes and plasma levels of vitamin C, vitamin E, vitamin B12 and folic acid. *Carcinogenesis*, 15, 1405–1411.
- Fenech, M. and Rinaldi, J. (1995) A comparison of lymphocyte micronuclei and plasma micronutrients in vegetarians and non-vegetarians. *Carcinogenesis*, 16, 223–230.
- Fenech, M. (1997) "The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method" Special issue of Mutation Research on the In vitro micronucleus test, *Mutation Research*, 392: 11-18
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E., Bonassi, S. (1999). The Human MicroNucleus Project-An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research*, 428, 271-283.
- Fenech, M. (2002). Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discov Today*, 7:1128-37.
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 1084-1104.

- Fenech, M. and Bonassi S. (2011) The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* vol. 26 no. 1 pp. 43–49.
- Fraser, RG., Pare, JAP., Pare, PD., Fraser, RS., Genereux, GP. (1990). Pleuropulmonary disease caused by inhalation of inorganic dust (pleumoconiosis). *Diagnosis of Disease of the Chest*. Third Edition, WB Saunders Company, Philadelphia, USA, 2316-2354.
- Gaines, R., et al. (1997) Dana's New Mineralogy. *Ohn Wiley and Sons*, New York.
- Gibbs, AR., Wagner, JC. (1992) Dust Diseases, Environmental Pathology. Ün: Mc Gee JOOD, Isaacson PG, Wright NA, Eds, Oxford Textbook of Pathology, Vol 1, *Oxford: Oxford University Press*, 719-725.
- Hansen, J., de Klerk, NH., Musk, AW., Hobbs, MS. (1998) Environmental exposure to crocidolite and mesothelioma: exposure-response relationships. *Am J Respir Crit Care Med*, 157:69-75.
- Hart GA, Newman MM, Bunn WB, Hestenberg TW. (1992). Cytotoxicity of refractory ceramic fibers to Chinese hamster ovary cells in culture. *Toxicol In Vitro.*; 6: 317-326.
- Hartgerink, JD., Beniash, E., Stupp, SI. (2001) Self-assembly and mineralization of peptideamphiphile nanofibers. *Science*, 294:1684- 1688.
- Heddle, JA., Hite, M., Krikhart, B., Mavournin, K., MacGregor, JT., et al. (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. *Mutation Research*, 123: 61-118.
- Hestenberg, TW., Butterick, CJ., Oshimura, M., Brody, AR., Barrett, JC. (1986) Role of phagocytosis in Syrian hamster cell transformation and cytogenetic effects induced by asbestos and short and long glass fibers. *Cancer Res.*, 46: 5795-5799.
- Hillerdal, G. (2002) Asbestos-related pleural disease including diffuse malignant mesothelioma. *Eur Respir Monogr.*, 22:189–203.
- Högstedt, B., Karlsson, A. (1985) The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. *Mutat Res.*, 156:229-32.
- Hume, LA., Rimstidt, JD. (1992). The biodurability of chrysotile asbestos. *Am Mineral*, 77:1125-1128.
- Huang, P., Huang, B., Weng, H., Nakayama, K. and Morimoto, K. (2009) Effects of lifestyle on micronuclei frequency in human lymphocytes in Japanese hard-metal workers. *Prev. Med*, 48, 383–388.
- Ishikawa, H., Ishikawa, T., Yamamoto, H., Fukao, A. and Yokoyama, K. (2007) Genotoxic effects of alcohol in human peripheral lymphocytes modulated by ADH1B and ALDH2 gene polymorphisms. *Mutation Research*, 615,134–142.

