

Dr. Etem AKBAŐ
Dr. Ayla ÇELİK
Dr. Ebru DERİCİ
Dr. Fatma SÖYLEMEZ

SİGARA KULLANIMININ LENFOSİT YAŞAM SÜRESİ VE GENOTOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

THE INVESTIGATION OF CIGARETTE SMOKING ON THE LYMPHOCYTE LIFE TIME AND GENOTOXIC EFFECTS

ÖZET

Sigara kullanımının pek çok hastalığın doğrudan ya da dolaylı etmeni olduğu bilinmektedir. Pek çok çalışma ile sitotoksik ve genotoksik etkisi ortaya konmuştur. Sigara kullanımının insanlarda yaşam süresini önemli ölçüde düşürdüğü de ortaya konmuştur. Bu çalışmada sigara kullanımının; SCE (sister chromatid exchanges = kardeş kromatid değişimi) bazında genotoksik etkisi ve özgün bağışık sistemimizin en önemli hücresel elamanları olan lenfositlerde (hücre düzeyinde) yaşam süresi üzerine etkileri incelendi. Sigara içmeyen sağlıklı bireylerden kontrol grubu, en az 5 yıl süre ile günde bir paket sigara içen sağlıklı bireylerden deney grubu oluşturuldu. Deney ve kontrol grubundaki bireylerden alınan kanın bir bölümü ile SCE prosedürü ve kromozom analizi prosedürüne göre lenfosit kültürleri yapıldı. SCE Prosedürüne uygun hazırlanan preparatlardan nitelikli metafaz plakları seçilerek kardeş kromatid değişimine uğrayan kromozomlar değerlendirildi. Sigara kullanımının genotoksik etkileri SCE bulguları kapsamında değerlendirildi. Kromozom analizi prosedürüne uygun yapılan preparatlardan mitotik indeks değerleri belirlenerek hücrelerin mitozu giriş hızları saptandı. Kan örneklerinin diğer bölümünden de hemogram cihazı lenfosit değerleri saptandı. Mitotik indeks oranları ve lenfosit sayısı birlikte yorumlanarak lenfosit yaşam süresi farkının indirekt olarak saptanmasında kullanıldı. Sigara içmeyen bireylere göre sigara içen bireylerdeki SCE oranları 5.84'ten - 7.73'e yükseldiği saptandı ($p<0.01$). Sigara içmeyenlerdeki 2,08 olan mitotik indekste lenfosit sayısı 2202 olurken-Sigara içenlerde 2,64 olan mitotik indeksle lenfosit sayısı 2531'e yükselmiştir ($p<0.05$). Sigara içmeyenlere göre Sigara içenlerde mitotik indeks oranı artışı, lenfosit sayısındaki artıştan daha yüksektir. Bu durum sigara içenlerde lenfositlerin yaşam süresinin daha kısa olduğunu göstermektedir ($p<0.05$).

Anahtar Sözcükler: Sigara kullanımı, SCE, Mitotik indeks, Lenfosit sayısı, Lenfosit yaşam süresi.

ABSTRACT

It is known that cigarette smoking leads to many types of disease and shortens of human life-time. In this study, The effects of cigarette smoking were investigated on the SCE (Sister Chromatid Exchange)frequency and the lymphocyte life-span. Subjects who had not been exposed any related Chemical agents, had not smoked were selected as control group. The study was carried out on smokers (5 years, at least 1 packet/day). Two tests were performed: Chromosome analyses (CA) and SCE. SCE and mitotic index frequencies were determined. Lymphocyte counts were counted with hemogram apparatus. Mitotic index frequency and Lymphocyte count were used to determine the lymphocyte life-span. SCE frequency in the smokers is higher than in non-smoker (for non-smokers (mean value)=5.84 and for smoker (mean value)=7.73). In control group, mitotic index frequency was 2,08 and lymphocyte count was 2202 while this values were 2.64 and 2531 respectively for experimental group ($p<0.05$). The increase of mitotic index in smokers is higher than non-smoker ($p<0.05$). The results show that lymphocyte life-span in smokers is shorter than in non-smokers ($p<0.05$).

Key Words: Cigarette smoking, SCE, Mitotic index, Lymphocyte count, Lymphocyte life time.

