

KÜTAHYA KENTSEL VE KIRSAL İSTASYONLARINDA TOPLANAN PARTİKÜL MADDENİN İN VİTRO GENOTOKSİSİTE VE SİTOTOKSİSİTE DEĞERLENDİRMESİ

Gonca ÇAKMAK DEMİRCİGİL^{1(*)}, Esra EMERCE¹, Pelin ERTÜRK², Akif ARI²,
Roel F. SCHINS³, Sema BURGAZ¹, Eftade O.GAGA²

¹Gazi üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, F. Toksikoloji AD, Ankara

²Anadolu Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Eskişehir

³IUF-Leibniz Research Institute for Environmental Medicine, Düsseldorf, Germany

ÖZET

Kütahya kentinde termik santraller ve endüstriyel hava kirliliği kaynakları bulunmaktadır. Kütahya kentinde hava kalitesini değerlendirmek üzere gerçekleştirilmekte olan araştırmanın amacı toksik hava kirleticilerinden partikül maddenin (PM) sağlık etkilerinin in vitro genotoksosite ve sitotoksosite yöntemleri ile belirlenmesidir. Kütahya'da biri kent merkezinde, diğeri termik santrallerin yakınında bulunan iki ayrı istasyonda, bir yıl boyunca aktif ölçüm yöntemi ile 24 saatlik PM örnekleri toplanmıştır. Araştırmanın ilk kısmında, genotoksosite için Comet yöntemi, sitotoksosite için ise tripan mavisi yöntemi kullanılmıştır. Burada, araştırmanın şu ana kadar gerçekleştirilen ön çalışmaları sunulacaktır. Genotoksosite çalışmalarında solunum yolunu temsil eden kanser hücre hattı olan A549 insan akciğer epitellerinde çalışılmıştır. Yapılan ön çalışmalarda deneylerde kullanılacak PM kütlesine ve deney koşullarına karar verilmiştir. Ön denemelerden sonra belirli sayıda PM örneğinde DNA hasarına ve sitotoksitesine yönelik doz yanıt çalışması gerçekleştirilmiştir. İlk veriler ışığında araştırmaya ait örneklerde mevsimsel ve yöresel PM toksisitesini tek bir PM konsantrasyonunda ve bütün yılı temsil edecek örnek sayısında yapılması kararı alınmıştır.

ABSTRACT

Within Kütahya center and province thermal power plants and other industrial air pollution sources are located. The aim of the present study, as a part of the air quality estimation of Kutahya, was to determine health effects of particulate matter (PM) as one of the toxic air pollutants via in vitro genotoxicity and cytotoxicity assays. The 24 h daily PM samples have been collected for one year, from two active sampling stations. One of them was installed in Kütahya center and the other one was close to the thermal power plants. In the preliminary study comet assay as the measure of genotoxicity and trypan blue assay as the measure of cytotoxicity have been carried out. Herein, the preliminary results will be presented. A549 human lung epithelial cancer cell line, the representative of the respiratory system, has been used for the experiments. In the pre-trials, the PM mass and experimental conditions were decided. Thereafter, in some PM samples dose response experiments for DNA damage and cytotoxicity evaluation were carried out. In the light of the preliminary results it has been decided to examine the seasonal and stationary PM toxicity in only one concentration in the number of samples those capable to represent whole sampling year.

* goncacad@gmail.com

ANAHTAR SÖZCÜKLER

Partikül Madde, Genotoksisite, Sitotoksisite, Sağlık Etkisi, Hava Kirleticileri

1. GİRİŞ

Aralarında PM'lerin de yer aldığı; çözünürlüğü az ya da çözünmeyen partiküllerin ne tür toksisiteye, hangi konsantrasyonlarda, hangi özelliklerine dayanarak ve nasıl bir mekanizma ile yol açtıkları toksikoloji biliminin araştırma konuları arasındadır. İn vivo, in vitro çalışmalardan epidemiyolojiye kadar pek çok yaklaşım ile bu sorulara yanıt aranmaktadır. Solunum yolunun ana maruziyet yolu olması, araştırmalarda hedef hücre ve dokular akciğere ait seçilmekte, özellikle de kanser gibi ciddi hastalıklara odaklı araştırmalar yürütülmektedir. Genotoksisitenin kansere giden yolda ara basamak olarak kabul edilmesi nedeniyle de genotoksisite yöntemleri araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Cakmak vd., 2010). Bireylerin günlük hava kirliliği maruziyetlerine yönelik özellikle toplumun duyarlı kesimlerinden olan çocuklarda biyoizleme çalışmalarında da genotoksisite yöntemlerinin kullanımına rastlanmaktadır (Demircigil vd., 2014). Günlük yaşamda genel popülasyonun özellikle trafik ve ısınma kaynaklı maruz kalabildiği partikül maddeler üzerine in vitro araştırmalar ise özellikle toksisite mekanizmalarını anlayabilmek adına artarak devam etmektedir (Hornberg vd., 1998; Gábelová vd., 2007; Roubicek vd., 2007; Perrone vd., 2010; Gualtieri vd., 2012). Sözü edilen çalışmalarda; kentsel hava kirliliğinin bölgesel, mevsimsel PM ölçümleri, PM fiziksel ve kimyasal bileşimi incelenmekte, ayrıca alınan örneklerin olası genotoksik etkinlikleri de solunum sistemini temsil edebilecek, akciğer epitel hücreleri gibi hedef dokularda comet ve mikroçekirdek yöntemi gibi tekniklerle belirlenmeye çalışılmaktadır. Bu tür in vitro araştırmalar, PM'lerin boyutuna, yüzeyine tutunan kimyasallara bağlı olarak olası sağlık etkilerinin mekanizmalarını ortaya koymak için olanak sağlayabilmektedir. Bu çalışmanın amacı Kütahya'da biri kent merkezinde, diğeri termik santrallerin yakınında bulunan iki ayrı istasyonda, bir yıl boyunca aktif ölçüm yöntemi ile 24 saatlik toplanan PM örneklerine yönelik, genotoksisite ve sitotoksisite yöntemleri uygulayarak mevsimsel ve bölgesel toksisite değişimlerini incelemek ve elde edilen sonuçları hava kalitesi ölçümleri ile ilişkilendirebilmek üzere ön değerlendirmelerin yapılmasıdır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. PM örneklerinin hazırlanması

PM örneklerinin toplanması. Stack filtre üniteleri (SFU) kullanılarak Kütahya merkez ve Tavşanlı Göbel istasyonlarında, nucleopore filtreler üzerinde ince (PM_{2.5}) ve kaba (PM_{2.5-10}) partikül madde örnekleri toplanmıştır. 24 saatlik örnekler, 16.7 L/dak debi ile her iki istasyonda eş zamanlı olarak toplanmıştır.

PM'nin filtrelerden ekstraksiyonu ve liyofilizasyonu. Filtre üzerinde toplanan örnekler sulu faz içine alınmıştır. Bu amaçla steril falkon tüpünün içine konan filtre örneği vorteks ve ultrasonik banyoda 5 dakika tutulmuştur. Filtre içinden çıkarıldıktan sonra liyofilizatör yardımı ile sudan uzaklaştırılmıştır. İkili tartım kontrolleri ile filtre üzerinden alınan partikül madde miktarı belirlenmiştir.

2.2.Hücre kültürü çalışmaları

Hücre kültürü için gerekli besi yerinin hazırlanması. İnsan A549 akciğer kanser epitel hücreleri (ATCC) Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Biochrom), %1 L-glutamin (200 mM, Biochrom), %1 penisilin/streptomisin (Biochrom), %10 fetal dana serumu (FBS, Biochrom) 37 °C'de ve %5 CO₂ koşullarında kültüre alınmıştır. Besiyeri kullanılabildiği kadar buzdolabında tutulmuş, hücrelerle muamele edileceği zaman ise 37 °C'ye getirilmiştir.

Hücre kültüründe hücrelerin genotoksisite ve sitotoksisite deneylerine hazırlanması. 75 ya da 25 cm² flasklarda çoğaltılan hücreler, deneylerin yapılacağı 96 gözlü petriplerin her bir gözüne 15000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. 24 saat sonra hücrelerin üzerine test edilecek hidrojen peroksit ya da PM örneği gerekli konsantrasyon aralığında, her bir konsantrasyon için en az iki göz kullanılarak muamele edilmiştir. Hidrojen peroksit için 30 dakika buz üstünde tutularak inkübasyon sağlanmış, PM örneği için ise 4 saat ve 24 saatlik uygulama 37 °C'de ve %5 CO₂ koşullarında yapılmıştır. Hidrojen peroksit çözeltisinden gerekli konsantrasyonlar, ışıktan korunarak ve taze hazırlanmıştır. PM örnekleri ise, liyofilizatın besiyerinde ya da Hank's balanced Salt Solution (HBSS, Biochrom) içinde suspanse edilmesi, vortekslenmesi ve sonikasyonundan sonra hücrelere verilmiştir. Sürelerin sonunda comet yöntemi ve tripan mavisi yöntemi için hücreler tripsin (Biochrom) kullanılarak toplanmıştır.

DNA hasarının Comet yöntemi ile incelenmesi. Yöntem için hücrelerin yukarıda adı geçen etkenlerle inkübasyonu sonucu Comet Yöntemi'ne geçilmesi, yöntemin standardizasyonu gerçekleştirilmiştir. Comet yönteminde bir önceki basamakta toplanan her bir petri gözüne ait hücreler düşük erime sıcaklıklı agarlar (LMA) karıştırılıp, önceden yüksek erime sıcaklıklı agar (HMA) ile kaplanmış lamalar üzerine yayılmıştır. Hücreler bir gece lize edildikten sonra elektroforezde alkali ortamda işlem görmüş, işlem sonucu nötralize edilmiş, etidyum bromür ile boyanarak floresan mikroskopta ve ilgili yazılım yardımıyla değerlendirilmiştir (Zeiss Axioscope Mikroskop, Perspectives IV Software). Comet yönteminde nicel ölçümü yapılan pek çok parametre arasında istatistiksel analizlere konu olan parametreler bilimsel literatürde kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk ivmesi(momenti)dir. Değerlendirmeler bu parametreleri kullanarak yapılmıştır. Her bir lamda 50 hücre değerlendirilmiştir.

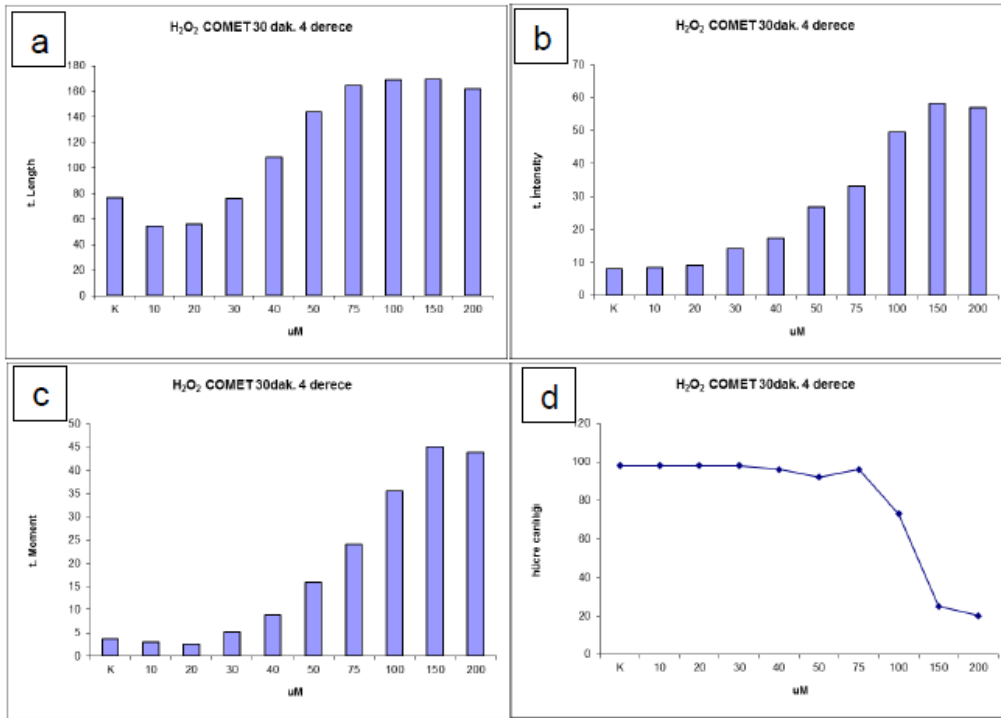
Sitotoksisitenin tripan mavisi yöntemi ile incelenmesi. Comet Yöntemi için hazırlanan deney ortamında elde edilen hücreler LMA ile karıştırılmadan önce 10 µl hücre suspansiyonu, 10 µl tripan mavisi ile karıştırılıp, hemasitometre üzerine yayılmıştır. Işık mikroskopunda hücreler sayılmış ve içlerinde mavi olanlar kaydedilmiştir. Hücrelerin mavi olanlarının yüzde değerleri hesaplandığında bu değer sitotoksisite miktarını oluşturmuştur. Hücre canlılığını kaybettiğinde, mavi boyayı içine alarak renklenmektedir. %70'in altında canlılık olan konsantrasyonlarda comet yöntemi uygulanmamaktadır.

İstatistiksel analiz. İstatistiksel analizler Graphpad Prism 5 (GraphPad Software, Inc.; demo) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Uygulanan doz gruplarında tanımlayıcı istatistikler ve normal dağılım değerlendirmesi yapılmış, gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal Wallis yöntemi kullanılmıştır. Gruplar arasında fark olması durumunda Dunn Çoklu Karşılaştırma Testi ile ileri analizler gerçekleştirilmiştir. Anlamlılık düzeyi $\alpha=0.05$ olarak kabul edilmiştir.

3. SONUÇLAR

3.1. Hücre kültüründe genotoksisite ve sitotoksisite deneyleri

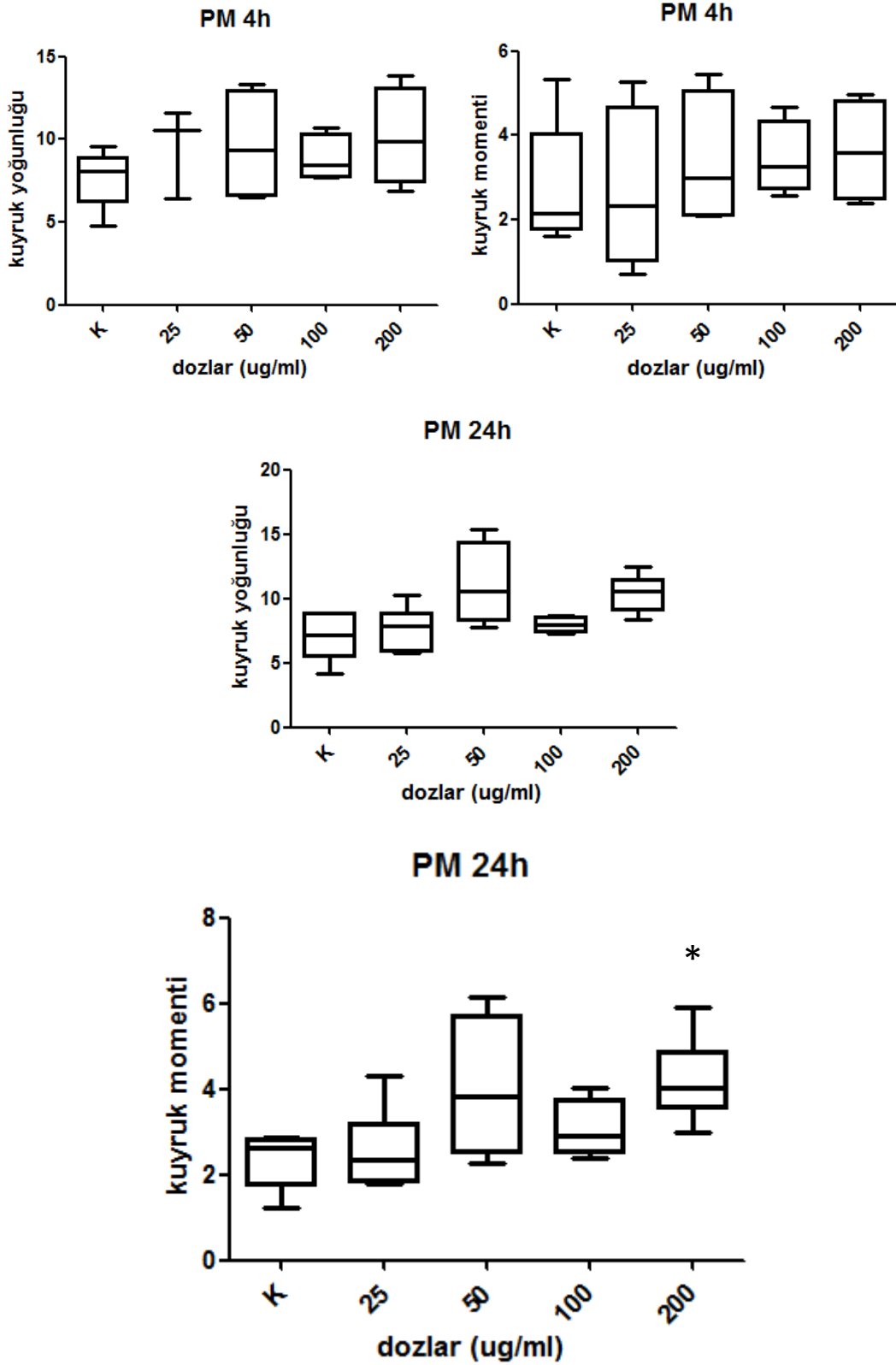
Hidrojen peroksit genotoksisitesi ve sitotoksisitesi. Hidrojen peroksitin pozitif kontrol olarak comet yönteminde uygulanmasında 30 ve 75 μ M konsantrasyonların belirgin DNA hasarını hücrelerde kuyruk oluşumu ile gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 1, a-c). Bu konsantrasyonlardan biri ya da ikisi birden, PM örneklerine yönelik yapılacak her comet deneyinde kullanılmaktadır. Hücre canlılığı da 30 ve/veya 75 μ M konsantrasyonları için sınır değer kabul edilen % 70 değerinin üstündedir(Şekil 1, d).



Şekil 1. Comet yöntemi ile pozitif kontrol hidrojen peroksit deney sonuçları (a: kuyruk uzunluğu, b: kuyruk yoğunluğu, c: kuyruk ivmesi, d:hücre canlılığı)

Kütahya yöresine ait F6KUT PM örneğinde genotoksisite ve sitotoksisite. PM genotoksisitesinin ön denemesinde 4 saat ve 24 saatlik deneyler ikişer kez 25-200 μ g/ml konsantrasyon aralığında yapılmıştır. Her bir denemede, her bir konsantrasyon iki kere kullanılmıştır. İki deneyin ortalamalarına ilişkin doz yanıt grafikleri Şekil 2’de verilmiştir. PM 4h uygulamalarında; kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk ivmesi değerlendirmelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur (sırasıyla p= 0.25; p=0.77; p=0.62). PM 24h uygulamalarında ise, kuyruk uzunluğu değişkeni için gruplar arasında istatistiksel bir fark oluşmazken (p=0.24), kuyruk yoğunluğu ve kuyruk ivmesi gruplar arasında farklılık göstermiştir (p=0.033). Ancak kuyruk yoğunluğu değişkenindeki fark, ileri analizde anlamlılığını kaybetmiştir (p>0.05). Bununla birlikte 200 μ g/ml doz grubundaki kuyruk ivmesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir (p<0.05, Şekil 2).

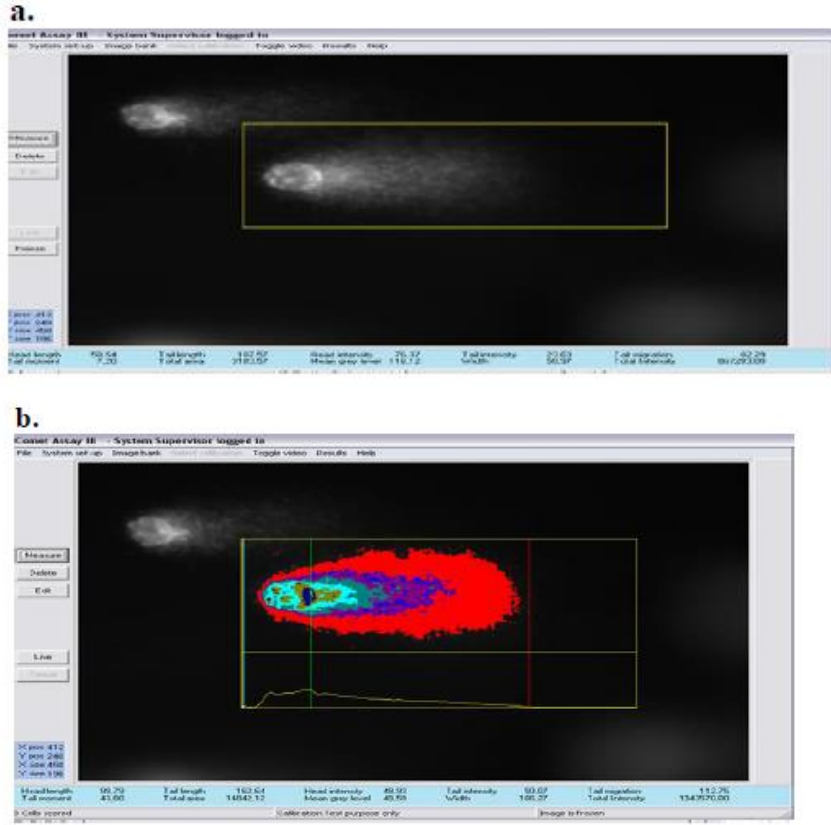
6. Ulusal Hava Kirliliği ve Kontrolü Sempozyumu-2015
7-9 Ekim 2015, İZMİR



Şekil 2. PM örneğinin comet yöntemine göre 4 ve 24 saat uygulama için kuyruk yoğunluğu ve kuyruk ivmesine ait doz yanıt ilişkisi

Comet yöntemi sırasında gerçekleştirilen tripan mavisi sitotoksisite yönteminde ele alınan konsantrasyonlarda sitotoksisite sınır değerlerin üstüne çıkmamıştır.

Comet yöntemi kullanılarak yapılan nicel ölçümlere ait elde edilen fotoğraflar Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. Comet yönteminin COMET Programı ile nicel ölçümünün fotoğraflanması (a.Hücrenin mikroskopta bulunup, programa aktarılmış hali. b.Aynı hücrenin programda matematiksel ölçümünün gerçekleştirilmesi).

5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Hava kirliliğine katkı yaptığı varsayılan bileşenlerden biri partikül madde (PM)dir. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) bağlı Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşu (IARC) tarafından hazırlanmakta olan 109 numaralı monografda dış ortam (outdoor) hava kirliliğini ve hava kirliliği kaynaklı partikül madde insan karsinogeni olarak sınıflandırılmıştır. İlişki kurulan kanser türü akciğer kanseridir, mesane kanserine yönelik de bulgular olduğu belirtilmektedir. Karar ilk olarak 17 Ekim 2013 tarihinde partikül maddenin duyurulmuş ve yayınlanmıştır (Loomis vd. 2013). Buna göre, hava kirliliğinin ana bileşeni olan partikül madde de ayrı değerlendirilmiş ve insan karsinogeni (Grup 1) olarak kabul edilmiştir (Loomis vd., 2013). Dış hava kirliliğinin ana kaynakları olarak, taşıma, termik santralleri(stationary power generation), endüstriyel ve tarımsal emisyonlar, evsel ısınma ve pişirme işlemleri gösterilmektedir(http://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/pdf/pr221_E.pdf). Araştırmada, genotoksisitenin odak noktası olarak seçilmesi IARC'nin de güncel kararı ile desteklenmiştir.

Genotoksisite kanser gelişiminde erken biyolojik etki olarak kabul edilmekte ve ortaya çıkacak kanseri öngörme etkinliği nedeniyle bilimsel araştırmalarda kullanılmaktadır.

Çeşitli PM bileşimine yönelik ölçümlerin, in vitro hedef hücre genotoksisite yöntemi kullanımı ile çeşitlendirilmesi önemli olacaktır. Genotoksisite parametresi olarak kullanmayı planladığımız comet yöntemi, kolay hızlı ve etkin özelliği ile in vitro sistemlerde yaygın kullanılmaktadır (Cakmak vd., 2004; Schins vd., 2002; Tice vd., 2000; Singh vd., 1988). Türkiye’de kentsel hava kaynaklı PM’lere yönelik in vitro genotoksisitenin araştırıldığı başka bir araştırmayla karşılaşılmamıştır. Dolayısıyla, elde edeceğimiz sonuçların ülke ve dünya literatürüne katkısı önemli olacaktır.

6. TEŞEKKÜR

Bu çalışma; 112Y305 numaralı ve "Kütahya'da Hava Kalitesi Belirleme Çalışmaları: Kaynakların Tespiti, Ölçümler ve Sağlık Riski Analizi" başlıklı proje ile TÜBİTAK, 1306F272 numaralı "Kütahya Hava Kalitesinin ve Partikül Madde Genotoksisitesinin Araştırılması" projesi ile Anadolu Üniversitesi BAP komisyonu tarafından desteklenmektedir.

KAYNAKLAR

Cakmak G.D., Coskun E., Vidinli N., Erbay Y., Yilmaz M., Cimrin A., Schins R.P., Borm P.J., Burgaz S., 2010. Increased micronucleus frequencies in surrogate and target cells from workers exposed to crystalline silica-containing dust. *Mutagenesis*, 25(2), 163-169.

Cakmak G.D., Schins R.P.F., Shi T., Fenoglio I., Fubini B., Borm P.J.A., 2004. In vitro genotoxicity assessment of commercial quartz flours in comparison to standard DQ 12 quartz. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 207,105-113.

Demircigil GÇ, Erdem O, Gaga EO, Altuğ H, Demirel G, Özden Ö, Arı A, Örnektekin S, Döğeroğlu T, van Doorn W, Burgaz S., 2014. Cytogenetic biomonitoring of primary school children exposed to air pollutants: micronuclei analysis of buccal epithelial cells. *Environmental Science Pollution Research International*, 21(2):1197-207.

Gábelová A, Valovicová Z, Bacová G, Lábaj J, Binková B, Topinka J, Sevastyanova O, Srám RJ, Kalina I, Habalová V, Popov TA, Panev T, Farmer PB., 2007. Sensitivity of different endpoints for in vitro measurement of genotoxicity of extractable organic matter associated with ambient airborne particles (PM10). *Mutation Research*, 620(1-2):103-13.

Gualtieri M, Longhin E, Mattioli M, Mantecca P, Tinaglia V, Mangano E, Proverbio MC, Bestetti G, Camatini M, Battaglia C., 2012. Gene expression profiling of A549 cells exposed to Milan PM2.5. *Toxicology Letters*. 209(2):136-45.

Hornberg C, Maciuleviciute L, Seemayer NH, Kainka E., 1998. Induction of sister chromatid exchanges (SCE) in human tracheal epithelial cells by the fractions PM-10 and PM-2.5 of airborne particulates. *Toxicology Letters*. 96-97:215-20.

http://www.iarc.fr/en/media-centre/iarcnews/pdf/pr221_E.pdf

6. Ulusal Hava Kirliliği ve Kontrolü Sempozyumu-2015 7-9 Ekim 2015, İZMİR

Loomis D, Grosse Y, Lauby-Secretan B, et al. 2013. The carcinogenicity of outdoor air pollution. *Lancet Oncology*, 4:1262–1263.

Perrone MG, Gualtieri M, Ferrero L, Lo Porto C, Udisti R, Bolzacchini E, Camatini M., 2010. Seasonal variations in chemical composition and in vitro biological effects of fine PM from Milan. *Chemosphere*. 78(11):1368-77.

Roubicek DA, Gutiérrez-Castillo ME, Sordo M, Cebrián-García ME, Ostrosky-Wegman P., 2007. Micronuclei induced by airborne particulate matter from Mexico City. *Mutation Research*, 631(1):9-15.

Schins R.P.F., Knaapen A.M., Cakmak G.D., Shi T., Weishaupt C., Borm P.J.A., 2002. Oxidant-induced DNA damage by quartz in alveolar epithelial cells. *Mutation Research*, 517, 77-86.

Singh N., McCoy M., Tice R., Schneider E.A., 1988. Simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research* 175,184–191.

Tice,R.R., Agurell,E., Anderson,D., Burlinson,B., Hartmann,A., Kobayashi,H., Miyamae,Y., Rojas,E., Ryu,J.-C., Sasaki,Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environmental Molecular Mutagenesis* 35, 206-221.