

Pyrimethamine'in (Daraprim) Lenfosit Kültürlerinde İnsan Kromozomlarının Spiral Oluşumu Üzerine Etkisi

Ünal Egeli*, Bülent Ediz**

ÖZET. Bu çalışmada toxoplasmosis ve malaria tedavisinde kullanılan ve bir folik asit antagonisti olan pyrimethamine'in (Daraprim) insan kromozomlarının spiralizasyon oluşumuna etkisi araştırıldı. Bu amaçla 17 sağlıklı kişinin periferik kan lenfosit kültürlerine pyrimethamine 0.05, 0.1, 0.2 ve 0.4 mg/ml olmak üzere 4 farklı dozda ilave edildi. Yapılan sitogenetik değerlendirme sonucu pyrimethamine'in doz artışına paralel olarak spiral oluşumunu engellemek suretiyle kromozom kondansasyonunu önlediği ve buna ilaveten uzun kromozom sayısını artırdığı belirlendi.

Anahtar Kelimeler .Pyrimethamine .kromozom kondansasyonu .spiralizasyon.

The Effect of Pyrimethamine (Daraprim) on Spiralization Formation of Human Chromosomes in Lymphocyte Culture

SUMMARY. In this study, the effect of pyrimethamine (Daraprim), which is a folic acid antagonist and used in the treatment of toxoplasmosis and malaria, on the formation of human chromosome spiralization is researched. For this purpose, 4 different dosages of pyrimethamine is added into the peripheric blood lymphocyte cultures of 17 different healthy persons. After the cytogenetic and statistic evaluations, it is determined that, parallel to the increase in pyrimethamine dosage, the chromosome condensation is obviated by the prevention of the number of long chromosomes is increased.

Key Words .Pyrimethamine .chromosome condensation .spiralization.

Ökaryot kromozomlarının temel strüktürel birimi DNA ve histon proteinlerinden meydana gelen nükleosom fibrilleridir¹⁻³. Nükleosomlar metafaz kromozomlarının inaktif kromatininin esas yapısını meydana getirirler^{4,8}.

Bir folik asit antagonisti olan pyrimethamine dehidrofolate redüktaz enzimini inhibe ederek DNA replikasyonu için gerekli timidilat ve dolayısıyla timinin sentezini önleyerek DNA molekülü üzerinde çentik ve lezyonların meydana gelmesine sebep olur^{9,10}. Bunun sonucunda aynı zamanda amino asit sente-

zi de engellenir¹¹. Her iki olay nedeni ile histonlar ile DNA'nın etkileşim tarzında değişimler meydana gelebilir. Bu etkileşim farklılığı sonucu nükleosom yapısı bozulabilir. Buna paralel olarak normal spiralizasyon yapısı da bozularak kromozom kondansasyonu tam olarak oluşamaz.

Bu çalışmada amacımız bir folik asit antagonisti olan pyrimethamine'in insan kromozomlarının spiral ve kondansasyon oluşumu üzerine etkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem

İçerisinde % 10 TC medium 199, % 25 Fetal Kalf Serum (FCS), 10 ml/l Phytohemagglutinin M

* Yard. Doç. Dr.; Uludağ Ü. Fen Fak. Genel Biyoloji ABD.