Geliş: 09.11.2000

Kabul: 06.02.2001

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı-MERSİN

İletişim: Dr. Etem AKBAŐ: Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı-MERSİN

GİRİŞ

Sigara kullanımının başta akciğer kanseri ve gırtlak kanseri olmak üzere çeşitli kanser türleri, kalp damar hastalıkları ve solunum sistemi ile ilgili enfeksiyöz hastalıklara yakalanma riskini arttırdığı ve de insan yaşam süresini kısalttığı çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Sigaranın katranı aracılığıyla bünyeye karışan yaklaşık 4000 çeşit kimyasal ajanın hücredeki çeşitli moleküllerin yapısını bozması ve biyokimyasal mekanizmalarda aksamalara neden olması pek çok çalışma ile ortaya konmuştur. Hatta bunlar içinde kanserojen olanlar bile (örneğin; benzopryn, 2-toludin, 2-naphtylamine, acriflonitryl, 4-aminobiophenil, benzen, hidrazine, arsenic, chromium ve cadmium) saptanmıştır (1-3).

Bünyeye karışan ve büyük çoğunluğu toksik olan bu maddeleri vücuttan uzaklaştırmak veya etkisizleştirmek için bağışıklık sistemimizin en önemli hücresel elemanları olan lenfositlere düşen işin artacağı, bu nedenle lenfoid organların daha fazla lenfosit oluşumu için baskı altında tutulacağı kaçınılmazdır. Bir yandan daha fazla lenfosit oluşturulması için lenfoid organların baskı yapılması mitoz mekanizmasının kontrolünü güçleştirirken-diğer yandan çok fazla sayıdaki toksik ajanın bünyedeki tahribatını etkisizleştirmek için lenfositlerin artan iş yükü, lenfositlerin yaşam süresini olumsuz etkilemesi riski söz konusudur. Bu bilgilerden hareketle; sigara kullanımının lenfositlerde yaşam süresini kısaltacağı ve sigaranın organizma düzeyindeki yaşam süresini kısaltıcı etkisini hücre düzeyinde de gösterip göstermediği bu çalışma ile ortaya konulmuştur.

GEREÇ VE YÖNTEM

Yaşları 23-37 arasında değişen ve sigara içmeyen 25 bayan ve 25 erkek bireyden kontrol grubu oluşturuldu. Deney grubu ise, aynı yaş grubundan ve en az 5 yıldan beri günde 1 paket sigara için 25 bayan ve 25 erkek bireyden oluşturuldu. Toplam 100 kişiden oluşan popülasyonumuz; yakın geçmişinde radyoterapi ve kemoterapi görmemiş, alkol alışkanlığı olmayan sağlıklı bireylerden oluşturuldu. Kontrol ve deney gruplarındaki her bireyden alınan kan örnekleri ikiye bölündü.

Birinci bölümden iki tane 72 saatlik lenfosit kültürü hazırlandı. Bir tanesi SCE için: International Atomic Energy Agency (IAEA) protokolüne uygun olarak 10 µM BUdR içeren ve %16 Fetal calf serum + %80 medium 199 + %4 Phytohemaglutinin'den oluşan ortamda yapıldı (4). Kardeş kromatid değişimi; timin nükleotidi analogu olan BUdR varlığında DNA eşlemesi ilkesine dayanan kromozomal düzeyde mutajen ve klastojen etmenlerin kromozomlardaki kardeş kromatidlerde yanlış yer değişim oranlarını belirlemede kullanılır. SCE için hazırlanan preparatlardan her birey için 50 adet metafaz plağı değerlendirildi. Bir kültür de

mitotik indeks için: SCE kültür ortamından farklı olarak BUdR içermeyen ortamda yapıldı. Kültürlere preparasyon saatinden 1,5 saat önce kolşisin uygulanarak hücrelerin mitoz aşamasındaki hücrelerin bloke edilmesi sağlandı (5). Her birey için hazırlanan preparatlar Olympus BX-50 mikroskopunda 40x10=400 büyütmede taranıp 1000 tane hücre sayılarak bunların içinde mitoz aşamasında olanların miktarı saptandı. Mitotik indeksi oluşturmak için bu değer daha sonra %'ye dönüştürüldü ve bu değerler hücrelerin mitoz giriş hızı olarak yorumlandı.

İkinci bölümden ise kan örneklerinin bir bölümü hemogram cihazında değerlendirilerek birim hacimdeki lenfosit saptandı. Mitotik indeks değerleri hücrelerin mitoz giriş hızını, birim hacimdeki lenfosit sayısı da mevcut durumu gösterdiğinden bu iki değer birlikte yorumlanarak indirekt olarak lenfosit yaşam süresi farkının saptanmasında kullanıldı.

