

ALÜMİNYUM SÜLFATIN İNSAN PERİFERAL KAN LENFOSİT KÜLTÜRLERİNDE MİKRONUKLEUS UYARIMI ÜZERİNE ETKİLERİ

Dr. Aynur ACAR*, Uzm. H. Gül DURAKBAŞI*, Dr. Ferhan PAYDAK*

*S. Ü. T. F. Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD

ÖZET

Mevcut çalışmada; geniş bir kullanım alanına sahip olan alüminyum sülfatın mutajenik etkilerini incelemek amacıyla 10 kız ve 10 erkek olgunun standart metodlarla hazırlanmış lenfosit kültürlerine 10, 20 ve 40 µg/ml konsantrasyonunda alüminyum sülfat solüsyonu ilave edilmiş ve değerler kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta kız ve erkek olguların kontrol ve alüminyum sülfat ile muamele edilmiş kültürlerinde gözlenen ortalama mikronukleus (MN) değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur ($P>0.05$). Toplam 20 olguda ise konsantrasyon gruplarında gözlenen ortalama MN değerlerinin, kontrol grubunda gözlenen ortalama MN değerinden önemli derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($P<0.005$).

Anahtar Kelimeler : Alüminyum mutajenitesi, mikronukleus.

SUMMARY

Effects of Aluminium Sulphate on Micronucleus Induction in Human Peripheral Blood Lymphocyte Cultures

In this study, aluminium sulphate solutions at 10, 20 and 40 µg/ml of the concentrations were added to the lymphocyte cultures from ten female and ten male subjects by standard protocols to examination the mutagenic effect of aluminium sulphate, have a wide usage. The obtained data were then compared to that of control group. Consequently, it was found that the difference between the mean micronucleus (MN) values in controls and aluminium sulphate-treated cultures from the female and male subjects was not to be statistically significant ($P>0.05$). At total twenty subjects, it was observed that the mean MN value from concentration groups are considerably higher than the mean MN value from control group ($P<0.005$).

Key Words : Aluminium mutagenicity, micronucleus.

GİRİŞ

Son yıllarda hızlı endüstrileşmeye paralel olarak çevresel kirliliğin giderek artması, güçlü mutajenik ve teratojenik etkiye sahip metal ve kimyasallara olan ilgiyi artırmıştır. Bu hızlı endüstrileşme sürecinde hem endüstride hem de günlük hayatta kullanımı giderek artan metallere birisi de alüminyum ve bileşenleridir. Diyetle günlük alüminyum alımı, 2-50 mg arasında değişmekle bir-

likte bu miktar tıbbi ve çevresel şartların etkisiyle daha da artabilmektedir (1,2). Alüminyum; yemek kaplarının yüzeylerinin aşınması ile yemek kaplarından, tıpta tedavi amacıyla kullanılan ilaç tasitlerden (2), temizlemede topaklaştırıcı ajan olarak alüminyum sülfatın kullanıldığı şehir sularından (4), intravenöz sıvı verilen hastalarda matürelerde intavenöz sıvıdan (2), diyaliz tedavisi gören hastalarda diyaliz sıvısından (1, 2, 5, 6) alınabilmektedir. Ancak vücutta alüminyumun

rikiminin en önemli iki kaynağı olarak alüminyum içeren diyaliz sıvısı ile oral olarak alınan alüminyum içerikli antasitler gösterilebilir (7).

Dokularda alüminyum birikiminin çeşitli zararlı sonuçları tanımlanmıştır. Alüminyum, başta nörodejeneratif hastalıklar olmak üzere birçok hastalığın patogeneğinde etkin role sahiptir. Uzun süre diyaliz tedavisi gören böbrek yetmezliği hastalarında ortaya çıkan ensefalopati ve demansdan çeşme suyu ile hazırlanan diyaliz sıvısından geçip beyinde biriken alüminyumun sorumlu olduğu tespit edilmiştir (1, 4, 5, 7, 8). Ayrıca alüminyum, mikrositik hipokromik anemide (4, 9), oynadığı rol tartışmalı olmakla birlikte Alzheimer hastalığında (8, 10, 11, 12), osteomalasi (13, 14) ve osteodistrofi (4, 15, 16) gibi metabolik kemik hastalıklarında da işe karışmaktadır.