- Jagetia, GC., Jayakrishnan, A., Fernandes, D., Vidyasagar, MS. (2001) Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. *Mutation Research*, 491:9-16.
- Jamrozik, E., de Klerk, N., Musk, A. (2011) Asbestos-related Disease. *Internal Medicine Journal*. 372-380..
- Karakoca, Y., Emri, S., Cangir, AK., Barış, Yİ. (1997) Environmental pleural plaques due to asbestos and fibrous zeolite exposure in Turkey. *Indoor Built Environ*, 6:100-105.
- Kazimirova, A., Barancokova, M., Dzupinkova Z., Wsolova L., Dusinska M. (2009) Micronuclei and chromosomal aberrations, important markers of ageing: Possible association with *XPC* and *XPD* polymorphisms, *Mutation Research*, 661, 35-40.
- Keshava, C., Keshava, N., Whong, W-Z., Nath, J., Ong, T-M. (1997/98) Inhibition of methotrexate-Induced chromosomal damage by vanillin and chlorophyllin in V79 cells. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 17: 313-326.
- Keyf, İ.A., Kibaroglu, E., Erdoğan, Y., Yılmaz, Ü. (1994) Çevresel asbestozisin etkin olduğu yeni bir yöre: Edige. *Solunum Hastalıkları Dergisi*, 5:310-317.
- Kılıçaslan Z. (2002) Mesleki ve çevresel akciğer hastalıkları. Akciğer hastalıkları, ed: Arseven O, *Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti.*, İstanbul, p: 371-379.
- Kirsh-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, J.M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surreles, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A. (2003) Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutation Research*, 540, 153-163.
- Köksal, G., Dalcı, DÖ., Pala, FS. (1996) Micronuclei human lymphocytes: The Co-60 gamma-ray dose-response. *Mutation Research*, 359: 151-157.
- Lee, SH., Shin, M., Lee, KJ., Lee, SY., Lee, JT., Lee, YH. (1999) Frequency of sister chromatid exchange in chrysotileexposed workers. *Toxicol Letters*, 108:315-319.
- Li, J. H., Hu, H. C., Chen, W. B. and Lin, S. K. (2003) Genetic toxicity of methamphetamine in vitro and in human abusers. *Environ. Mol. Mutagenesis*, 42, 233-242.
- Light, RW. (1995) Malignant and benign mesotheliomas. Pleural diseases. Third Edition, *A Warley Company*, USA, 117-128.
- Littlefield, GL. AM., Saye and EL. (1989) Frome Comparison of dose-response parameters for radiation-induced acentric fragments and micronuclei observed in cytokinesis-arrested lymphocytes. *Mutagenesis*, 4: 265-270.
- Lohani, M., Dopp, E., Weiss, DG., Schiffman, D., Rahman, Q. (2000) Kerosene soot genotoxicity: enhanced effect upon co-exposure with chrysotile asbestos in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Toxicology Letters*, 114: 111-116.

- Lu J., Keane MJ., Ong T., Wallace WE. (1994) In vitro genotoxicity studies of chrysotile asbestos fibres dispersed in simulated pulmonary surfactant, *Mutation Research*, 320,253-9.
- Luo, S., Liu, X., Mu, S., et al. (2003) Asbestos related diseases from environmental exposure to crocidolite in Da-yao, China. I. Review of exposure and epidemiological data. *Occup Environ Med.*, 60:35–42.
- Metintaş, Ş., Metintaş, M., Üçgün I., and Öner, U. (2002) Malignant mesothelioma due to environmental exposure to asbestos. Follow- Up of a Turkish cohort living in a rural, *Area Chest*, 122;2224-2229.
- Migliore, L., Nieri, M., Amodio, S., Loprieno, N. (1989) The human lymphocyte micronucleus assay: a comparison between whole-blood and separated-lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 227:167-172.
- Miles, SE., Sandrini, A., Johnson, AR. and Yates, DH. (2008) Clinical consequences of asbestos-related diffuse pleural thickening: A review. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 3:20.
- Möller, M., Stoper, H., Haring, M., et al. (1995). Genotoxicity induced by furocumarin hydroperoxides in mammalian cells upon UVA irradiation. *Biochem Biophys Res Com.*, 216 (2): 663-701.
- Mutlu, B. (2001) Plevra Tümörleri. Göğüs Hastalıkları. *İstanbul Üniversitesi Yayınları*, İstanbul, 2:1003.
- Müller, WU., Nüsse, M., Miller, BM., Slavotinek, A., Viaggi, S., Streffer, C. (1996) Micronuclei: a biological indicator of radiation damage. *Mutat Res.*, 366: 163-169.
- Müller, KM., Fischer, M. (2000) Malignant pleural mesotheliomas: An environmental health risk in southeast Turkey. *Respiration*, 67: 608-609.
- Newhouse, ML., Thompson, H. (1965) Mesothelioma of pleural and peritoneum following exposure to asbestos in the London area. *Br J Ind Med.*, 22:261-8.
- Nishimura, SL., Broaddus, VC. (1998) Asbestos-induced pleural disease. *Clin Chest Med.*, 19: 311–329.
- Niklinski J, Niklinska W, Chyczewska E., et al. (2004). The epidemiology of asbestos-related diseases. *Lung Cancer*, 45, 7-15.
- Oshimura, M., Hestenberg, TW., Tsutsui, T., Barrett, JC. (1984) Correlation of asbestos-induced cytogenetic effects with cell transformation of Syrian hamster embryo cells in culture. *Cancer Res.*, 44: 5017.
- Özesmi, M., Demir, R., Topçu, OF., Göktepe, A. (1990) Ereğli köyü (Pınarbaşı/Kayseri) hakkında plevral kalsifikasyon sıklığı ve sebebi. *Tüberküloz ve Toraks*, 38:205-209.

