

Sigaranın DNA Hasarı ve Kan Glutasyon Düzeyi Üzerine Etkisi

INFLUENCE OF SMOKING ON DNA DAMAGE AND BLOOD GLUTATHIONE LEVEL

Yıldız DİNÇER*, Eyüp İlker SAYGILI**, Tülay AKÇAY***

* Ph.D., İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya AD,

** M.Sc. Biyolog, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyokimya AD,

*** Prof.Dr., İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Biyokimya AD, İSTANBUL

Özet

Amaç: Sigara kullanımı belirli kanser türleri için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Sigara kullanımı ile oluşan serbest radikaller (SR) DNA ile etkileşerek karsinogenezde önemli rol oynarlar. SR'in zararlı etkilerine karşı koruyucu olan endojen antioksidanların düzeyi oksidatif strese ve kansere karşı duyarlılığı belirler. Bu çalışmada erkeklerde sigara kullanımının güçlü bir endojen antioksidan olan indirgenmiş glutasyon (GSH) düzeyi ve DNA hasarı üzerine etkisinin incelenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metod: Günde 20 adet sigara içen 27 ve sigara alışkanlığı olmayan 23 sağlıklı erkek olgu çalışma kapsamına alındı. Olgulardan heparinli venöz kan örnekleri alınarak, tam kanda GSH düzeyi ve lökosit DNA'sında DNA hasarının göstergesi olarak DNA zincir kırıkları sıklığı belirlendi. GSH düzeyi spektrofotometrik yöntemle, DNA zincir kırıkları sıklığı Comet assay (tek hücre jel elektroforezi) ile ölçüldü.

Bulgular: Sigara kullanan erkeklerde sigara kullanmayan erkeklere göre GSH düzeyinin anlamlı olarak düşük ($P<0.001$), DNA zincir kırıkları sıklığının ise anlamlı olarak yüksek ($P<0.001$) olduğu belirlendi. DNA zincir kırıkları sıklığı ile GSH arasında negatif bir korelasyon bulundu ($r: -0.62, P<0.01$).

Sonuç: Sigara kullanan erkek olgularda GSH düzeyinin azalması nedeniyle DNA hasarının arttığı düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Sigara, DNA hasarı, Comet assay, Glutasyon

T Klin Tıp Bilimleri 2003, 23:108-111

Summary

Purpose: Smoking habit is accepted as an important risk factor for certain types of cancer. Free radicals derived from smoking play an important role in the carcinogenesis by interacting with DNA. Susceptibility to oxidative stress and cancer is determined by the status of endogenous antioxidants which are protective against the harmful effects of free radicals. The aim of the present study was to evaluate the DNA damage and status of reduced glutathione (GSH) which is a powerful endogenous antioxidant in male smokers.

Materials and Methods: 27 male smokers (smoking 20 cigarette per day) and 23 male nonsmokers were included the study. They were not suffering from any disease. Venous blood was taken into heparinised tubes. Whole blood GSH level and DNA strand breakage frequency as an index for DNA damage in leukocyte DNA were measured. A spectrophotometric method and the Comet assay (single gell cell electrophoresis) were used for the determination of GSH and DNA strand breakage frequency, respectively.

Results: Whole blood GSH level was found to be decreased ($P<0.001$) but DNA strand breakage frequency was found to be increased ($P<0.001$) in male smokers as compared to controls. A negative correlation was determined between DNA strand breakage frequency and GSH ($r: -0.62, P<0.01$).

Conclusion: It was thought that DNA damage is increased because of decreased GSH level in male smokers.

Key Words: Smoking, DNA damage, Comet assay, Glutathione

T Klin J Med Sci 2003, 23:108-111

Epidemiyolojik çalışmalar sigara kullanımı ile akciğer, larinks, özofagus, böbrek ve mesane kanserleri arasında güçlü bir ilişki bulunduğunu göstermektedir (1-3). Sigara dumanının hem gaz hem de katran fazı majör karsinojenler olarak tanımlanan polisiklik aromatik hidrokarbonları, aromatik aminleri ve tütün-spesifik nitrozaminleri içerir (4). Ayrıca sigara dumanının bir dizi serbest radikal (SR) türeği içerdiği gösterilmiştir. Özellikle nitrik oksid (NO) ve azot dioksit (NO₂) ile oksijen ve

karbon merkezli radikaller gaz fazında bulunurken (5), katran fazında temel olarak hidrokinon-kinon siklusu tarafından üretilen radikaller bulunur (6). SR organizmanın makromoleküllerine, özellikle lipid, protein ve DNA yapısına zarar verirler. SR'in DNA ile etkileşimi ile baz modifikasyonları ve fosfodiester bağlarının hidrolizi sonucu da DNA zincir kırıkları oluşur (7).

Hücrelerde SR'in bu zararlı etkilerine karşı koruyucu

olan antioksidan savunma sistemleri mevcuttur. Hücre içi antioksidan sistemin en önemli bileşeni olan glutatyon (GSH), indirgenmiş durumdaki-SH grupları aracılığı ile hücreyi serbest radikallere karşı korur (8). Bu işlem sırasında oksitlenen GSH, glutatyon redüktaz tarafından rejenere edilir.

Sigara kullanımı ile DNA hasarı arasındaki ilişkiyi araştıran bundan önceki çalışmalara ait bulgular çelişkilidir. Bazı araştırmacılar sigara kullanımının DNA hasarını arttırdığını (9-13), bazıları ise etkilemediğini bildirmişlerdir (14,15). Yapılan literatür taramasında sigara kullananlarda DNA hasarı-GSH ilişkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmadı. Diğer taraftan fizyolojik koşullarda oksidan ve antioksidan sistem arasında bir denge bulunduğu, oksidatif stresin arttığı durumlarda bu dengenin bozulup GSH düzeyinin azaldığı, GSH düşüklüğünde oksidatif strese duyarlılığın arttığı bilinmektedir (16,17). Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada sigara kullananlarda DNA hasarı ve GSH düzeyini birlikte değerlendirerek, sigara aracılı DNA hasarında glutatyonun rolünü belirlemeyi amaçladık.

Materyal ve Metod

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi personeli arasından seçilen sigara kullanan (20 adet/gün) 27 sağlıklı erkek gönüllü çalışma grubunu oluşturdu. Sigara kullananların yaş ortalaması 25±5 olup, ortalama sigara kullanım süresi 5±2 yıldır. Sigara alışkanlığı ve pasif içiciliği olmayan, yaş ortalaması 23±6 olan 23 sağlıklı erkek gönüllü ise kontrol grubunu oluşturdu. Çalışmaya katılan gönüllülerin yaşam ve beslenme tarzları benzer olup, son bir ay içinde alkol almamışlardı ve herhangi bir ilaç ya da antioksidan vitamin kullanmıyorlardı. Gönüllülerden 3 ml heparinli venöz kan alınarak kanda GSH düzeyi ve lökosit DNA'sında DNA hasarının göstergesi olarak doğal DNA zincir kırıkları sıklığı belirlendi.

GSH düzeyi Beutler'in (18) spektrofotometrik yöntemi ile ölçüldü. 0.2 ml kan 0.8 ml distile suyun üzerine eklenerek hemolizat hazırlandı. Hemolizata 3 ml deproteinizasyon çözeltisi (1.67 g meta fosforik asid+ 0.2 g etilendiamin tetra asetik asid+ 30 g sodyum klorür 100 ml distile suda çözülerek hazırlandı) eklenip, 5 dakika bekletildikten sonra süzülde. 2 ml süzüntüye 8 ml fosfat tampon (pH:7.4) ve 1 ml 5,5' ditiobis 2- nitrobenzoik asid (DTNB) çözeltisi (%1 sodyum sitrat içinde 40 mg DTNB çözülerek hazırlandı) eklendi. GSH'ın DTNB ile oluşturduğu sarı renkli bileşimin 432 nm'deki absorbansı köre karşı okundu. Molar absorbtivite katsayısı ($1.36 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak konsantrasyon hesaplandı ve GSH düzeyi $\mu\text{mol/g Hb}$ olarak ifade edildi. Hemolizatın Hb konsantrasyonu Drabkin ayracı ile belirlendi (19).

Lökosit DNA'sında zincir kırıkları sıklığı Comet assay ile belirlendi (20). Comet assay (tek hücre jel elektroforezi) DNA hasarını belirlemek amacıyla son

Tablo 1. Kontrol ve sigara kullanan erkeklerde GSH düzeyleri ve DNA zincir kırıkları sıklığı

	Kontrol (n:23)	Sigara Kullanan (n:27)
Kan GSH ($\mu\text{mol/g Hb}$)	5.35±0.58	4.53±0.58*
DNA zincir kırıkları sıklığı (au)	75±11	192±20*

* P<0.001 (Kontrol grubuna göre)

gevşeyerek açıldı. Alkali ortamda elektroforez uygulandıktan sonra pH nötralize edilip, etidyum bromidle boyanarak floresan mikroskopunda incelendi. Elektroforez sırasında anoda doğru hareket eden DNA bir kuyruklu yıldız görüntüsü verir. DNA'nın sağlam kısmı yıldızın başını, kırık parçalar ise kuyruğunu oluşturur. Floresan mikroskopunda verdikleri görüntüye göre DNA'lar hasar bakımından 5 kategoriye ayrılırlar. Hasarsız DNA kuyuksuz yıldız görünümündedir ve 0 kategorisini oluşturur. Çok hasarlı DNA'da ise kuyruklu yıldızın baş kısmı yoktur sadece kuyruk görünümündedir, 4 kategorisini oluşturur. Çok az, az ve orta derecede hasarlı DNA kuyruk kısmının genişliğine göre 1,2 ve 3 kategorilerini oluşturur. Çalışmada her olgu için iki lam hazırlanıp, her lam üzerinde 100 adet nükleoid DNA incelenerek ortalama alındı, her bir kategorideki DNA sayısı saptanarak DNA zincir kırıkları sıklığı arbitrary unite (au) olarak ifade edildi. (au) kuyruk kısmında bulunan % DNA'yı göstermektedir (22).

Değerler ortalama \pm standard sapma (SD) olarak verildi. Ortalamalar arasındaki farkın anlamlılık yönünden değerlendirilmesi student's t testi ile yapıldı. P< 0.05 istatistik olarak anlamlı kabul edildi. Parametreler arasındaki ilişki Pearson korelasyon katsayısı ile değerlendirildi.

Bulgular

Çalışmada sigara kullanan ve kullanmayan olgularda GSH düzeyi ile DNA hasarının göstergesi olarak belirlenen DNA zincir kırıkları sıklığı Tablo 1'de verilmiştir. Sigara kullanan olgularda DNA zincir kırıkları sıklığının sigara kullanmayan olgulardakine göre ileri derecede anlamlı olarak yüksek (P<0.001), buna karşılık GSH düzeylerinin ileri derecede anlamlı olarak düşük (P<0.001) olduğu belirlendi. Parametreler arasındaki ilişki incelendiğinde DNA zincir kırıkları sıklığı ve GSH arasında orta derecede bir korelasyon (r: -0.62, P<0.01), bulundu.

Tartışma

Sigaranın genetik hasar oluşturarak kansere neden olduğu ileri sürülmekle birlikte (23), sigara kullanan kişilerde DNA hasarını inceleyen çalışmaların sonuçları

çelişkilidir. Cloos ve ark (14) baş ve boğaz skuamoz hücre tümörü olan hastalarda yaptıkları çalışmada sigara kullanımının lenfosit DNA hasarını etkilemediğini ifade etmişlerdir. Benzer olarak, sürekli düşük doz iyonize edici radyasyona maruz kalan işçilerde DNA hasarının comet assay ile değerlendirildiği bir çalışmada sigara kullanımının DNA hasarı üzerine etkisi olmadığı bildirilmiştir (15). Hücrelerde genetik bilginin korunmasını sağlayan DNA onarım sistemleri vardır. Bu sistemlerin hemen hepsi indüklenbilir niteliktedir (24). Buradan yola çıkarak sürekli sigara kullanımının onarım sistemlerini uyardığı ve bu nedenle DNA hasarında bariz bir artış gözlenmediği düşünülebilir. Nitekim, sigara kullananlarda sigaranın içerdiği genotoksik maddelerce indüklenen DNA hasarına karşı direnç geliştiğini ifade eden çalışmalar mevcuttur (25,26).

Diğer taraftan, Popp ve arkadaşları (9) sigara alışkanlığı ile DNA zincir kırığı sıklığı arasında anlamlı bir ilişki bulunduğunu; Betti ve arkadaşları (10) sigara kullanımının lenfositlerde DNA hasarını arttırdığını bildirmişlerdir. Daha sonraları, Yang ve ark (11) insan B lenfosit hücre kültüründe yaptıkları çalışmada sigara dumanına maruz kalan hücrelerde; Piperakis ve ark (12) ise sigara kullanan kişilerin lenfositlerinde, DNA zincir kırıklarının anlamlı bir şekilde arttığını ifade etmişlerdir. Benzer olarak, Dhawan ve ark (13) sigara kullanan kişilerde DNA hasarının kullanmayan kişilerdekine göre daha yüksek olduğunu, bu hasarın içilen sigara sayısı ile orantılı olarak arttığını ve ayrıca sigara kullanan yaşlılarda DNA zincir kırığı sıklığının sigara kullanan gençlerdekine göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Şardaş ve ark (27) diyabetik hastalarda DNA hasarını comet assay ile değerlendirdikleri çalışmada hem kontrol grubu hem de diyabetik grupta, sigara kullanan olgularda DNA hasarının kullanmayan olgulardakine göre daha yüksek olduğunu ifade etmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen veriler sigara kullanan erkeklerde DNA hasarının arttığı görüşünü kuvvetle desteklemektedir.

Hücrel antioksidan savunmanın güçlü bir bileşeni olan GSH'nın sigara kullanan gençlerde artmış oksidatif strese karşı dengeleyici olarak arttığı ancak, sigara kullanan 40 yaş üstü kişilerde böyle bir etkinin görülmediği ileri sürülmüştür (28). Buna karşılık Banerjee ve ark (29) sigara kullanan kişilerde kanda lipid peroksidlerinin artıp, GSH düzeyinin azalmış olduğunu ifade etmişlerdir. Lane ve ark (30) ise kronik sigara içicilerinin sigarayı tamamen bırakmalarından 3 hafta sonra kan GSH düzeyinin anlamlı olarak arttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda sigara kullanan kişilerde kan GSH düzeyinin sigara kullanmayan kişilerdekine göre daha düşük olarak bulundu. Bu düşüklüğün SR'in inaktivasyonunda GSH'nın kullanılarak azalmasından ileri geldiği düşünülmektedir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda sigaranın genotoksik etkisi ve kan GSH düzeyi ile ilişkisi hep ayrı olarak araştırılmıştır. Oysa organizmadaki makromoleküllerin oksidatif strese karşı duyarlılığı endojen antioksidan savunmanın yeterliliği ile yakından ilişkilidir (31). Sigara kullanan kişilerde DNA hasarı ve kan GSH düzeyini birlikte değerlendirdiğimiz bu çalışmada, kan GSH düzeyinin sigara kullananlarda artmış oksidatif strese bağlı olarak azaldığı belirlendi. Organizmada GSH dışında süperoksid dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz gibi enzimik yapıda ve ayrıca vitamin A, vitamin C, vitamin E gibi besinsel antioksidanlar da vardır. Gelecekteki çalışmalarda bu antioksidanların da araştırılması, sigara aracılı DNA hasarında antioksidan savunmanın rolünü daha net bir şekilde ortaya koyacaktır.

KAYNAKLAR

1. McLaughlin JK, Hrubec Z, Heineman EF, Blot WJ, Fraumeni JF, Jr. Renal cancer and cigarette smoking in a 26-year follow-up of U.S. veterans. *Public Health Rep* 1990; 105: 535-9.
2. Chow WH, McLaughlin JK, Hrubec Z, Nam JM, Blot W. Tobacco use and nasopharyngeal carcinoma in a cohort of U.S. veterans. *Int J Cancer* 1993; 55: 538-40.
3. McLaughlin JK, Hrubec Z, Blot WJ, Fraumeni JF, Jr. Smoking and cancer mortality among U.S. veterans: a 26-year follow-up. *Int J Cancer* 1995; 60: 190-3.
4. Hecht SS, Hoffman D. Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco-smoke. *Carcinogenesis* 1988; 9: 875-84.
5. Yoshie Y, Ohshima H. Synergistic induction of DNA strand breakage by cigarette tar and nitric oxide. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1359-63.
6. Kodama M, Kaneko M, Aida M, Inoue F, Nakayama T, Akimoto H. Free radical chemistry of cigarette smoke and its implication in human cancer. *Anticancer Res* 1997; 17: 433-8.
7. Halliwell B, Aruoma OR. DNA damage by oxygen derived species. Its mechanisms of action and measurements in mammalian system. *FEBS Lett.* 1991; 281: 9-19.
8. Konukoğlu D, Akçay T, Dinçer Y, Hatemi H. The susceptibility of red blood cells to autoxidation in type 2 diabetic patients with angiopathy. *Metabolism* 1999; 48(12): 1481-84.
9. Popp W, Schell C, Kraus R, Vahrenholz C, Wolf R, Radtke J, Bierwirth K, Norpöth K. DNA strand breakage and DNA adducts in lymphocytes of oral cancer patients. *Carcinogenesis* 1993; 14(11): 2251-6.
10. Betti C, Davini L, Giannesi N, Noprieno and R. Barale. Comparative studies by Comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat Res* 1995; 343: 207-10.
11. Yang Q, Hergenahn M, Weninger A, Bartsch H. Cigarette smoke induces direct DNA damage in the human B-lymphoid cell line Raji. *Carcinogenesis* 1999; 20(9): 1769-75.
12. Piperakis SM, Petrakou E, Tsilimigaki S. Effects of air pollution and smoking on DNA damage of human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 2000; 36(3): 243-9.
13. Dhawan A, Mathur N, Seth PK. The effect of smoking and eating habits on DNA damage in Indian population as measured in the Comet assay. *Mutat Res* 2001; 474(1-2): 121-8.
14. Cloos J, Steen I, Timmerman AJ, van der Schans GP, Snow GB, Braakhuis BJ. DNA damage processing in blood lymphocytes of head and neck squamous cell carcinoma patients is dependent on tumor site. *Int J Cancer* 1996; 68(1): 26-9.

15. Wojewodzka M, Kruszewski M, Iwanendo T, Collins AR, Szumeil I. Lack of adverse effect of smoking habit on DNA strand breakage and base damage, as revealed by the alkaline Comet assay. *Mutat Res* 1999; 440: 19-25.
16. Ahn H, Lee E, Kim K, Lee C. Effects of glutathione and its related enzymes on chemosensitivity of renal cell carcinoma and bladder cell lines. *J Urology* 1994; 151: 263-7.
17. Shan S, Aw YT, Jones DP. Glutathione dependent protection against oxidative injury. *Pharma Ther* 1990; 47: 61-71.
18. Beutler E, Duran O, Duarte BMK. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 51:882-8.
19. Van Kampen EJ, Zijlstra WG. Determination of hemoglobin and its derivatives. *Adv Clin Chem* 1965; (8): 141-87.
20. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; (175): 184-91.
21. Collins A, Horvathova E. Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay. *Biochem Soc Trans* 2001; 29 (2): 337-41.
22. Collins AR, Ai-guo M, Duthie SJ. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res* 1995; 336: 69-77.
23. Giray B, Gürbay A, Hıncal F. Kanser: oluşumu, risk faktörleri ve korunma. *Sendrom* 1996; 8(5): 96-107.
24. Ames BN, Profet M, Gold LS. Nature's chemical and synthetic chemicals: Comparative toxicology. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87: 7782-6.
25. Oesch F, Hengstler JG, Fuchs J. Cigarette smoking protects mononuclear blood cells of carcinogen exposed workers from additional work exposure-induced DNA single strand breaks. *Mutat Res* 1994; 321: 175-85.
26. Palus J, Dziubaltowska E, Rydzynski K. DNA single-strand breaks and DNA repair in the lymphocytes of wooden furniture workers. *Mutat Res* 1998; 408: 91-101.
27. Şardaş S, Yılmaz M, Öztok U, Çakır N, Karakaya AE. Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation. *Mutat Res* 2001; 490: 123-9.
28. Liu CS, Wei YH. Age-associated alteration of blood thiol group-related antioxidants in smokers. *Environ Res* 1999; 80(1): 18-24.
29. Banerjee KK, Marimuthu P, Sarkar A, Chaudhuri RN. Influence of cigarette smoking on vitamin C, glutathione and lipid peroxidation status. *Indian J Public Health* 1998; 42(1): 20-3.
30. Lane JD, Opara EC, Rose JE, Behm F. Quitting smoking raises whole blood glutathione. *Physiol Behav* 1996; 60(5): 1379-81.
31. Sun YI. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 1990; 8: 583-99.

Geliş Tarihi: 01.07.2002

Yazışma Adresi: Dr. Yıldız DİNÇER

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi,
Biyokimya AD, İSTANBUL
stare63@yahoo.com