Alüminyumun mutajenite ve karsinojenitesini araştırmaya yönelik çalışmalar sonucunda ise alüminyum tuzlarının rat kemik iliği kromozomlarında kromatid kırıklarını, disentrik kromozomları ve resiprokal translokasyonları uyardığı tespit edilmiştir (17). Benzer şekilde alüminyum sülfatın insan lökosit kromozomlarında gap, kırık, translokasyon ve disentrikleri kapsayan kromozomal aberasyonlar ile kardeş kromatid değişimi (KKD) ve MN artışlarına yol açtığı gözlenmiştir (18). Bitkilerde yapılan çalışmalarda ise alüminyumun mitodepressif bir etkiye sahip olduğu, DNA sentezini inhibe ederek kök uzamasını durdurduğu (3, 19), DNA'ya bağlanarak kromatin yapısında kondensasyona ve stabilizasyona yol açtığı görülmüştür (20).

Mevcut çalışmada da alüminyum sülfatın in vitro mutajenik etkileri, mutajenite sonucu oluşan sitogenetik harabiyetin hassas göstergelerinden biri olan MN metodu ile araştırılmıştır. Böylece yaygın kullanım alanı olan alüminyum ve bileşenlerinin mutajenitesinin değerlendirilmesine yönelik çalışmalara katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOD

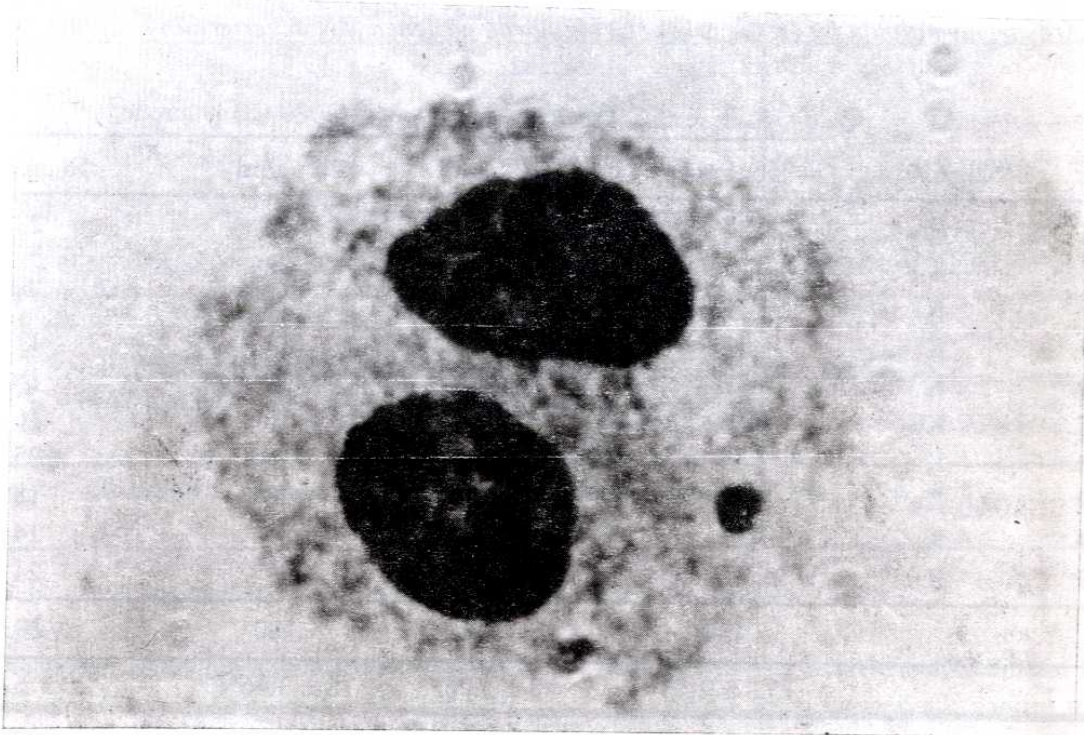
Yaşları 18-25 arasında değişen, sağlıklı, bilinen hiçbir mutajene maruz kalmamış 10 kız ve 10 erkekte heparinlenmiş enjektör ile venöz kan örnekleri alındı. Herbir olgu için, biri kontrol olmak