- Özkurt, S., Kiter, G., Başer, S. ve ark. (2003) Yukarıboğaz köylülerinde kalsifik plevral plak sıklığı, *Solunum*, 5:25-29.
- Özpınar Y, Eğri M. (2009). As geological, mineralogical and petrographical investigation of tremolite asbestos occurrences around the Çal, Süller and Bekilli (Denizli, Turkey) and evaluation from cancer risk assessment of these occurrences, *Jeoloji Kurultayı*, Ankara; 62.
- Papapaulou, P., Vlastos, D., Stephanou, G., Demopoulos, N.A. (2001) Linuron cytogenetic activity on human lymphocytes treated in vitro. Evaluation of clastogenic and aneugenic potential using cytokinesis block micronucleus assay in combination with fluorescence in situ hybridization (FISH), *Fresenius Environmental Bulletin*, 10(5), 431-437.
- Poser I, Rahman Q, Lohani M, Yadav S, Becker HH, Weiss DG, Schiffmann D, Dopp E. (2004). Modulation of genotoxic effects in asbestosexposed primary human mesothelial cells by radical scavengers, metal chelators and a glutathione precursor. *Mutation Research*, 11:559(1-2):19-27.
- Rahman Q, Dopp E, Lohani M, Schiffmann D. (2000). Occupational and environmental factors enhancing the genotoxicity of asbestos. *Inhal Toxicol*, 12:157-165.
- Ramalho, A., Sunjevaric, I., Natarajan, AT. (1998) Use of the frequencies of micronuclei as quantitative indicators of X-ray- induced chromosomal aberrations in human peripheral blood lymphocyte: Comparison of two methods. *Mutation Research*, 207: 141-146.
- Randa. A.E., Schabath, M.B., Etzel, C.Z., Lopez, M.L., Franklin, J.D., Spitz, M.R. (2006) Cytokinesis-Blocked micronucleus assay as a novel biomarker for lung cancer risk. *Cancer Res.*, 66: (12).
- Ramazzini, C. (2010) Asbestos Is Still With Us: Repeat call for a universal ban. *American Journal of Industrial Medicine*. 10.1002/ajim.20892.
- Richard, F., Muleris, M., Dutrillaux, B. (1994) The frequency of micronuclei with X chromosome increases with age in human females. *Mutation Research*, 316:1-7.
- Robledo R, Mossman B (1999). Cellular and molecular mechanisms of asbestos-induced fibrosis. *Journal of Cellular Physiology*, 180: 158-166.
- Rom, WN. (1998) Asbestos related lung disease. In: Fishman AP, Elias JA, Fishman JA, Grippi MA, Kaiser LR, Senior RM, ds. *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders*, 3rd Ed., New York: Mc Graw Hill, 877-891.
- Rom WN. (2008) Asbestos-Related Lung Disease. In: Fishman's pulmonary diseases and disorders. Fourth edition. Edts: Fishman AP, Elias JA, Fishman JA, Grippi MA, Senior RM, and Pack AI. *McGraw Hill Medical*, Volume One, Part V, Chapter 55:943-959.

