

Sigara kullanma alışkanlığının insan lenfositlerindeki mikronükleus oluşumuna etkileri

Sennur DEMİREL, Gül DURAKBAŞI

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, KONYA

ÖZET

Bu çalışmada, sigara kullanma alışkanlığının mikronükleus (MN) oluşumuna etkisini incelemek amacıyla, sigara kullanan, bilinen bir mutajene maruz kalmamış, sağlıklı 10 kadın ve 10 erkek ile kontrol grubu olarak yaşları sigara kullananlara yakın seçilen, hiç sigara kullanmamış, bilinen bir mutajene maruz kalmamış, sağlıklı 10 kadın ve 10 erkek bireyden hazırlanan periferik kan lenfosit kültürlerinde Sitokinezi-Blok metoduyla MN oranları araştırılmıştır. Bulgularımız, sigara kullananların oluşturduğu kadın ve erkek grubunda gözlenen ortalama MN oranının, kontrol grubunu oluşturan kadın ve erkeklerde gözlenen ortalama MN oranından önemli derecede yüksek olduğunu ortaya koymuştur ($P<0.001$). Sonuçta; sigaranın insan genetik materyalinde hasar oluşturan önemli mutajenik faktörlerden biri olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mikronükleus, sigara, sitogenetik hasar.

SUMMARY

The effects of cigarette smoking on micronucleus frequency in human lymphocytes

In this study, with the aid of the Cytokinesis-Blocked method, MN ratios were investigated in the peripheral blood lymphocyte cultures obtained from healthy donors consisting of 10 male and 10 female cigarette smokers, who were never exposed to any known mutagens versus 10 male and 10 females, who have never smoked cigarette before and never exposed to any of the known mutagens as age matched control group. Our findings showed that the mean MN ratio of the cigarette smokers is significantly higher than the mean MN ratio of the control group ($P<0.001$). This findings showed that cigarette smoking is one of the important mutagenic factors which caused damage to human genetic materials.

Key Words: Micronucleus, cigarette, cytogenetic damage

Mikronükleus (MN) hücre bölünmesi sırasında anafazda gecikmiş ve kondanse olmuş kromozom fragmentlerinden ya da tam bir kromozomdan oluşabilmektedir (1). Farklı canlılar üzerinde yapılan çalışmalarda, klastojenlere ve anöploidi uyaran ajanlara maruz kalan hücrelerde MN oranının arttığı tespit edilmiştir (1,2). MN çalışmaları, başlangıçta daha çok çeşitli kimyasalların oluşturduğu yapısal kromozom düzensizliklerinin saptanmasında kullanılmakla birlikte (3,4); daha sonraki çalışmalarda, mikrotübül aktivitesini bozan ajanların oluşturduğu sayısal kromozom düzensizliklerinin belirlenmesinde de kullanılabileceği gösterilmiş (5,6) ve geliştirilen modifiye metodlarla anöploidiye yol açan ajanların klastojenlerden ayırımında MN tekniğinden yararlanılmıştır (2,7). Fenech ve Morley (8) geliştirdikleri Sitokinezi-Blok (Cytokinesis-Blocked) metodu ile bazı kinetik problemlerin ortadan kalkmasını ve tekniğin

uygulanmasındaki güvenilirliğin artmasını sağlamışlardır. Bir küf mantarı metaboliti olan Cytochalasin-B (Cyt-B) kullanarak mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanan bu yöntem ile mitoz geçiren, ancak sitoplazmik bölünme geçiremeyen çift çekirdekli hücreler kolaylıkla gözlenebilmekte ve MN'li hücrelerin oranı saptanabilmektedir. Böylece sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilen MN sayımı, karyotipik analizlerden daha kolay ve istatistiksel açıdan daha anlamlı sonuçlar sağlamakta ve çeşitli mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkenlerin oluşturduğu sitogenetik hasarın saptanmasında kullanışlı bir yöntem olarak önerilmektedir (9-12).