üzere, standart yöntemlerle dört lenfosit kültürü hazırlandı. Deney tüplerine 10, 20 ve 40 µg/ml konsantrasyonlarda alüminyum sülfat solüsyonu ilave edildi. Kültürler 37 °C'de 72 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. MN'leri gözleyebilmek için Fenech ve Morley'in Sitokinezi Blok (Cytokinesis Block, CB) Metodu çeşitli modifikasyonlarla uygulandı. Buna göre inkübasyonun 44. saatinde her bir deney tüpüne kendi başına MN uyarmayan, çift çekirdekli hücre oluşumunu ve sayımını kolaylaştıran optimum Cytochalasin B (Cyt-B) konsantrasyonu olarak bildirilen (21, 22) 3.0 µg/ml Cyt-B (Sigma) ilave edildi. Işığın fotolitik etkisinden korumak amacıyla kültür tüpleri alüminyum folyolara sarılıp kültür periyodunu tamamlamak üzere yeniden 37 °C'lik etüve kaldırıldı. Üreme periyodunun sonunda kültürlerden hazırlanan preparatlar hemen % 5'lik Giemsa ile 5-7 dk. boyandı ve aynı kişi tarafından analiz edildi. Analiz sırasında her bir olguda kontrol ve konsantrasyon gruplarının herbiri için ortalama 2000 sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücre sayıldı. Böylece her bir olgu için 8000 ve 20 olgunun tamamı için ise toplam 160.000 hücre değerlendirilmiş oldu. Huddle ve arkadaşlarının kullandığı kriterlere göre tanımlanan MN'ler 1000 x büyütmede incelendi ve hücre sınırlarının korunmuş olmasına dikkat edildi (Resim 1).

BULGULAR

Çalışma kapsamına alınan olguların yaşları, cinsiyetleri ve gözlenen MN değerleri Tablo 1'de verilmiştir. 10 kız olgunun hücre kültürlerinde kontrol, 10, 20 ve 40 µg/ml'lik konsantrasyon gruplarında gözlenen ortalama MN sayısı sırasıyla; 15.8±2.53, 18±4.06, 18±3.46 ve 20.3±4.42 olarak saptanırken 10 erkek olguda ise sırasıyla 16±3.27, 18.5±3.37, 18.9±3.67 ve 21.1±4.41 olarak bulunmuştur. Kız olguların kontrol ve konsantrasyon grupları, erkek olguların kontrol ve konsantrasyon grupları ile ayrı ayrı karşılaştırıldığında kız ve erkek olgular arasında MN değerleri açısından istatistiksel olarak önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir (P>0.05) (Tablo 1).

20 olgunun tamamı dikkate alındığında; kontrol, 10,20 ve 40 µg/ml'lik konsantrasyon grubu hücrelerinde gözlenen ortalama MN değerleri sırasıyla



Resim 1. Sitokinezi bloke edilmiş MN'li hücre.

15.9±2.85, 18.25±3.64, 18.45±3.5 ve 20.7±4.32 olarak tespit edilmiştir (Tablo 1). Kontrol gurubu hücrelerinde gözlenen ortalama MN değeri ile herbir konsantrasyon grubu hücrelerinin ortalama MN değerleri karşılaştırıldığında, aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur (P<0.005) (Tablo 2). Konsantrasyon gruplarında gözlenen ortalama MN değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında; 10 ile 20 µg/ml'lik konsantrasyon grubu hücrelerine ait ortalama MN değerleri arasındaki farkın istatistiksel olarak önem taşımadığı bulunmuştur (P>0.05). Ancak 40 µg/ml'lik konsantrasyon grubu hücrelerine ait ortalama MN değerinin hem 10 µg/ml'lik ve hem de 20 µg/ml'lik konsantrasyon grubu hücrelerine ait ortalama MN değerine göre önemli bir artış gösterdiği saptanmıştır (P<0.005) (Tablo 2).