Birim hacimdeki mitotik indeks, lenfosit sayısı ve SCE oranlarının istatistiksel değerlendirmesi: Bulgulara karekök transformasyonu uygulandıktan sonra Kalmogorov-Simironov testiyle normal dağılıma uygunluğu gösterildi ve iki yönlü varyans analizi tekniği olan interaksiyonlu model kullanıldı. Lenfosit sayısı ve mitotik indeks artışı arasındaki ilişki Korelesyon ve Regresyon analizi ile test edildi. Lenfosit yaşam süresi için t-oran testi kullanıldı (6).

BULGULAR

Kontrol ve deney grubuna ait lökosit sayısı, lenfosit sayısı, lenfosit/lökosit oranı ve mitotik indeks değerlerine ait genel bulgular çizelge I verilmiştir. Kontrol grubunda yer alan 25 bayan + 25 erkek bireyin yaş ortalaması 27,8'dir. Deney grubunda yer alan 25 bayan + 25 erkek bireyin yaş ortalaması ise 27,9'dur.

Kontrol ve deney grubunda hücre başına düşen SCE oranları incelendiğinde; Sigara içmeyen erkeklerde: 5,95 iken sigara içenlerde 6,79'e yükselmiştir (p<0.01). Sigara içmeyen bayanlarda: 5,73'den sigara içenlerde 6,68'e yükselmiştir (p<0.01). Kontrol grubunda genel SCE değeri: 5,84'den-deney grubunda 6,73'e yükselmiştir (p<0.01).

Kontrol ve deney grubunda mitotik indeks değerleri incelendiğinde; Sigara içmeyen erkeklerde: 2,23 olan mitoz girme hızı-sigara içenlerde 2,70'a yükselmiştir (p<0.01). Sigara içmeyen bayanlarda: 1,93 olan mitoz girme hızı-sigara içenlerde 2,59'a yükselmiştir (p<0.01). Kontrol grubunda genel mitotik indeks değeri: 2,08'den-deney grubunda 2,64'e yükselmiştir (p<0.01).

Kontrol ve deney grubuna ait Lenfosit değerleri incelendiğinde; Sigara içmeyen erkeklerde: 2347 olan lenfosit sayısı - sigara içenlerde 2573'e yükselmiştir (p<0.05). Sigara içmeyen bayanlarda 2055 olan lenfosit sayısı-sigara içen-

Tablo-1: Sigara içmeyen ve Sigara içenlere ait SCE oranları, mitotik indeks ve lenfosit sayısı ait genel bulgular

	Kontrol Grubu (Sigara İçmeyenler)			Deney Grubu (Sigara İçenler)			İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları		
	Erkek (I)	Bayan (II)	Genel (III)	Erkek (IV)	Bayan (V)	Genel (VI)	I-IV	II-V	III-VI
SCE/Metafaz	5,95±0,3	5,73±0,2	5,84±0,3	6,79±0,4	6,68±0,4	6,73±0,4	**	**	**
Mitotik İndeks (%)	2,23±0,10	1,93±0,12	2,08±0,08	2,70±0,13	2,59±0,15	2,64±0,10	**	**	**
Lenfosit sayısı (mm ³)	2347±123	2055±129	2201±90	2573±124	2489±155	2531±99	*	*	*
Yaş X:	27,9±0,91	27,8±0,94	27,8±0,65	27,8±1	28,04±1,02	27,9±1		*: p>0,05	** : p>0,01

lerde 2489'a yükselmiştir (p<0.05). Kontrol grubunun genel lenfosit sayısı 2201 iken-deney grubunda 2531'e yükselmiştir (p<0.05).

Sigara kullanımının lenfosit yaşam süresine etkisinin belirlenmesi; Sigara içmeyen erkeklerde: 2,23 olan mitoz girme hızı-sigara içenlerde 2,70'e yani %21'lik bir artış sağlamasına karşın, lenfosit sayısı 2347'den 2573'e çıkarak %9,6 artmıştır. %21-%9,6 = %11,4 lenfosit yaşam süresinde kısalmayı göstermektedir(p<0.01). Sigara içmeyen bayanlarda: 1,93 olan mitoz girme hızı-sigara içenlerde 2,59'a yani %34'lik bir artış sağlamasına karşın, lenfosit sayısı 2055'den 2489'a çıkarak %21 artmıştır. %34-%21= %13 lenfosit yaşam süresinde kısalmayı göstermektedir(p<0.01). Cinsiyet ayrımı olmaksızın genel olarak değerlendirdiğimizde ise sigara içmeyenlerde: 2,08 olan mitoz girme hızı-sigara içenlerde 2,64'e yani %27'lik bir artış sağlamasına karşın, lenfosit sayısı 2201'den 2531'e çıkarak %15 artmıştır. %27-%15=%12 lenfosit yaşam süresinde kısalmayı göstermektedir (p<0.01).