** Araş. Gör.; Uludağ Ü. Tıp Fak. Tıbbi-Biyoloji ABD.

Geliş Tarihi: 3.2.1993

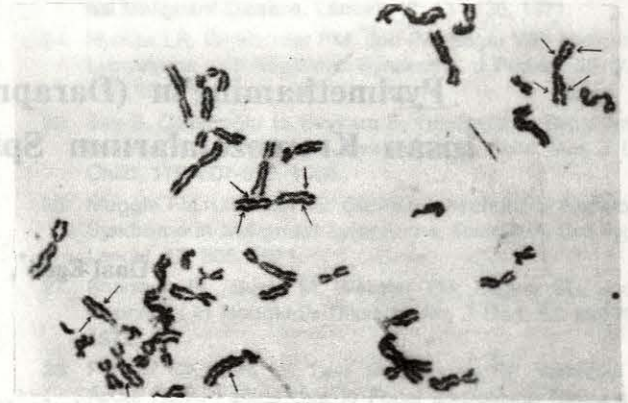
Kabul Tarihi: 5.5.1993

(PHAM) ve % 65 steril distile su bulunan 100 cc stok kromozom kültür ortamı (pH: 7) hazırlandı. Bu solüsyon 5'er cc'lik steril şişelere aktarıldı. 9 kadın, 8 erkek 17 sağlıklı kişiden heparinli steril bir enjektörle 1 cc kan alındı. 5'er cc'lik kromozom kültür ortamına 8'er damla damlatıldı. Bir kültür şişesi kontrol olarak ayrıldıktan sonra diğer kültür şişelerine 0.05, 0.1, 0.2 ve 0.4 mg/ml olmak üzere 4 farklı dozda Pyrimethamine ilave edildi. Kültürler 37°C'lik etüvde 72 saat süre ile inkübe edildikten sonra standart kromozom analiz yöntemi uygulandı¹². Her vakadan üç preparat hazırlanıp Gimza (% 8 Gimza pH: 7) ile boyanarak ışık mikroskobunda incelendi. Her vakadan immersiyon yağı ile 1000 büyütmede 50 metafaz figürü değerlendirilmeye çalışıldı.

Bulgular

Kontrol ve çeşitli dozlarda pyrimethamine içeren gruplardaki toplam spiralizasyon hatalı kromozom ve uzun kromozom sayıları Tablo: 1'de verildi. Verilere ait bir örnek resim Şekil: 1'de gösterildi. Tablodaki veriler regrasyon analiz testi ile değerlendirilerek¹³ pyrimethamine dozu arttıkça spiralizasyon hatası ve uzun kromozom sayısının anlamlı bir şekilde arttığı belirlendi ($p < 0.001$). Ayrıca bu anlamlı artışlar Şekil: 1'de gösterildi ($r_1 = 0.516$,

$p < 0.001$; $r_2 = 0.629$, $p < 0.001$; $r_3 = 0.666$, $p < 0.001$). Kontrol kültürü grubunda toplam hasarlı hücre yüzdesi % 0.26 iken, 0.05 mg/ml pyrimethamine içeren dozda oranın % 5.27'ye çıktığı, 0.4 mg/ml'lik en yüksek dozda ise % 15.4'e eriştiği gözlemlendi.



Şekil: 2

0.2 mg/ml Pyrimethamine içeren dozda muhtelif kromozomlarda kromozom spiralizasyon hatalarını gösteren bir metafaz figürü

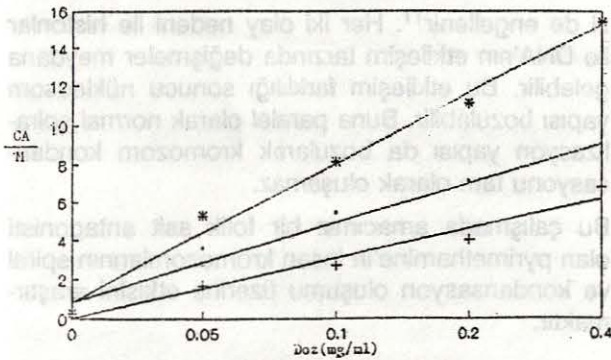
Tartışma

Antimikrobiyal bir ilaç olan pyrimethamine'nin insan lenfosit kromozomları üzerinde muhtelif kromozom strüktür kusurları meydana getirdiği daha önce yaptığımız bir çalışmada belirlenmiştir¹⁴. Bu çalışmada ise pyrimethamine'in insan kromozomlarında doz artışına paralel olarak spiralizasyonu engelleyerek kromozom kondansasyonunu önlediği ve buna ilaveten uzun kromozom sayısını arttırdığı gösterilmiştir.

Pyrimethamine'in timin oluşumunu engelleyerek DNA molekülü üzerinde çentik ve lezyonlara yol açması¹⁰, amino asit sentezini engellemesi¹¹ kromatin yapısını oluşturan nükleozomların histon proteinlerinin oluşumunda ve dolayısıyla nükleozom oluşumunda bozulmalara neden olabilir. Zakharov ve Egolina 1972 yılında Fluorescence Plus Giemsa (FPG) boyama yöntemi ile memeli kromozomlarında bir timin analogu olan BrdU içeren kromatidlerin BrdU içermeyen kromatidlerden daha uzun olduğunu saptamışlardır¹⁵. Kromatidlerdeki bu uzunluk farkı histon proteinleri ile DNA arasındaki etkileşimin farklı olmasından kaynaklanmaktadır^{16,17}. Kromozomların spiralizasyonunda ve kondansasyonunda etkili olan histonlar BrdU içeren DNA'ya BrdU içermeyen DNA'dan daha sıkı bağlanmakta, kromozomların spiralizasyonu ve kondansasyonunu zorlaştırmaktadır¹⁶⁻¹⁸. Muhtemelen BrdU'nun kromozomlardaki esas etkisi 30 nm çapındaki fibrillerin gevşek paketlenmesini sağlamasından kay-

Tablo: I- Pyrimethamine'in lenfosit kromozomları üzerindeki etkisi

Doz (mg/ml)	Hasarlı Hücre Sayısı			Hasarlı Hücre Yüzdesi		
	Metafaz	Spiralizasyon Hatası	Uzun Kromozom	Spiralizasyon Hatası	Uzun Kromozom	Toplam
0	823	0	4	0	0.26	0.26
0.05	790	29	11	40	3.6	5.27
0.1	720	39	20	59	5.4	8.1
0.2	733	54	28	82	7.1	11.1
0.4	693	57	43	100	8.6	15.4



. Sp. Hatası + Uzun krom. * Toplam

Şekil: 1

Pyrimethamine dozu ile spiralizasyon hatası, uzun kromozom sayısı ve toplam kromozom anomali (CA) sayıları arasındaki ilişki

naklanmaktadır. Bunun sonucu uzun kromozomlar meydana gelmektedir. Bazı araştırmacılar bir sistidin analogu olan 5-Azodeoxycytidine'in insan kromozomlarında kromozom kondansasyonunu engellediğini, buna ilaveten uzun kromozom sayısını arttırdığını göstermişlerdir¹⁹⁻²². Bu araştırmalardan da görüldüğü gibi primidin analogları olan BrdU ve 5-Azodeoxycytidine replikasyon esnasında timin ve sitozinin yerine geçerek DNA molekülü üzerinde yanlış baz çiftlerinin oluşumuna ve histonlar ile DNA'nın etkileşim farklılığına sebep olmaktadır. Benzer şekilde pyrimethamine'de replikasyon esnasında timinin oluşumunu engelleyerek tıpkı Methotrexate'in (MTX) etkisinde olduğu gibi muhtemelen timinin yerine urasilin geçmesini sağlayarak²³ DNA molekülü üzerinde yanlış baz çiftlerinin oluşumuna ve histon proteinleri ile DNA'nın etkileşim farklılığına yol açabilir. Sutherland ve Baker 1986 yılında yaptıkları bir çalışmada mitozdaki paketlenme için yetersiz substrat miktarının DNA tek ipliğinde pek çok kırıklar meydana getirdiğini belirtmişlerdir²⁴. Pyrimethamine dTTP havuzunda eksilmeye yol açarak DNA tek ipliği üzerinde çok sayıda gap ve kırıkların oluşmasını sağlayabilir¹⁴. Gap ve kırıklar DNA'nın tamirini ve dolayısıyla da paketlenmesini zorlaştırarak kromozomların spiralizasyonunu ve kondansasyonunu bozabilir. Ayrıca pyrimethamine gibi bir folik asit antagonisti olan MTX'in DNA sentezini interfazın G1/S fazında inhibe etmek suretiyle uzun kromozomların meydana gelmesini sağlaması araştırmamızı desteklemektedir²⁵.

Sonuç olarak, gerek bundan önceki bir çalışmamızda gösterildiği gibi pyrimethamine'nin muhtelif kromozom yapı kusurlarına yol açması, gerekse bu çalışmada gösterildiği gibi spiral ve kromozom kondansasyonunu engellemesi, bu ilacın tedavide dikkatli kullanılması ve tedavi sırasında hastaların uyarılması gerektiğini göstermektedir.

Yard. Doç. Dr. Ünal EGELİ
Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi
Genel Biyoloji ABD
Tel: 4428008 / 21053
16059 Görükle / BURSA

Kaynaklar

1. Prescott DM: The structure and replication of eucaryotic chromosomes, In: *Advances in Cell Biology*. Eds., DM Prescott, L Goldstein E McConcey. Appleton-Century-Crofts. New York, 1970, pp. 57-117.
2. Kavenoff R, Zimm ZH: Chromosome-sized DNA molecules from *Drosophila*. *Chrosoma*. 41: 1-27, 1973.
3. Wolf S, Perry P: Insights on chromosome structure from sister chromatid exchange ratios and the lack of both isolabelling and heterolabelling as a determined by the FPG technique. *Exp. Cell Res*. 93: 23-30, 1975.
4. Finch JT, Klug A: Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 73: 1897-1901, 1976.
5. McGhee JD, Rau DC, Charney E, Felsenfeld G: Orientation of the nucleosome within the higher order structure of chromatin. *Cell*. 22: 831-841, 1983.
6. Colquhoun WR, Holmes DS: Structure of the chromosomal material in inactive nuclei of children red blood cells. *Chrosoma*. 79: 159-167, 1980.
7. Rattner JB, Goldsmith MR, Hamkalo BA: Chromosome organization during male meiosis in *Bombyx mori*. *Chrosoma*. 79, 215-224, 1980.
8. Labhart P, Koller T, Wunderli H: Involvement of higher order chromatin structures in metaphase chromosome organization. *Cell*. 30, 115-121, 1982.
9. Krishaswamy K, Teoh PC: Disease of tropical Environment, In: *Drug Treatment Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2nd ed Ed., SG Avery. Adis Press. Sidney and New York, 1204, 1980.
10. Waxman S, Herbert V: Mechanism of pyrimethamine-induced megaloblastosis in human bone marrow. *N. Eng. J. Med*. 280: 1316-1319, 1969.
11. Laurence DR, Benett PN: *Clinical Pharmacology*, 5th ed. Churchill Livingstone Medical Division of Longman Group UK Ltd. London, 1980.
12. Yunis JJ: *Human Chromosome Methodology*, 2nd ed. Academic Press. New York, 1974.
13. Clarke GM, Cooke D: *A Basic in Statistics*, 2nd ed. Edward Arnold Publishers Ltd. London, 1983.
14. Egeli Ü, Erdoğan G: The clastogenic effect of pyrimethamine (Daraprim) on human chromosomes in lymphocyte cultures. *Cell Biol. and Toxicol*. Vol. 7, No. 4: 347-356, 1991.
15. Zakharrow AT, Egolina NA: Differential spiralisation along mammalian mitotic chromosomes 1-BudR-revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes. *Chrosoma*. 38: 341-365, 1972.
16. Wolff S: Sister Chromatid exchange. *Ann. Rev. Genet*. 11: 183-201, 1977.
17. Latt SA, Schreck RR, Loveday KS, Dougherty CP, Shuler CF: Sister chromatid exchanges. *Adv. Hum. Genet*. 10: 267-331, 1980.
18. David J, Gordan JS, Rutter WJ: Increased thermal stability of chromatin containing 5-bromodeoxyuridine substituted DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 71: 2808-2812, 1974.
19. Haaf T, Schmid M: 5-Azadeoxycytidine induced undercondensation the giant X chromosomes of *Microtus agrestis*. *Chrosoma*. Berl. 98: 93-98, 1989.
20. Haaf T, Ott G, Schmid M: Differential inhibition of sister chromatid condensation induced by 5-azadeoxycytidine in human chromosomes. *Chrosoma*. 94: 389-394, 1986.
21. Haaf T, Ott G, Schmid M: Inhibition of condensation in the late-replicating X chromosome induced by 5-azadeoxycytidine in human lymphocyte cultures. *Hum. Genet*. 79: 18-23, 1988.
22. Schmid M, Haaf T: Azacytidine-induced undercondensation in human chromosomes. *Hum. Genet*. 67: 257-263, 1984.
23. Ayter Ş, Sakızlı M, Kart A, Pişkin K: Moleküler Biyolojide Özel Konular, Meteksan Yayınları No: 11, Ankara, 1989.
24. Watt JL, Stephen GS: Lymphocyte Culture of Chromosome Analysis, In: *Human Cytogenetics a practical approach* D.E. Rooney and B.H. Czepulkowski. IRL Press Ltd. Oxford, 1986, pp 37-55.
25. Sutherland GR, Baker E: Effects of nucleotides on expression of the folate sensitive fragile sites. *Am. J. Med. Genet*. 23: 409-417, 1986.