Sonuç olarak, yapılan istatistiksel analizler neticesinde cinsiyetin MN uyarımında önemli bir etken olmadığı anlaşılmıştır. Ayrıca 10, 20 ve 40 µg/ml'lik konsantrasyon gruplarının her üçünde de gözlenen MN değerlerinin kontrol grubunda gözlenen ortalama MN değerlerinden önemli derecede

yüksek olduğu (P<0.005) ve MN uyarımında konsantrasyona bağlı bir artış meydana geldiği tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

Son 20 yılda kullanımı büyük oranda artış gösteren alüminyum ve bileşenlerinin toksisitesine yönelik yapılmış çok sayıda çalışmada, söz konusu metal ve bileşenlerinin özellikle nörodejeneratif hastalıklar başta olmak üzere birçok hastalığın patogeneğinde işe karıştığı tespit edilmiştir. Alüminyum ve bileşenlerinin pekçok hastalık etyolojisinde rol oynadığına dair kuvvetli kanıtlar bulunmasına rağmen, karsinojenitesine ve mutajenitesine yönelik veriler yetersizdir. Mutajenitesinin değerlendirilmesi amacını taşıyan çalışmaların bir kısmı çeşitli bakteri soyları (2, 23, 24, 25) ya da bitkiler (3, 19, 20) ile gerçekleştirilmiş ve mutajenik etkiler gözlenmiştir.

Alüminyum ve bileşenlerinin memeli hücrelerine olan mutajenitesinin incelenmesine yönelik fazlaca çalışma mevcut değildir. Çeşitli alüminyum bileşenlerinin memeli embriyo hücrelerinde trans-

Tablo 1. Araştırmaya alınan kız (K) ve erkek (E) olgularda gözlenen MN değerlerinin karşılaştırılması.

No	Yaş	Cinsiyet	Gözlenen MN Değeri (2000 CB Hücrede)			
			Kontrol	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml
1	18	K	16	18	16	23
2	23	K	21	25	22	28
3	19	K	18	20	22	23
4	24	K	17	18	14	17
5	24	K	16	14	19	18
6	18	K	13	14	16	16
7	18	K	15	24	18	25
8	19	K	13	17	23	18
9	24	K	13	13	13	14
10	19	K	16	17	17	21
Toplam :			158	180	180	203
Ort. ± SD :			15.8 ± 2.53*	18 ± 4.06**	18 ± 3.46***	20.3 ± 4.42****
11	20	E	13	23	25	23
12	18	E	14	20	23	24
13	18	E	17	20	21	22
14	18	E	19	20	17	21
15	18	E	18	19	18	20
16	25	E	18	18	19	20
17	22	E	20	21	21	20
18	22	E	13	11	13	17
19	22	E	10	15	15	17
20	23	E	18	18	17	18
Toplam :			160	185	189	211
Ort. ± SD :			16 ± 3.27*	18.5 ± 3.37**	18.9 ± 3.67***	21.1 ± 4.41****
TOPLAM MN :			318	365	369	414
ORT. ± SD. :			15.9 ± 2.85	18.25 ± 3.64	18.45 ± 3.5	20.7 ± 4.32

* P> 0.05

** P> 0.05

*** P> 0.05

**** P> 0.05

Tablo 2. Toplam 20 olguya ait kontrol kültürlerinde ve alüminyum sülfat ilave edilmiş kültürlerde saptanan MN frekanslarının karşılaştırılması.