TARTIŞMA VE SONUÇLAR

SCE oranları sigara içmeyenlere göre sigara içenlerde (bayanlarda, erkeklerde ve genel toplamda) daha yüksek olduğunu belirleyerek sigaranın kardeş kromatid değişimi bazında genotoksik etkisini belirledik. Aynı şekilde sigara kullanımına bağlı olarak bayanlarda, erkeklerde ve toplamda lenfosit sayısını ve lenfositlerin mitoz girme hızını artırdığını belirledik. Bu çalışmadaki en önemli bulgumuz ise lenfosit oluşum hızının sayısal değer artışından daha yüksek olması nedeniyle sigara kullanımının lenfositlerde yaşam süresini kısalttığını saptadık. Konumuzun anlaşılmasına ışık tutacak literatür bulguları şunlardır:

Ghosh ve arkadaşları (7); Sigara ve tütün kullanımının SCE oranlarına etkisini incelediği çalışmada kontrol grubunda

5,48 olan SCE oranının sigara içenlerde 8,15'e ve pipo kullananlarda 10,12'ye yükseldiğini saptamıştır. Pendzich ve arkadaşları (8) sigara alışkanlığı ve bazı çevresel kirleticilerin mevsimlere göre SCE oranlarını incelediği çalışmada; Sigara içmeyen bireylerdeki yaz mevsiminde 6,80, kışın 7,18 olan SCE oranlarının sigara içenlerde yazlar 7,10 ve kışları 7,90'a yükseldiğini saptamıştır. Sabti ve arkadaşları (9) Mesleki yaşantıları gereği klastojen etkisinde kalan işçilerde yaptığı sitogenetik çalışmada sigara içmeyen yöneticilerdeki SCE oranını 4,87 bulmuştur. Bender ve arkadaşları (10) Geniş insan popülasyon örneklerinde kromozom düzensizlikleri ve SCE oranlarını inceledikleri çalışmada sigara içmeyenlerdeki 8,1 olan SCE oranının sigara içenlerde 9,0'a yükseldiğini saptamışlardır.

Sigara kullanımına bağlı olarak sigara içenlerde SCE düzeyinde sigaranın genotoksik etkisinin yükseldiği şeklindeki bulgumuz yukarıdaki 7-10 numaralı literatür bulguları ile birbirlerini desteklemektedir. Oranlar arasında bir takım farklılıklar olmakla beraber oran farklılıklarının kültür ortamı, kültür süresi, kısmen de olsa laboratuvar standartlarından kaynaklanmaktadır.

Sigara kullanımının lenfosit sayısı, mitotik indeks oranlarını artırdığı ve lenfosit yaşam süresini azalttığı şeklindeki bulgularımızı tam olarak kıyaslayabileceğimiz literatüre rastlanmamıştır. Ancak konumuzla ilgili bazı literatür örnekleri şunlardır: Ogova ve arkadaşları (11); Sigara bağımlısı olan kalp hastası fabrika işçilerinde lökosit ve nötrofil değerlerini incelediği çalışmada 1384 bireyde lökosit ve lenfosit sayısının sigara içenlerde daha yüksek olduğunu belirlemiştir. Boscarino ve Chang (12); 20 yıl bazı stres etkisinde kalan askerlerde lökosit ve lenfosit değerleri artışını incelediği çalışmada, sigara içenlerdeki lökosit ve T-lenfosit değerinin daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Hansen ve arkadaşları (13); 1 mm³ kandaki lenfosit değerinin sigara içenlerde ve pipo kullananlarda daha yüksek olduğunu belir-

lemiştir. Sigara içen bireylerdeki lenfosit değerinin daha yüksek olduğu şeklindeki bulgumuz 11-13 numaralı literatür bulgularıyla birbirini desteklemektedir