- Ruosaari TS., Nymark P.E.H., Aavikko M.M., Kettunen E., Knuutila S., Hollme'n J., Norppa H. and Anttila S.L. (2008). Aberrations of chromosome 19 in asbestos-associated lung cancer and in asbestos-induced micronuclei of bronchial epithelial cells in vitro. *Carcinogenesis vol.*, 29 no.5 pp.913–917.
- Serrano-Garcia, L. and Montero-Montoya, R. (2001) Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environ. Mol. Mutagenesis*, 38, 38–45.
- Selikoff I. (1968) Occurrence of pleural calcification among asbestos insulation workers. *Ann NY Acad Sci*, 132:351-364.
- Seven, A., Seyfikli, Z., Topçu, S., Sümer, H., Güzelimdağ, ÖF. (2000) Sivas ilinde bir köyde çevresel asbestin etkilerinin araştırılması. *İzmir Göğüs Hastanesi Dergisi*, 14:16-21.
- Schmid, W. (1975) The micronucleus test. *Mutation Research*, 31:9-15.
- Schiffel, C., Zieres, C. and Zankl, H. (1997) Exhaustive physical exercise increases frequency of micronuclei. *Mutation Research*, 389, 243–246.
- Stich, HF., Stich, W., Parida, BB. (1982) Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer: Betel quid chewers. *Cancer Letters*, 17:125-134.
- Statement of the American Thoracic Society. (1986) The diagnosis of non malignant diseases related to asbestos. *Am Rev Respir Dis.*, 1986; 134: 363–368.
- Stefanie, R., Oliver, N., Veronika, E., Siegfried, K. and Karl-Heinz, W. (2008) No acute and persistent DNA damage after an Ironman triathlon. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 17, 1913–1919.
- Surrales, J., Xamena, N., Creus, A., Morcos, R. (1995) The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair. *Mutation Research*, 341(12): 43-59.
- Şenyigit A., Babayigit C. (2000). Gökirmak M., et al., Incidence of malignant pleural mesothelioma due to environmental asbestos fiber exposure in the southeast of Turkey, *Respiration*, 67, 610-4.
- Şenyigit, A., Coşkunsel, M., Topçu, F., Işık, R., Babayigit, C. (2000a) Malignant pleural mesothelioma: Evaluation of clinical, radiological and histological features in 136 cases. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, 48(1): 26-34.
- Şenyigit, A., Dalgıç A., Kavak O (2004). Asbestin sağlığa etkileri. *Dicle Tıp Dergisi*, CİLT 31, Sayı:4, (48-52).
- Temur, S. (1994) Endüstriyel ham maddeler, *Selçuk Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Yayınları*.