Kontrol 15.9 ± 2.85	10 µg/ml 18.25 ± 3.64	P < 0.005
	20 µg/ml 18.45 ± 3.5	
	40 µg/ml 20.7 ± 4.32	
10 µg/ml 18.25 ± 3.64	20 µg/ml 18.45 ± 3.5	P > 0.05
	20 µg/ml 20.7 ± 4.32	P < 0.005
20 µg/ml 18.45 ± 3.5	40 µg/ml 20.7 ± 4.32	P < 0.005

formasyona neden olmadığı bulunurken (26), yine bazı alüminyum bileşenlerinin rat kemik iliği hücrelerinde bölünen hücrelerde azalmaya, anormal hücrelerde ve kromozom aberasyonunda da artışa yol açtığı tespit edilmiştir (17). İnsan lökositleriyle yapılan in vitro bir çalışmada ise alüminyum sülfatın kromozomal aberasyonlarda, kardeş kromotid değişiminde (KKD) ve MN uyarımında artışa yol açtığı belirlenmiştir (18). İnsanlarla yapılan in vivo çalışmalarda da alüminyum fabrikasında çalışan işçilerin idrar (27) ve balgam ekstraktları (25) ile Ames testi gerçekleştirilmiş ve pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Yine fabrika işçilerinin idrar konsantrlerinde aynı testin uygulandığı bir başka çalışmada ise negatif bulgular tespit edilmiştir (28).

Mevcut çalışmada da alüminyum sülfat bileşeninin kültüre alınmış insan lenfositlerindeki mutajenik etkileri Fenech ve Morley'in önerdiği (21, 22) CB metodu ile incelenmiştir. Ortalama MN değerleri açısından kız ve erkek olgular arasında fark olmadığı tespit edilmiştir (P>0.05). 20 olgunun tamamında ise her üç konsantrasyon grubu hücrelerinde gözlenen ortalama MN değerlerinin kontrol grubu hücrelerinde gözlenen ortalama MN değerinden önemli derecede yüksek olduğu (P<0.005) ve bir alüminyum bileşiği olan alüminyum sülfatın, kültüre alınmış insan lenfositlerinde konsantrasyona bağlı olarak in vitro