Sigara içmeyen bireylerde 2,08 olan genel mitotik indeks değeri, sigara içenlerde 2,64'e yükselmiştir. Bu çalışmanın en önemli bulgusu lenfosit sayısı ile mitotik indeks arasında bir regresyon ve korelasyonun saptanmasıdır ($r=0,948$ - $r=0,963$). Sigara içmeyenlerde %2,08'lik bir mitoz giriş hızıyla 2201 lenfosit bulunurken, Sigara içenlerde 2,64 oranındaki mitoz giriş hızıyla lenfosit sayısı 2531 olmuştur. Sigara içmeyenlere göre sigara içenlerdeki mitoz giriş hızı %27 artarken, lenfosit sayısı ancak %15 oranında artmıştır. Bu durum; sigara içenlerde lenfosit yaşam süresinin %27-%15= %12 oranında daha kısa olduğunu göstermektedir ($p<0,05$).

Sonuç; sigara içenlerde sigara kullanımı sonucu bünyeye karışan binlerce toksik etkili madde ile mücadele için daha fazla lenfosit görev yapmaktadır. Bu mücadele için lenfoid organlar lenfositlerin daha yüksek oranda oluşması için baskı altında kalmaktadır. Buna karşın sigara içmeyenlere göre sigara içen bireylerin bünyesi daha iyi korunamamaktadır. Çünkü pek çok hastalık ile sigara kullanımı arasındaki direkt yada dolaylı ilişki olduğu bilinmektedir. Sigara kullanımı insanlarda yaşam süresini kısaltıcı etkisini, özgün bağışıklık sistemimizin hücresel elemanları olan lenfositlerde de göstermektedir. Yapılan yayın taramasında sigara kullanımı ile mitotik indeks ve lenfosit yaşam süresi ile ilişkili bir yayına rastlanmadığından bulgularımız başka verilerle kıyaslanamamıştır

KAYNAKLAR

1. Report of the Surgeon General; The health consequences of smoking. US Government Printing Office. P. Americans. Pan American Health Organization. 1992; 84-9.
2. Sorsa M, Falck K, Heinonen T, Vainio H; Detections of exposure to mutagenic compounds in low-tar and medium-tar cigarette smokers. Environ Res. 1984; 33(2):3 12-2 1.
3. Anderson D, Jenkinson PC, Dewdney RS, Francis AJ; Chromosome aberrations, mitogen-induced blastogenesis and proliferative rate index peripheral lymphocytes from 106 control individuals of the U.K. populations. Mutat Res. 1988; 04(3):407-20.
4. IAEA Biological Dosimetry: Chromosomal aberrations analysis for the assessment. Technical Report No. 260. International Atomic Energy Agency. 1986 Vienna.
5. Barc MJ, Knutsen T, Spurbeck JL; The AGT Cytogenetics Laboratory Manual, 665, Third Edition. Lippincott-Raven Publishers-1997.
6. Özdamar K; SPSS ile Biyoistatistik - Bölüm 16, 317-40. Kaan kitabevi, Eskişehir. 1999.
7. Ghosh R, Ghosh PK; The effect of tobacco smoking on the frequency of sister chromatid exchanges in human lymphocyte chromosomes. Cancer Genet Cytogenet 1987; 21(1):15-9.
8. Pendzich J, Motzkiewicz G, Michalska J; Sister chromatid exchanges and high-frequency cells in men environmentally and occupationally exposed to ambient air pollutant: an intergroup comparison with respect to seasonal changes and smoking. Mutat Res. 1997; 381: 163-70.
9. Sabti KA, Lloyd DC, Edwards AA and Stegnar P; A survey of chromosomal damage in Slovenian workers exposed to occupational clastogens. Mutat Res. 1992; 280:215-23.
10. Bender MA, Preston RJ, Leonard S, Anders R; Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchange frequencies in peripheral lymphocytes of large human population sample. Mutat Res, 1988; 204:421-33.
11. Ogova Y, Imaki M, Yoshida, Shibakawa M, Tanada S; An epidemiological study on the association between the total leukocyte and neutrophil counts, and risk factors of ischemic heart disease by smoking status in Japanese factory workers Appl Human Sci 1998; 17(6):239-247.
12. Boscarino JA, Chang J; Higher abnormal leukocyte counts 20 years after exposure to severe stress. Psychosom Med, 1999; 61(3):378-386.
13. Hansen LK, Grimm RH, Neaton JD; The relationship of white blood cell count to other cardiovascular risk factors. Int J Epidemiol, 1990; 19(4):88 1-88.