Biz de bu çalışmamızda, sigara kullanma alışkanlığının periferik kan lenfosit kültürlerinde uyardığı MN oranını belirleyerek sigaranın

oluşturduğu sitogenetik harabiyeti saptamayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Laboratuvarında gerçekleştirilen bu çalışmaya, yaşları 18-25 arasında değişen, bilinen bir mutajene maruz kalmamış, sağlıklı ve en az bir yıldan beri günde bir paket sigara tüketen 10 kadın ve 10 erkek ile yine aynı yaşlarda olan sağlıklı, bilinen hiçbir mutajene maruz kalmamış 10 kadın ve 10 erkek birey kontrol grubu olarak alındı. Her bir bireyden heparinlenmiş enjektör ile alınan kan örnekleri standart yöntemlerle hazırlanan besi ortamlarına steril olarak ilave edildi ve 37°C'de 72 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Sitokinezi durdurmak için üreme periyodunun 44. saatinde her bir deney tüpüne kendi başına MN uyarmayan, optimum konsantrasyon olarak bildirilen 3.0 µg/ml Cyt-B (Sigma) ilave edildi (13). Işığın fotolitik etkisinden korumak amacıyla kültür tüpleri alüminyum folyolara sarılıp 72 saatlik kültür periyodunu tamamlamak üzere 37°C'lik

etüve kaldırıldı. Üreme periyodunun sonunda kültürlerden hazırlanan preparatlar % 5'lik Giemsa ile 5-7 dk. boyanarak analiz edildi. Analiz sırasında her bir olgu için sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli 2000 hücre sayıldı ve MN bulunduran hücreler kaydedildi.

1000x büyütmede incelenen MN'lerin tanımlanmasında Heddle ve arkadaşlarının (14) kriterleri esas alındı; MN çapının esas çekirdeğin 1/3'ünden küçük olmasına, boya alma yoğunluğunun esas çekirdek ile aynı olmasına ve sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerde bulunan MN'lerin sayılmasına özen gösterildi. Sonuçlar, Student's t testi ile değerlendirildi.

BULGULAR

Bu çalışmada; sigara kullanan, 18-25 yaşları arasında, sağlıklı 10 kadın ve 10 erkek ile kontrol grubu olarak sigara kullanmayan, sağlıklı 10 kadın ve 10 erkek olmak üzere toplam 40 bireyin periferik kan lenfositlerinde MN oranı incelenmiş; çalışma kapsamına alınan bireylerin yaşları, cinsiyetleri, sayılan hücre sayıları ve gözlenen MN değerleri Tablo 1'de

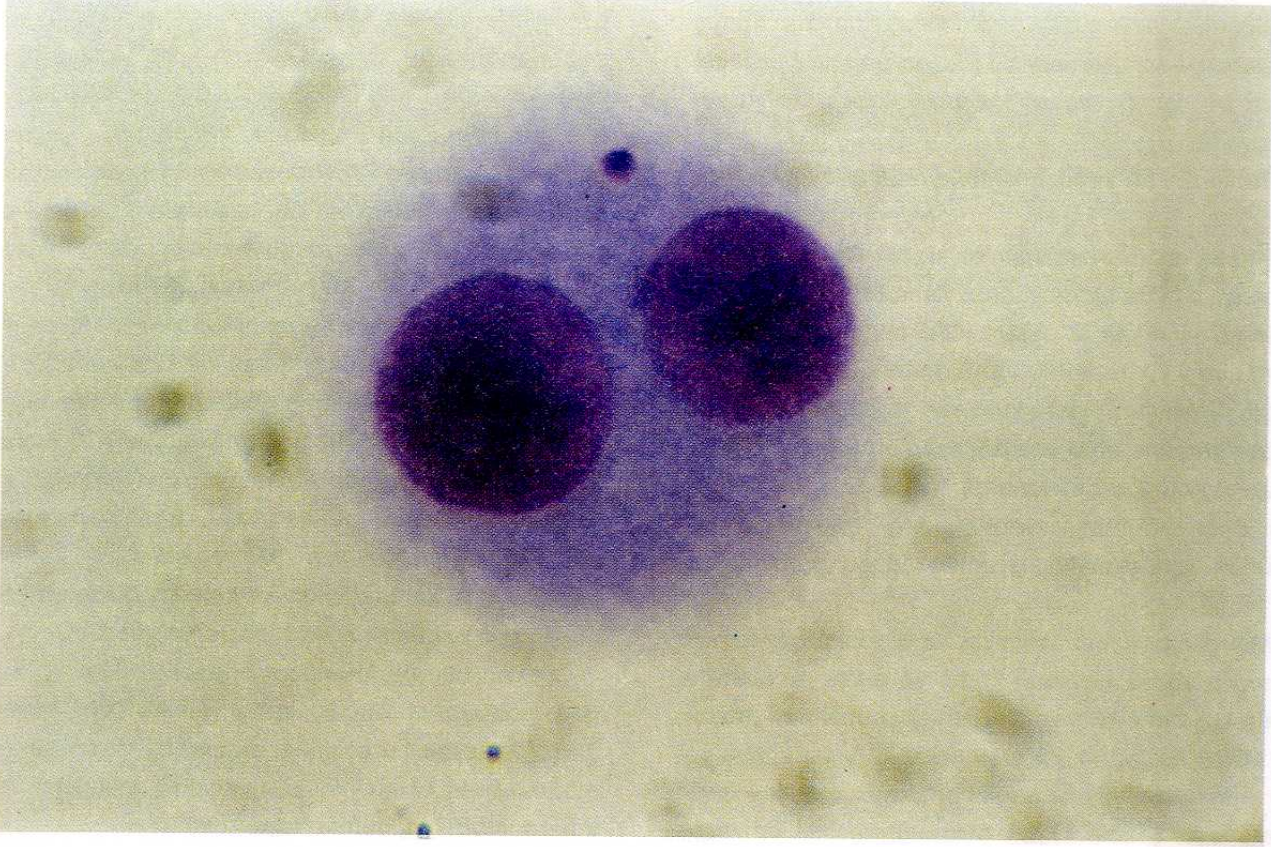
Tablo 1. Araştırmaya alınan kontrol grubu ve sigara kullanan grupta gözlenen MN değerleri