MN oluşumunu uyardığı saptanmıştır. MN metodu; mitojenlere karşı sitogenetik yanıtın tespitinde güvenilir metodlardan biri olarak kabul gördüğünden, çalışmada gözlenen sitogenetik yanıtı bakarak alüminyum sülfatın mutajenik etkiye sahip olduğunu söylemek mümkündür. Bu mutajenik etkinin mekanizmasını izah etmeye yönelik görüşlere göre; alüminyum, iyonik yarıçap ve değerliğine bağlı olarak karboksilat ve fosfat grupları, inorganik fosfatlar, nükleotid ve polinükleotid gibi oksijen donörü taşıyan gruplar ile birleşme eğilimindedir (4). DNA ile kompleksler yapan alüminyum; DNA, RNA ve pekçok polinükleotide karşı yüksek affinite gösterir. DNA'ya nasıl bağlandığı bilinmemekle birlikte, muhtemelen fosfat grupları ile etkileştiği düşünülmektedir (29, 30). Mikrotubule inkorpore olarak, mikrotübülün yapısını değiştirdiği ve tersiyer yapıdaki bu değişikliğin ise tubülün alt ünitelerine bağlanan proteinlerin mikrotübül ile olan etkileşimlerini bozduğu bildirilmektedir (31). Mevcut çalışmada elde edilen sonuç, muhtemelen alüminyum ve bileşenlerinin DNA'ya ve genetik aparatusa olan yukarıdaki etkileriyle ilişkilidir. Bu nedenle alüminyum ve bileşenlerinin mutajenitelerine yönelik mekanizmaların daha iyi anlaşılmasını sağlamak üzere çeşitli mutajenite testlerinin ve moleküler yöntemlerin birarada kullanılması yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Alfrey AC. Aluminium toxicity. Bull NY. Acad Med 1984; 60:210-12.
2. Léonard A, Gerber GB. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of aluminium. Mutation Research 1988; 196: 247-57.
3. Roy AK, Sharma A, Talukder G. A time course study on effects of aluminium on mitotic cell division in *Allium sativum*. Mutation Research 1989; 227: 221-26.
4. Martin RB. The chemistry of aluminium as related to biology and medicine. Clin Chem. 1986; 32: 1797-806.
5. Alfrey AC. Aluminium intoxication. The New England J Medicine 1984; 310: 311-5.
6. Cannata JB, Domingo JL. Aluminium toxicity in mammals: A minireview. Vet Hum Toxicol 1989; 31: 577-83.
7. Sideman S, Manor D. The dialysis dementia syndrome and aluminium intoxication. Nephron 1982; 31: 1-10.
8. Banks WA, Kastin AJ. Aluminium increases permeability of blood-brain barrier to labelled DSIP and β -endorphin: Possible implications for senile and dialysis dementia. Lancet 1983; 26: 1227-29.
9. Winney RJ, Cowie JF, Cumming AD, Short AIK, Smith GD, Robson JS. Epidemiology of aluminium toxicity in a low incidence area. Contr Nephrol 1984; 38: 47-58.
10. Oshimura M, Barrett JC. Chemically induced aneuploidy in mammalian cells: Mechanisms and biological significance in cancer. Environ Mutagenesis 1986; 8: 129-59.
11. Sharma A, Talukder G. Effect of metal chromosomes of higher organisms. Environ Mutagenesis 1987; 9: 191-226.
12. Verity MA. Neurotoxins and environmental poisons. Current Opinion in Neurology and Neurosurgery 1992; 5: 401-5.
13. Boyce BF, Elder HY, Elliot HC, Fogelman I, Fell GS, Junars BC, et al. Hypercalcaemic osteomalacia due to aluminium toxicity. Lancet 1982; 6: 1009-12.
14. Isogna KL, Brodley DR, Caro CF, Lockwood DH. Osteomalacia and weakness from excessive antacid ingestion. Jama 1980; 244: 2544-46.
15. Goodman WG, Gilligan J, Horst R. Short-term aluminium administration in the rat. J Clin Invest 1984; 73: 171-81.
16. Hodsmann AB, Sherrard DJ, Alfrey AC, Ott S, Brickman AS, Miller NL, et al. Bone aluminium and histomorphometric features of renal osteodystrophy. J Clinical Endocrinology and Metabolism 1982; 54: 539-46.
17. Roy AK, Sharma A, Talukder G. Effects of aluminium salts on bone marrow chromosomes in rats in vivo. Cytobios 1991; 66: 105-11.
18. Roy AK, Talukder G, Sharma A. Effects of aluminium sulphate on human leukocyte chromosomes in vitro. Mutation Research 1990; 244: 179-83.
19. Wallace SU, Anderson IC. Aluminium toxicity on DNA synthesis in wheat roots. Agronomy 1984; 76: 5-8.
20. Matsumoto H. Changes of the structure of pea chromatin by aluminium. Plant Cell Physiol 1988; 29: 271-87.
21. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. Mutation Research 1993; 285: 35-44.
22. Fenech M, Morley AA. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. Cytobios 1985; 43: 233-46.
23. Oetive VC, Wood M, Johnson AC. Mutagenic effects of aluminium. Mutation Research 1990; 244: 179-83.
24. Karamatsu N, Hara M, Kada T. Rec assay and mutagenicity studies on metal compounds. Mutation Research 1980; 77: 105-16.
25. Krokje R, Tiltne A, Mylinus E, Gullvåg B. Testing for mutagens in an aluminium plant. The result of Salmonella typhimurium tests on expectorates from exposed workers. Mutation Research 1985; 204: 163-72.
26. Di Paola JA, Casto BC. Quantitative studies of in vitro morphological transformation of Syrian hamster cells by inorganic metal salts. Cancer Res 1979; 39: 1008-13.
27. Heussner JC, Word Jr JB, Legator S. Genetic monitoring of aluminium workers exposed to coal tar pitch volatiles. Mutation Research 1985; 155: 143-55.
28. Krueger GL, Morris TK, Susking RR, Widner EM. The health effects of aluminium compounds in mammals. CRC Crit Rev Toxicol 1984; 13: 1-24.
29. Dyrssen D, Haraldson C, Nyberg E, Wedborg M. Complexation of aluminium with DNA. J Inorganic Biochemistry 1987; 29: 67-75.
30. Ganrot PD. Metabolism and possible health effects of aluminium. Environ Health Perspectives 1986; 65: 363-441.
31. MacDonald TL, Humphreys WG, Martin RB. Promotion of tubulin assembly by aluminium ion in vitro. Science 1987; 236: 183-86.