- Thierens H, Vral A, De Ridder L. A. (1996) cytogenetic study of radiological workers: effect of age, smoking and radiation burden on the micronucleus frequency. *Mutat Res.*, 360: 75-82.
- Tuğ T., Tuğ E. (2005). Asbest maruziyeti ve Malign Mezotelyama'da etiyopatogenez ve epidemiyolojik özellikler, Tümör supresör gen ilişkileri, *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 25, 436-44.
- Ulus E. and Yılmaz S (1975). Türkiye'de asbest envanteri. *MTA Enst. Yayınları*, MTA Enst. Matbaası, Ankara, No:157.
- Umegaki, K., Higuchi, M., Inoue, K. and Esashi, T (1998). Influence of one bout of intensive running on lymphocyte micronucleus frequencies in endurance-trained and untrained men. *Int. J. Sports Med.*, 19, 581-585.
- Umegaki K, İkegami S, Inoue K, et al. (1994). Beta-carotene prevents X-ray induction of micronuclei in human lymphocytes. *Am J Clinl Nutr.*, 59: 409-412.
- Uzun S. (2007) Sodyum hipoklorite maruz kalmış kişilerin lenfositlerindeki mikronükleus sıklığının araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, 50 sy.
- Vaglenov AK, Karadjov AG (1997). Micronucleus frequencies in bulgarian control population. *Central European Journal of Occupational And Enviromental Medicine*, 3 (3):187-194.
- Von Ledebur MM, Schmid W (1973). The micronucleus test: Methodological aspects. *Mutation Research*, 19:109-17.
- Wagner JC, Sleggs CA, Marchand P (1960). Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *Br J Ind Med.*, 17:260-71.
- West JB. Akciğer patofizyolojisi-temelleri. Çelikoğlu S (1994). *İ.Ü. Rektörlüğü Basımevi*, İstanbul, 143-157.
- Widel M, Kolosza Z, Jedrus S, Lukaszczyk B, Raczek-Zwierzycka K, Swierniak A (2001). Micronucleus assay in vivo provides significant prognostic information in human cervical carcinoma: The updated analysis. *Int J Radiat Biol.*, 77:631-6.
- Wydler M, Maier P, Zbinden G.(1998). Differential cytotoxic, growth-inhibiting and lipid peroxidative activities of four different asbestos fibers in vitro. *Toxicol In Vitro*; 2: 297-302.
- Yüksel M., Kalaycı N.G (2001). Göğüs Cerrahisi. *İstanbul Yayınları*, İstanbul, 372-373.
- Yazicioglu S (1976). Pleural calcification associated with exposure to chrysotile asbestos in southeast Turkey. *Chest*, 70:43-47.

Yazicioglu S, Oktem K, Ilcayto R et al. (1978). Association between Malignant Tumors of the Lungs and Pleurae and Asbestosis A Retrospective Study. *Chest*, 73:52-56.

Yazicioglu S, Ilcayto R, Balci K et al. (1980). Pleural calcification, pleural mesotheliomas, and bronchial cancers caused by tremolite dust. *Thorax*, 35:564–569.

Zijno A, Marcon F, Leopardi P, Salvatore G, Carere A, Crebelli R (1994). An assessment of the in vivo clastogenicity of erythrosine. *Fd Chem Toxic*, 32:159-63.

WEB_1. www.mesothelioma-tr.org/ulusal/asbest2.html (07.07.2010)

WEB_2. Bariş's web site. www.mesothelioma-tr.org/halk/halkicin.php (29.06.2011)

WEB_3. www.suller.bel.tr/index.php?cid=68 (17.03.2011)

WEB_4. www.bekilli.bel.tr/bekilli.asp?id=1&alt_id=5 (17.03.2011)

WEB_5. bsemiz.pamukkale.edu.tr/Yayinlar%C4%B1m_2007/B.I.a.5.pdf (20.06.2011)

WEB_6. www.isggm.gov.tr/htdoc (03.03.2011)

WEB_7. www.jmo.org.tr/resimler/ekler/34fdbf83b74c193_ek.pdf (21.02.2011)

WEB_8. ekutup.dpt.gov.tr/(23.02.2011)

WEB_9. ekutup.dpt.gov.tr/madencil/sanayiha/oik629.pdf (22. 05.210)

WEB_10. ershov-geomuz.narod.ru/sistemat.htm (29.06.2011)

WEB_11. www.ahmetrasimkucukusta.com/2010/01/23/yazilar/tip-yazilari/akciger-kanseri/asbest-onemli-bir-kansorejendir/ (06.04.2011)

8. ÖZGEÇMİŞ

13 Ekim 1986 tarihinde İzmir’de dünyaya gelen Meltem GÖVERCİN ilk ve orta öğrenimini Duğrallar İlköğretim Okulu’nda, lise öğrenimini ise Naci Şensoy Süper Lisesi’nde tamamladı. 2008 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nü bitirdi. 2009 yılının Eylül ayında Pamukkale Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı.