

Malaik Hydrazid'in Lenfosit Kültürlerinde İnsan Kromozomları Üzerindeki Klastojenik Etkisinin Araştırılması

Ünal EGELİ*
Rahmi BİLALOĞLU**
Berrin TÜRKEL***

ÖZET

Bu çalışmada bir bitki büyüme regülatörü olan Malaik Hydrazid'in insan kromozomları üzerine klastojenik etkisi araştırıldı. Bu amaçla 2 erkek, 2 kadın 4 sağlıklı kişiden alınan periferik kan lenfosit kültürlerine Malaik Hydrazid 2×10^{-4} , 2×10^{-3} ve 2×10^{-2} M konsantrasyonda olacak şekilde ilave edildi. Bir kültürde kontrol olarak alındı. 72 saat sonra elde edilen metafaz figürlerinden standart gimza boyama ve bantlama yöntemi ile kromozomlardaki yapı ve sayı kusurları incelendi. Yapılan sitogenetik ve istatistikî değerlendirme sonucu Malaik Hydrazid'in insan kromozomlarında yapısal ve sayısal kromozom kusuru meydana getirmediği belirlendi.

- * Yrd. Doç. Dr.; Uludağ Üniv. Fen Fak. Genel Biyoloji Anabilim Dalı
** Prof. Dr.; Uludağ Üniv. Fen Fak. Genel Biyoloji Anabilim Dalı
*** Araş. Gör.; Uludağ Üniv. Fen Fak. Genel Biyoloji Anabilim Dalı

SUMMARY

Investigation of Clastogenic Effect on Human Chromosomes of Malaic Hydrazide in Lymphocyte Cultures

In this study, the clastogenic effect of malaic hydrazide, which is a growth-regulator used for plants, have been investigated. For this purpose, four blood samples were taken from each of four healthy people of 2 men and 2 women to produce peripheral blood lymphocyte culture samples. Three samples of each group were then diluted with malaic hydrazide to make up total concentrations of 2×10^{-4} M, 2×10^{-3} M and 2×10^{-2} M, and the last samples were kept as were for comparison reason. Metaphase figures obtained from cultures were examined by standard Giemsa staining and G-banding techniques. As a result of cytogenetic and statistical studies carried out on samples. It has been found that malaic hydrazide had no effect on human chromosomes in forming any structural and number chromosome aberration.

GİRİŞ

Malaik hidrazid (MH: 1,2-dihidro-3,6-pyridazinedione), urasilin yapısal bir izomeridir. MH herbisid ve bitki büyüme regülatörü olarak kullanılmaktadır. Bu bileşiğin bitkilerde güçlü bir klastojenik ajan olduğu değişik araştırmacılar tarafından bildirilmiştir¹⁻³. Son yıllarda bu bileşiğin bitki kök ucu hücrelerinin kromozomlarında kardeş kromatid değişimlerine (sister chromatid exchange = SCE) neden olduğu ortaya konmuştur^{4,5}. Buna karşın MH ile muamele edilen hayvan hücrelerinde elde edilen sonuçlar tartışmalıdır. Bazı araştırmacılar herhangi bir sitogenetik etki bulamamalarına rağmen^{6,7}, bir kısım araştırmacılar MH ile muamele edilen memeli hücrelerinde SCE ve kromozom aberasyonları saptamışlardır⁸⁻¹¹. Buradan, memeli hücrelerinin MH'e karşı duyarlılıklarının bitkilerden çok düşük olduğu sonucu çıkmaktadır.

Literatür bilgilerinin ışığında MH'in hayvanlardaki sitogenetik etkisinin tam aydınlatılmadığı kanısına varıldığından, MH'in insan kromozomlarına sitogenetik etkisi, 3 farklı dozda periferik kan lenfosit kültürlerine ilave edilerek araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma yaşları 23 ile 32 arasında değişen, 2 erkek 2 kadın 4 sağlıklı kişinin periferik kan lenfosit kültürlerinde Uludağ Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü ve Biyolojik Araştırma Enstitüsü Genetik Laboratuvarında gerçekleştirildi. Bu amaçla sağlıklı kişilerin parmak ucundan beşer hematokrit tüpü kan alınarak daha önceden hazırlanan ve içerisinde % 10 TC Medium 199, % 15

Fetal Calf Serum ve 10 µg/ml Phytohemagglutinin (PHAM) bulunan beşer cc'lik kültür şişelerine ilave edildi. Sörensen buffer tamponunda (PH: 7) eritilen MH 2×10^{-4} , 2×10^{-3} ve 2×10^{-2} M konsantrasyonda olacak şekilde kültürlerle ilave edildi. Bir kültür de kontrol olarak alındı. 37°C'lik etüvde 72 saatlik inkübasyon periyodundan sonra kültürlerle standart kromozom analiz yöntemi uygulandı. Her vakadan 5 preparat hazırlandı. Bu preparatlardan ikisi normal gimza boyama yöntemi ile boyanırken kalan 3 preparata G-Bantlama yöntemi uygulandı. Her vakadan ortalama 30 metafaz figürü sayılarak kromozom kusurları ışık mikroskopunda değerlendirildi. Sonuçlar 4x2 ve 2x2 kontingent tabloları ile istatistiki olarak karşılaştırıldı¹².

BULGULAR

MH, insan lenfosit kültürlerine 3 farklı dozda ilave edildi. Kontrol ve her dozda belirli sayıda metafaz değerlendirmeye alınarak kromozom hasarlarının tipi ve sayısı belirlendi. Sonuçlar Tablo: I'de verildi ve bulgulara ait bir örnek Resim: 1'de sunuldu. Kontrolde hasar oranı % 1 olarak belirlendi. 2×10^{-4} M'da % 0, 2×10^{-3} M dozda % 2.7 ve 2×10^{-2} M dozda % 6.2 oranında kromozomal hasar gözlemlendi. Doz artışına bağlı olarak hasar oranında bir artış görülmektedir. Nitekim 4x2 kontingent tablosu ile yapılan istatistik analizde deney serileri arasında önemli fark bulunmuştur ($X^2 = 8.267$, $0.025 < P < 0.05$). Ancak kontrol ile muameleler arasında 2x2 kontingent tablosu ile yapılan analizlerde, istatistik açıdan önemli bir fark bulunamamıştır. İlgili X^2 ve P değerleri Tablo: II'de verilmiştir. Muameleler ikili olarak değerlendirmeye alındığında 2×10^{-4} M dozla 2×10^{-2} M doz arasındaki fark, istatistik açıdan önemli bulunmuştur ($X^2 = 5.795$, $0.01 < P < 0.025$). 4x2 kontingent tablosu analizinde ortaya çıkan anlamlılık, 2×10^{-4} M ile 2×10^{-2} M arasındaki farktan kaynaklanmaktadır. Diğer dozlar arasında istatistiki bir anlamlılık belirlenememiştir.

Tablo: I- MH'in İnsan Lenfosit Kromozomları Üzerindeki Etkisi

	Metafaz	Aberasyon Sayıları				Aberasyon Oranları (%)			
		G	K	AF	T	G	K	AF	T
Kontrol	100	0	0	1	0	0	1	1	
2×10^{-4} M	90	0	0	0	0	0	0	0	
2×10^{-3} M	110	1	2	0	3	0.5	1.8	0	2.7
2×10^{-2} M	80	2	2	1	5	2.5	2.5	1.2	6.2

$$X^2 = 8.27 \quad 0.025 < P < 0.05$$

G: Gap, K: Kırık, AF: Asentirik fragman, T: Toplam

Tablo: II- MH'in İnsan Lenfosit Kromozomları Üzerindeki Etkisinin 2x2 Kontingent Tablolarında Analiz Sonuçları

	χ^2	SD	P
Kontrolle göre:			
2×10^{-4} M	0.905	1	$0.25 < P < 0.50$
2×10^{-3} M	0.167	1	$0.50 < P < 0.75$
2×10^{-2} M	2.346	1	$0.90 < P < 0.25$
2×10^{-4} M'a göre:			
2×10^{-3} M	2.492	1	$0.10 < P < 0.25$
2×10^{-2} M	5.795	1	$0.01 < P < 0.025$
2×10^{-3} M'a göre:			
2×10^{-2} M	0.681	1	$0.25 < P < 0.50$



Resim: 1
 2×10^{-4} M MH verilen kültürde 32 yaşındaki erkek vakamızın G-bantlamalı normal bir metafaz figürü

TARTIŞMA

Bu çalışmada, bitkilerde güçlü bir klastojenik ajan olan MH'in¹⁻⁵, insan kromozomlarına olan etkisi araştırılmıştır. MH'in üç farklı dozu insan lenfosit kültürlerine uygulanmış ve kromozom aberasyonları değerlendirilmiştir. Tablo: I ve II'den de görüleceği gibi MH, insan lenfosit kültürlerinde kromozomal aberasyonları, kontrole göre önemli derecede artırmamıştır. Ancak çok yüksek dozda aberasyonların oranında bir artış görülmektedir. Fakat burada da kontrole göre istatistiksel önemli bir fark saptanamamıştır.

MH'in memeliler de dahil hayvanlarda sitogenetik etkisinin olmadığını bir çok araştırmacı belirtmiştir^{6,7,13}. Bu sonuçlar bitki ve hayvan kromozomlarının MH'e karşı farklı duyarlılığına dayanmaktadır⁴. Araştırma sonuçlarımız bu çalışmalarla uyum içinde görülmektedir. Ancak bazı araştırmacılar ise, MH'in memeli hücrelerinde SCE ve kromozom aberasyonları oluşturduğunu rapor etmişlerdir⁸⁻¹¹. Fakat burada da memelilerin MH'e duyarlılığının bitkilere göre çok düşük olduğunu belirtmek gerekir⁴.

MH'in sıçan karaciğer S 9 fraksiyonu ile metabolik aktivasyonu sonucu Çin Hamsterinin ovaryum hücrelerinde SCE oranında bir artış saptanmıştır¹⁰. Fakat MH'in Vicia faba S 10 fraksiyonu ile metabolik aktivasyonu sonucu böyle bir artış elde edilememiştir¹⁰⁻¹⁴. Bu sonuçlardan, MH'in memelilerde metabolik aktivasyonla, mutajenik bir ajana dönüşebileceği, fakat normal koşullarda önemli bir mutajenik etkisinin olmadığı düşünülebilir. Fakat MH'in 8×10^{-3} M ve daha yüksek dozlarda, insan kan kültürlerine 72 saat veya son 24 saat ilavesi SCE'yi arttırmakta ve hücre çoğalmasını engellemektedir⁹. Yine Çin Hamsterinin ovaryum hücrelerinde MH'in SCE ve kromozom aberasyonları oluşturduğu gösterilmiştir¹¹. Bu çalışmada da 2×10^{-3} M'dan itibaren kromozom aberasyonlarında bir artış göze çarpmaktadır. Ancak kontrole göre istatistiksel bir fark saptanamamıştır.

MH'in etkisinin PH'ya bağlı olduğu bilinmektedir². Soğan kök ucu hücrelerinde, MH'in SCE ve kromozom aberasyonları oluşturma yönünden etkisi değişik PH'larda incelenmiş ve PH'ın düşmesiyle toplam aberasyon oranının önemli derecede arttığı saptanmıştır⁴. Bizim çalışmamız PH 7'de yapıldığı için, aberasyon oranının düşük olması beklenebilir. Fakat, insanın diploid fibroblast kültürleri, düşük PH'da MH ile muamele edildiğinde, SCE'de bir artış ortaya çıkmamıştır¹⁵. Bu konuda ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç olduğu ortadadır.

Sonuç olarak, MH'in PH 7'de insan lenfosit kültürlerinde önemli bir klastojenik etkisinin olmadığı söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. DARLINGTON, C.D., McLEISH, J.: Action of maleic hydrazide on the cell. *Nature (London)*, 167:407-408, 1951.
2. KIHLMAN, B.A.: Factors affecting the production of chromosome aberrations by chemicals. *J. Biophys. Biochem. Cytol*, 2:543-555, 1956.
3. ANDERSON, H.C., KIHLMAN, B.A.: Localization of chemically induced chromosomal aberrations in three different karyotypes of *Vicia faba*. *Hereditas.*, 107:15-25, 1987.
4. CORTES, F., ESCALZA, P., MATEUS, S., DIAZ-RECASEAS, M.: Factors affecting the production of SCEs by Maleic hydrazide in roat tip chromosomes of *Allium cepa*. *Mutat. Res.*, 192:125-130, 1987.
5. SCHUBERT, I., HEINDORFF, K.: Are SCE frequencies indicative of adaptive response of plant cells? *Mutat. Res.*, 211:301-306, 1989.
6. SALAMON, M.H., RAO, F.J.C.: Furter tests for tumor initiating activity: N,N di-(2-choloroethyl)-p-amino phenylbutyric acid (CB 1348) as an initiator of skin tumour formation in the mouse. *Br. J. Cancer*, 10: 363-378, 1956.
7. PERRY, P., EVARS, H.J.: Cytological detection of mutagen carcinogen exposure by sister chromatid exchanges. *Nature (London)*, 258:121-125, 1975.
8. MC CARTHY, R.E., EPSTEIN, S.S.: Cytochemical and cytogenetic effects of maleic hydrazide on cultured mammalian cells. *Life Sci.*, 7:1-6, 1968.
9. SPEIT, G.: Maleic hydrazide induces sister chromatid exchanges in mammalian cells in vitro. *Mutation. Res.*, 119:371-376, 1983.
10. TAKEHISA, S., KONAYA, N.: A comparison of *Vicia faba*-root S. 10 and Rat. Liver S 9 activation of ethanol, maleic hydrazide and Cyclophosphamide as measured by sister-chromatid exchange induction in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.*, 124:145-151, 1983.
11. MESCHIH, R., OVARANTA, D.M.T., FISRE, M., POLCARO, C., POSSAGNO, E., PALCITTI, F.: Chromosomal damage induced by maleic maleic hydrazide in vitro and in vivo. *Mutat Res.* 204:645-648, 1988.
12. ZARR, J.H.: *Biostatistical analysis*, Prentice Hall Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, 1984.
13. STELKA, D.G., WOLFF, S.: Sister chromatid exchanges as an assay for genetic damage induced by mutagen-carsinogens. In vitro tests for compounds requiring metabolic activation. *Mutat. Res.* 41:343-350, 1976.

14. TAKEHISA, S., KANAYA, N., RIEGER, R.: Promutagen activation by *Vicia faba*: an any based on the induction of sisterchromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 1977:195-205, 1988.
15. YANG, D.P., GRAUPENSPERGER, L.C., MINECCI, L.C., RUBIN, B.A.: Induction of sister-chromatid exchanges in human diploid fibroblasts by mutagens with and without rat liver microsomal activation. *Environ. Mutagen.*, 3:42-52, 1981.

Yrd. Doç. Dr. Ünal EGELİ
 Uludağ Üniv. Fen Fakültesi
 Genel Biyoloji Anabilim Dalı
 BURSA

Famijyal Periyodik Parazitler (8 Olgunun Analizi)

Ö. İsmail TIRAN¹
 Halime ZARIFÇAM²
 Derya BOXA³
 F. İsmail ÖZ⁴
 F. İsmail ÖZ⁵
 N. İsmail ÖZ⁶
 F. İsmail ÖZ⁷

ÖZET

(Bu bölümün içeriği, orijinal makalede yer almamaktadır. Bu nedenle buraya aktarılmamıştır.)

1. Ünal Egelî, Genel Biyoloji Anabilim Dalı Öğr. Üyesi
 2. Halime Zarıfçam, Tıp Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğr. Üyesi
 3. Derya Boxa, Tıp Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğr. Üyesi
 4. F. İsmail ÖZ, Tıp Fak. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Araş. Gör.