Kontrol grubunda gözlenen MN değerleri						Sigara kullananlarda gözlenen MN değerleri				
No	Yaş	Cins.	Sayılan Hücre	Gözl. MN	MN oranı (%)	Yaş	Cins.	Sayılan Hücre	Gözl. MN	MN oranı (%)
1	18	K	2000	16	0.8	22	K	2000	18	0.90
2	23	K	2000	21	1.05	20	K	2000	24	1.20
3	19	K	2000	18	0.90	19	K	2000	22	1.10
4	24	K	2000	17	0.85	19	K	2000	19	0.95
5	24	K	2000	16	0.80	18	K	2000	15	0.75
6	18	K	2000	13	0.65	21	K	2000	17	0.85
7	18	K	2000	15	0.75	22	K	2000	17	0.85
8	19	K	2000	13	0.65	24	K	2000	23	1.15
9	24	K	2000	13	0.65	23	K	2000	18	0.90
10	19	K	2000	16	0.80	25	K	2000	20	1.10
Toplam MN:			158			193				
Ort.±SD:			0.790±0.126*			0.975±0.151**				
11	20	E	2000	13	0.65	18	E	2000	16	0.80
12	18	E	2000	14	0.70	19	E	2000	18	0.90
13	18	E	2000	17	0.85	21	E	2000	18	0.90
14	18	E	2000	19	0.95	25	E	2000	23	1.15
15	18	E	2000	18	0.90	22	E	2000	21	1.05
16	25	E	2000	18	0.90	23	E	2000	25	1.25
17	22	E	2000	20	1.00	20	E	2000	17	0.85
18	22	E	2000	13	0.65	20	E	2000	14	0.70
19	22	E	2000	10	0.50	19	E	2000	20	1.00
20	23	E	2000	18	0.90	18	E	2000	24	1.20
Toplam MN:			160			196				
Ort. ±SD:			0.800±0.163*			0.980±0.181**				
GENEL TOP. MN:			318			389				
ORT. ±SD:			0.795±0.142***			0.978±0.163***				

*P>0.05

**P>0.05

***P<0.001



Şekil 1. Sitokinezi bloke edilmiş bir hücrede bulunan mikronükleus.

özetlenmiştir. Tablo'da görüldüğü gibi; çalışmaya dahil edilen olguların her biri için 2000 sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücre olmak üzere toplam 80.000 çift çekirdekli hücre değerlendirilmiş ve sigara kullanan grupta 389, kontrol grubunda 318 olmak üzere 707 çift çekirdekli hücrenin MN içerdiği gözlenmiştir (Şekil 1). Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmeleri sonucunda, sigara kullanan grubun ortalama MN değerinin (0.978 ± 0.163) kontrol grubunun ortalama MN değerine (0.795 ± 0.142) göre önemli oranda artmış olduğu saptanmıştır ($P < 0.001$). MN oluşumunun bireylerin cinsiyeti ile ilişkisini ortaya koymak üzere yapılan değerlendirmelerde; kontrol olarak alınan kadın ve erkek gruplarının ortalama MN değerleri arasında (sırasıyla 0.790 ± 0.126 , 0.800 ± 0.163) istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($P > 0.05$), bu sonucun sigara kullanan grubu oluşturan kadın ve erkek ortalama MN değerleri (sırasıyla 0.975 ± 0.151 , 0.980 ± 0.181) için de geçerli olduğu anlaşılmıştır ($P > 0.05$).

TARTIŞMA

Sigaranın mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilerini belirlemek için pek çok çalışma yapılmıştır (11, 15-17). Elde edilen bulgular akciğer kanserinde,

yassı epitel hücreli özofajial karsinomada, ateroskleroz oluşumunda ve miyokard enfarktüsünde sigara kullanımına bağlı anlamlı artışlar olduğunu ortaya koymuştur (15,18). Sigara kullanımına bağlı mortalite ve morbiditenin günlük ve yıllık tüketilen sigara miktarı ile doğru orantılı mutajenik etkiye sahip olduğu ve insan genetik materyalinde hasar oluşturduğu anlaşılmıştır (11,16); bu tehlikelerden korunmak isteyenlerin çiğneme tütün gibi dumansız tütün çeşitlerine yöneldikleri görülmüştür (15). Ancak bukkal mukoza hücrelerinde MN testiyle yapılan bir çalışmada, tütün çiğneyenlerde sigara kullananlara yakın oranda MN artışı olduğu ve dumansız tütünün de genotoksik etkilerinin göz ardı edilmemesi gerektiği vurgulanmıştır (19). Periferik kan lenfositleriyle yapılan bir diğer çalışmada, kromozom analizleri ve MN test sonuçları birlikte değerlendirilmiş, sigara kullananlarda hiperploid hücre oranı ile kromatid ve kromozom düzensizliklerinin oranında önemli artış olduğu, MN oranındaki artışın da bu düzensizliklere paralel bir oranda artmış olduğu gösterilmiştir (20). Cerqueira ve arkadaşları (21), kadınlardan alınan uterin serviks hücrelerinde, sigara kullanımının sitogenetik etkilerini MN testiyle araştırarak, skuamöz

interepitelyal lezyonlarda kromozomal hasarın artmış olduğunu ve MN testinin bu tür lezyonların takibinde yararlı bir teknik olarak kullanılabileceğini vurgulamışlardır.

Periferik kan lenfosit kültürlerinde Sitokinezi-Blok metodunu kullanarak gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada, sigara kullanan ve sigara dışında bilinen herhangi bir mutajene maruz kalmamış, sağlıklı 10 kadın ve 10 erkek ile sigara kullanmayan sağlıklı 10 kadın ve 10 erkekte saptanan MN değerleri karşılaştırılmıştır. Sigara kullanan grupta MN oranının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli oranda artmış olduğu belirlenerek ($P < 0.001$), bu bulgunun aynı yöntemle yapılan MN çalışmalarının çoğunun sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür (11,12,19,20).

MN oluşumunun cinsiyet ile ilişkisini belirlemek amacıyla sigara kullanan kadın ve erkek grupları ile sigara kullanmayan kadın ve erkek gruplarının ortalamaya MN değerleri kendi aralarında karşılaştırılmış ve MN oranında cinsiyete bağlı herhangi bir farklılık saptanmamıştır (Tablo 1). Bu bulgunun, çeşitli kimyasal

bileşiklerle yapılan MN test sonuçlarının toplanarak değerlendirildiği büyük çaplı bir çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür (22). Ayrıca MN oranının, yaş ile ilişkili olmadığını bildiren çalışmalar yanında (22-24) yaşlanma ile ilişkili olarak artış gösterdiğini bildiren bazı çalışmalar da mevcut olduğundan (25,26) araştırmamıza dahil edilen, sigara kullanan ve kullanmayan bireylerin birbirine yakın yaş grubundan seçilmesine özen gösterilmiştir. İleri yaştaki kadınlarda yapılan bir araştırmada MN oranının yaşlanma ile artış gösterdiği belirlenmiş ve FISH tekniği ile MN'lerin çoğunluğunun X kromozomundan oluştuğu anlaşılmıştır. Yaşlı kadınlarda X kromozom kaybı karyotip analizleriyle doğrulanmış ve böylece MN oluşumu ile karyotip analizlerinde saptanabilen kromozom düzensizlikleri arasındaki paralellik açıkça gösterilmiştir (25).

Sonuç olarak, kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak kabul edilen MN testiyle gerçekleştirilen bu çalışma, sigaranın insan genetik materyalinde hasar oluşturan önemli mutajenik faktörlerden biri olduğunu ortaya koymuştur.

KAYNAKLAR

1. Fucic A, Garaj-Vrhovac V, Skara M, Dimitrovic B. X-Rays, microvaves and vinyl chloride monomer: their clastogenic and aneugenic activity, using the micronucleus assay on human lymphocytes. *Mutat Res* 1992; 282: 265-71.
2. Vanparys P, Vermeiren F, Sysmans M, Temmerman R. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutat Res* 1990; 244: 95-103.
3. Heddle JA. A rapid in vivo test for chromosome damage. *Mutat Res* 1973; 18: 191-7.
4. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res* 1975; 31: 9-15.
5. Maier P, Schmid W. Ten model mutagens evaluated by the micronucleus test. *Mutat Res* 1976; 40: 325-38.
6. Yamamoto KI, Kikuchi Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat Res* 1980; 71: 127-31.
7. Migliore L, Bocciardi C, Macri C, Lo Jacono F. Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutat Res* 1993; 319: 205-13.
8. Fenech M, Morley AA. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios* 1985; 43: 233-46.
9. Majer BJ, Laky B, Knasmüller S, Kassie F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutat Res*. 2001; 489(2-3):147-72.
10. Pastor S, Gutierrez S, Creus A, Xamena N, Piperakis S, Marcos R. Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis*. 2001;16(6):539-45.
11. Garewal HS, Ramsey L, Kaugars G, Boyle J. Clinical experience with the micronucleus assay. *Journal of Cellular Biochemistry* 1993; 17:206-12.
12. Schneider M, Diemer K, Engelhart K, Zankl H, Trommer WE, Biesalski HK. Protective effects of vitamins C and E on the number of micronuclei in lymphocytes in smokers and their role in ascorbate free radical formation in plasma. *Free Radic Res* 2001 ;34: 209-19.
13. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* 1993; 285:35-44.
14. Haddley JA, Countryman RI. The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* 1976; 41: 321-332.
15. Robbins SL, Kumar V. *Basic Pathology*. Fourth ed. Philadelphia: W. B. Saunders 1997: p.253-5.
16. Cheng TJ, Christiani DC, Xu X, Wain JC, Wiencke JK, Kelsey KT. Increased micronucleus frequency in lymphocytes from smokers with lung cancer. *Mutat Res* 1996: 349; 43-50.
17. Izzotti A, Balansky RM, Dagostini F, Bennicelli C, Myers SR, Grubbs CJ et al. Modulation of biomarkers by chemopreventive agents in smoke-exposed rats. *Cancer Res* 2001; 61 (6) 2472-9.
18. Silverberg E. *Cancer statistics*. CA 1985; 35: 19-25.
19. Ozkul Y, Donmez H, Erenmemisoglu A, Demirtas H, Imamoglu N. Induction of micronuclei by smokeless tobacco on buccal mucosa cells of habitual users. *Mutagenesis* 1997;12(4):285-7
20. Jin YL, Wang HZ, Gu H. Observation of chromosome aberration and micronucleus formation in peripheral blood lymphocytes among cigarette smokers. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 1997; 18(1): 40-2.

21. Cerqueira EM, Santoro CL, Donozo NF, Freitas BA, Pereira CA, Bevilacqua RG et al. Genetic damage in exfoliated cells of the uterine cervix. Association and interaction between cigarette smoking and progression to malignant transformation? *Acta Cytol* 1998; 42: 639-49.
22. Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1990; 239: 29-80.
23. Çora T, Demirel S, Acar A, Erkul İ. Yenidoğan periferik kan lenfosit kültürlerinde fototerapinin uyardığı mikronukleuslar. *S Ü Tıp Fak Derg* 1992; 8(3): 345-51.
24. Acar A, Durakbaşı HG, Paydak F. Alüminyum sülfatın insan periferik kan lenfosit kültürlerinde mikronükleus uyarımı üzerine etkileri. *S Ü Tıp Fak Derg* 1995; 11 (2): 139-44.
25. Richard F, Muleris M, Dutrillaux B. The frequency of micronuclei with X chromosome increases with age in human females. *Mutat Res* 1994; 316: 1-7.
26. Scarfi MR, Cossarizza A, Monti D, Bersani F, Zannotti M, Lioi MB et al. Age-related increase of mitomycin C induced micronuclei in lymphocytes from Down's syndrome subject. *Mutat Res* 1990; 237: 247-52.