

## Bleomycin'in Kronik Olarak Radyasyona (X-Işını) Maruz Kalan Bireylerde Mitotik İndeks'e Etkisi

Hilmi İsi\*, Diclehan Öktüren Oral\*, Ayşegül Bengisu Türkyılmaz\*, Mahmut Balkan\*

### ÖZET

*Bleomycin , tedavi dozundan başlamak üzere artan üç farklı dozda final konsantrasyonu 0.3 µg/ml, 3 µg/ml ve 30 µg/ml olacak şekilde 72 saat süre ile kültüre edilen kana son 6, 24 ve 48' inci saatte eklenmiştir. Kontrollü olarak yapılan bu lenfosit kültürü çalışması, kronik olarak radyasyona (X-ışını) maruz kalan 5 bireyden alınan periferik kanla yapılmıştır.*

*Bleomycin uygulanan lenfosit kültüründeki mitotik indeks değerleri göz önüne alındığında farklı doz ve süre kombinasyonlarında olduğu gibi, eşit doz ve sürenin uygulandığı denekler arasında da belirgin farklılıklar göstermektedir. Mitotik indeks değeri kontrol gruplarında (1000 hücrede olmak üzere) 10.86, doz gruplarında ise 0.3 µg/ml' de 8.73, 3 µg/ml'de 5.0 ve 30 µg/ml' de 3.93 şeklinde olduğu saptanmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmede; kontrol grubu ile 0.3µg/ml'lik deney grubu arasında ve 3µg/ml lik deney grubu ile 30µg/ml lik deney grubu arasında mitotik indeksin önemli seviyede etkilenmediği (P>0.05), kontrol grubu ile 3µg/ml ve 30µg/ml lik deney grupları arasında, 0.3µg/ml lik deney grubu ile 3µg/ml ve 30µg/ml lik deney grupları arasında mitotik indeksin önemli seviyede etkilendiği saptanmıştır (P<0.01) .*

*Anahtar Kelimeler: Bleomycin, Mitotik indeks.*

### The Effect of Bleomycin to the Mitotic Index who were Exposed to Radiation Chronically

#### SUMMARY

*Beginning with the therapeutic dose and increasing three different doses and three different periods of time Bleomycin (Bleomycin 0.3 µg/ml, 3 µg/ml and 30 µg/ml, 6, 24, 48 hours) were added to blood which was being cultured on 5 samples who were exposed to radiation chronically.*

*The mitotic index in the lymphocyte culture was determined by means of counting 1000 cells from preparations belong to control and experiment groups.*

*The mitotic index was showed difference value to the difference bleomycin dose and the between difference samples. As the mitotic index value (Per 1000 cell) 10.86 for the control group, this value fall to 8.73 at 0.3 µg/ml, 5.0 at 3 µg/ml and 3.93 at 30 µg/ml. There were no significant differences between control group and 0.3 µg/ml, 3 µg/ml and 30 µg/ml (P>0.05). An important fall was seen between control group and 3 µg/ml and 30 µg/ml, 0.3 µg/ml group and 3 µg/ml, 30 µg/ml (P<0.01).*

*Key Words: Bleomycin, Mitotic index.*

### GİRİŞ

Radyasyonlar etkilerini vücuttaki hücrelerin normal fonksiyonlarını bozmak suretiyle meydana getirirler. İyonlaştırıcı radyasyonun

hücre içine geçişi, çok karmaşık direkt ve indirekt olaylar zincirini başlatabilir. Bu olaylar sırasıyla fiziksel, fizikokimyasal, kimyasal ve

\* Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.



biyolojik devrelerdir. Hücrede bilgi taşıyan moleküller radyasyonla tahrip edilecek olursa bu bilgi kaybedilebilir (1,2).

Radyasyonda ışınlama sırasında hücre hangi evrede olursa olsun siklus G<sub>2</sub> evresinde bloke olur. DNA'nın iki şeridinde de radyasyon zararı karşılıklı noktalarda meydana gelmişse hücre bunu düzeltemez (1,3).

Bleomycin 1962 yılında Dr. Hamao UMEZAWA ve arkadaşları tarafından Streptomyces verticilos' un bir fermantasyon ürünü olarak keşfedilmiş önemli bir antitümör ajanlar grubudur. Bleomycinlerin sitotoksik etkileri DNA fragmentasyonuna neden olma yeteneklerinden kaynaklanır. Bleomycin DNA'ya bağlanarak pürin ve pirimidin bazlarının ayrılmasına neden olur, DNA sentezini inhibe eder ve daha az bir derecede de RNA ve protein sentezi inhibisyonuna ve hücre döngüsünde hücrelerin G<sub>2</sub> fazında kümelenmesine neden olur (4).

#### **Bleomycin ve Radyasyonun Kombine Etkileri**

Bleomycin'in 200 µg/ml'lik dozunda DNA sentezinin %40 oranında azaldığı ve x-ray'in 20 Gy dozunda verilmesi ile normal bireyde DNA sentezinin %65 oranında azaldığı tespit edilmiştir. (3,5).

Saccharomyces cerevisiae'nin Bleomycin'e duyarlı mutantları üzerine yapılan çalışmada Bleomycine duyarlı olan suşların iyonize radyasyona karşı duyarlı oldukları, bazı mutant tipler de, Bleomycine duyarlı olmalarına rağmen iyonize radyasyona duyarlılık göstermemişlerdir (6).

Bleomycin'e adapte olan lenfositlere yüksek dozda Bleomycin ve x-ray'in verilmesi ile adapte olmayanlara nazaran anlamlı seviyede az kromozomal aberasyon tespit edilmiştir. 0.01 µg/ml ve 0.05 µg/ml'lik Bleomycin dozunun en iyi adaptasyonu sağladığı belirtilmektedir (7).

Bleomycin moleküler oksijen ve demirli kompleksler oluşturarak DNA kırılmalarına neden olabilir. Bu etki radyasyonla benzer bir etkidir (8). Hibrid hücre kullanılarak yapılan çalışmada gamma radyasyon ve Bleomycin dozunun artırılmasına paralel olarak ortamda yaşayan hücre sayısında azalma olmaktadır (9).

#### **GEREÇ VE YÖNTEM**

Çalışmamızın araştırma popülasyonu: Yakın geçmişlerinde virütik enfeksiyon geçirmemiş, herhangi bir antibiyotik ve benzeri kemoterapötik ilaç kullanmamış, uzun süre radyoloji ünitesinde çalışıp kronik olarak radyasyona maruz kalmış ve sigara tiryakisi olmayan bireyler seçilmiştir. Yaşları 26-35 arasında değişen 4'ü erkek biri kadın olmak üzere seçilen 5 bireyin yaş ortalaması 30.6 ± 3.5 yıldır. Bireylerin radyasyonlu ortamda kalma sürelerinin ortalaması 8 yıldır.

Bleomycin'in bidistile su ile hazırlanan 1500 µg/ml yoğunluktaki ana stok solüsyonundan; TC Medium 199 ile final kullanım konsantrasyonu 0.3 µg/ml, 3 µg/ml ve 30 µg/ml olacak şekilde dilue edilerek lenfosit kültürü hazırlandı.

Çalışmamızda Moorhead ve arkadaşlarının geliştirdikleri "standart" makrokültür tekniğinin modifiye şekli olan "tüm kan tekniği" ya da "mikroteknik" olarak bilinen yöntem uygulanmıştır (10-14).

Mitotik indeksin saptanmasında genel kural olarak her doz ve süre kombinasyonu için değişik verilerimiz sayı ile elde edilen değerler olduğundan ayrıntılı istatistiksel bir değerlendirme yapabilmek için "Arc sin" transformasyonu ile açı değerlerine dönüştürülmüştür. Değerlendirme varyans analizi yöntemlerinden faktöriyel planlama düzeni uygulanarak yapılmıştır (15).

#### **BULGULAR**

##### **Mitotik İndekse Ait Bulgular**

Kontrol grupları ve deney gruplarına ait preparatların her birinden 1000 hücre sayılarak mitotik indeks belirlenmiş olup, çalışmada kullanılmış olan bleomycinin, hücrelerin mitoz girme oranları üzerinde herhangi bir etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Bulgular tablo 1' de verilmiş, ayrıca gerekli istatistiksel değerlendirmeler yapılarak sonuçlar 2, 3, 4 ve 5 numaralı tablolarda sunulmuştur.

Mitotik indekse ait değerler, farklı, doz ve süre kombinasyonlarında olduğu gibi, eşit doz ve sürenin uygulandığı denekler arasında da belirgin farklılıklar göstermektedir. Mitotik indeks açısından tüm deneklere ait bulgular toplamının aritmetik ortalamaları ile yapılan



karşılaştırmada; kontrol gruplarının genel aritmetik ortalaması 10.86, 0.3 µg/ml lik deney grubunda 8.73, 3 µg/ml' lik deney grubunda 5.0, 30 µg/ml lik deney grubunda ise 3.93'e düştüğü gözlenmiştir. Kontrol grupları aritmetik ortalaması ile 0.3, 3 ve 30 µg/ml lik deney gruplarının hepsinin genel aritmetik ortalaması karşılaştırıldığında; kontrol grup-

larının aritmetik ortalaması 10.86, deney gruplarının aritmetik ortalaması ise 5.89 olarak bulunmuştur.

En yüksek mitotik indeks değeri 6 saatlik kontrol grubunda 11.8 olarak bulunmuştur. En düşük mitotik indeks değeri 48 saat-30µg/ml lik deney grubunda 3.60 olarak tespit edilmiştir (Tablo 1).

**Tablo 1:** Deneklere ait mitotik indeks değerleri

Doz - Süre	I	II	III	IV	V	$\epsilon \bar{X}$	$\bar{X}$
Kontrol - 6 Saat	10	12	15	12	10	559	11.8
Kontrol - 24 Saat	10	8	8	14	15	55	11.0
Kontrol - 48 Saat	7	6	8	18	10	49	9.8
Kontrol Ortalaması	9.0	8.66	10.33	14.66	11.66	54.33	10.86
0.3µg/ml - 6 Saat	8	12	14	15	7	56	11.2
0.3µg/ml - 24 Saat	10	6	7	6	8	37	7.4
0.3µg/ml - 48 Saat	7	9	5	9	8	38	7.6
0.3µg/ml Ortalaması	8.33	9.0	8.67	10.0	7.67	43.67	8.73
3µg/ml - 6 Saat	8	2	8	8	3	31	6.20
3µg/ml - 24 Saat	4	1	8	4	3	20	4.0
3µg/ml - 48 Saat	3	1	12	3	5	24	4.80
3µg/ml Ortalaması	5.0	1.33	9.33	5.0	3.67	24.33	5.0
30µg/ml - 6 Saat	6	5	5	2	4	22	4.40
30µg/ml - 24 Saat	1	6	4	1	6	18	3.60
30µg/ml - 48 Saat	4	5	1	3	6	19	3.80
30µg/ml Ortalaması	3.67	5.33	3.33	2.0	5.33	19.66	3.93
Deney Grupları $\bar{X}$	4.42	3.0	6.91	6.42	5.42	26.17	5.23

#### Mitotik İndeks Bulgularının istatistiksel değerlendirilmesi.

Deneklere ait farklı doz-süre kombinasyonlarına ait mitotik indeks değerleri hesaplandıktan sonra uygulanan her süre için kontrol grubu ve deney gruplarına ait bulgular t testi uygulanarak gruplar arasında fark olup olmadığı ya da bleomycinin mitotik indeksi etkileyip-etkilemediği belirlenmiştir.

**Tablo 2:** Mitotik indekse ait toplam ortalamaların istatistiksel değerlendirilmesi

Karşılaştırılan Dozlar	t Değeri	Tablo Değeri 0.05	SONUÇ
Kontrol - 0.3µg/ml	1.84	1.860	p>0.05
Kontrol - 3µg/ml	5.67	1.860	p<0.01
Kontrol - 30µg/ml	6.97	1.860	p<0.01
0.3µg/ml - 3µg/ml	3.88	1.860	p<0.01
0.3µg/ml - 30µg/ml	5.25	1.860	p<0.01
3µg/ml - 30µg/ml	1.43	1.860	p>0.05

#### Mitotik indeksin toplam ortalamalarının İstatistiksel Değerlendirmesi

Kontrol gruplarının toplam ortalaması ile deney gruplarının ortalaması tek tek karşılaştırıldığında; Kontrol grubu ile 0.3µg/ml'lik deney grubu arasında ve 3µg/ml lik deney grubu ile 30µg/ml lik deney grubu arasında mitotik indeksin önemli seviyede etkilenmediği (P>0.05), kontrol grubu ile 3µg/ml ve 30µg/ml lik deney grupları arasında, 0.3µg/ml lik deney grubu ile 3µg/ml ve 30µg/ml lik deney grupları arasında mitotik indeksin önemli seviyede etkilendiği saptanmıştır (P<0.01)

#### Altı Saatlik Sürede Mitotik İndeks Karşılaştırması

Altı saatlik süre uygulanmasındaki veriler karşılaştırıldığında; kontrol grubu ile 0.3µg/ml lik deney grubu arasında ve 3µg/ml grubundan



30µg/ml lik deney grubu arasında mitotik indeks olgusunda herhangi bir değişiklik olmadığı (P>0.05), ancak diğer deney grupları arasında mitotik indeksin etkilendiği saptanmıştır (P<0.01) (Tablo 3).

**Tablo 3:** Altı Saatlik sürede mitotik indeks karşılaştırması.

Karşılaştırılan Dozlar	t Değeri	Tablo 0.05	Değeri 0.01	SONUÇ
Kontrol - 0.3µg/ml	0.04	1.860	2.892	p>0.05
Kontrol - 3µg/ml	2.96	1.860	2.892	p<0.01
Kontrol - 30µg/ml	4.12	1.860	2.892	p<0.01
0.3µg/ml - 3µg/ml	2.69	1.860	2.892	p<0.01
0.3µg/ml - 30µg/ml	3.86	1.860	2.892	p<0.01
3µg/ml - 30µg/ml	1.23	1.860	2.892	p>0.05

### Yirmidört Saatlik Sürede Mitotik İndeks Karşılaştırması

Bleomycinin 24 saat süre ile farklı dozlarda deneklere uygulanması sonucu elde edilen veriler karşılaştırıldığında; kontrol grubundan 0.3µg/ml lik deney grubuna geçişte ve 3µg/ml lik deney grubundan 30µg/ml lik deney grubuna geçişte mitotik indeks olgusunda herhangi bir değişiklik olmadığı (P>0.05), kontrol grubundan 3µg/ml ve 30µg/ml lik deney gruplarına geçişte mitotik indeksin önemli seviyede etkilendiği (P<0.01) ve 0.3µg/ml' lik deney grubundan 3µg/ml ve 30µg/ml lik geçişte ise 0.05 seviyesinde etkilendiği saptanmıştır. (Tablo 4).

**Tablo 4:** Yirmidört Saatlik sürede mitotik indeks karşılaştırması.

Karşılaştırılan Dozlar	t Değeri	Tablo 0.05	Değeri 0.01	SONUÇ
Kontrol - 0.3µg/ml	1.88	1.860	2.892	p>0.05
Kontrol - 3µg/ml	4.05	1.860	2.892	p<0.01
Kontrol - 30µg/ml	4.34	1.860	2.892	p<0.01
0.3µg/ml - 3µg/ml	2.258	1.860	2.892	p<0.01
0.3µg/ml - 30µg/ml	2.569	1.860	2.892	p<0.01
3µg/ml - 30µg/ml	0.325	1.860	2.892	p>0.05

### Kırksekiz Saatlik sürede mitotik indeks karşılaştırması

Bleomycinin 48 saat süre ile farklı dozlarda deneklere uygulanması sonucu elde edilen veriler karşılaştırıldığında; kontrol grubu ile 0.3µg/ml lik deney grubu, 0.3µg/ml lik deney grubu ile 3µg/ml lik deney grubu ve 3µg/ml lik deney grubu ile 30µg/ml lik deney grubuna geçişte mitotik indeksin önemli

seviyede etkilenmediği (P>0.05), kontrol grubu ile 3µg/ml lik deney grubu ve 30µg/ml lik deney grupları arasında geçişte mitotik indeksin önemli seviyede etkilendiği (P<0.01), 0.3µg/ml lik deney grubu ile 30µg/ml lik deney grubu arasında geçişte ise mitotik indeksin 0.05 seviyesinde etkilendiği saptanmıştır (Tablo 5).

**Tablo 5:** Kırksekiz Saatlik sürede mitotik indeks karşılaştırması.

Karşılaştırılan Dozlar	t Değeri	Tablo 0.05	Değeri 0.01	SONUÇ
Kontrol - 0.3µg/ml	1.184	1.860	2.892	p>0.05
Kontrol - 3µg/ml	2.936	1.860	2.892	p<0.01
Kontrol - 30µg/ml	3.65	1.860	2.892	p<0.01
0.3µg/ml - 3µg/ml	1.78	1.860	2.892	p>0.05
0.3µg/ml - 30µg/ml	2.52	1.860	2.892	p<0.05
3µg/ml - 30µg/ml	0.76	1.860	2.892	p>0.05

### TARTIŞMA

Çalışmamızda bleomycinin, hücrenin mitotik aktivitesinde bir yavaşlamaya neden olduğu belirlenmiştir. 6, 24 ve 48 saatlik sürelerde, kontrol grupları ile deney gruplarının mitotik indeks değerleri karşılaştırıldığında; kontrol gruplarının ortalama 10.86 olan mitotik indeks değerlerinin 0.3µg/ml lik deney grubunda 8.73'e, 3µg/ml lik deney grubunda 5.0'a ve 30µg/ml lik deney grubunda da 3.93'e düştüğü görülmektedir (Tablo 2). Buradan, doz artışına paralel olarak mitotik indeksin düştüğü sonucuna varılabilir. Bizim verilerimizde 3µg/ml lik deney grubu ile 30µg/ml lik deney grubunun mitotik indeks değerleri birbirine yakın olarak tespit edildi.

Erkan (16) 1989 da yaptığı çalışmada ortalama mitotik indeks değerini kontrol grubunda (sigara içmeyen, radyasyona maruz kalmamış bireylerde) 29.86, 0.3µg/ml lik deney grubunda 26.20, 3µg/ml lik deney grubunda 18.66 ve 30µg/ml lik deney grubunda ise 14.26 olarak bulmuştur.

Shubber ve Shaikhly (17) 1989 da radyoloji çalışanlarında mitotik indeksi ortalama (2.23 ± 0.21)' sı kontrol grubundan (5.20 ± 0.21) anlamlı seviyede düşük olarak saptamışlardır (P<0.01). Ohama ve Kadotani (18) Bleomycin ile yaptığı in-vitro çalışmada bleomycin uygulanan kültürlerde mitotik indeksin düştüğünü, 5 µg/ml uygulanan kültürlerde 6 preparattan 20 metafaz bulmanın, 20

$\mu\text{g/ml}$ ' den fazla doz uygulanan kültürlerde ise normal metafaz bulmanın mümkün olmadığını belirtmiştir.

Çalışmamızdaki verilerle diğer araştırmacıların verileri arasında bir yakınlık yoktur. Ancak radyasyona maruz kalan bireylerin normal popülasyondan daha düşük mitotik indeks değerine sahip olduğu Erkan (16), Shubber ve Shaikhly (17) gibi araştırmacıların verileriyle de desteklenmektedir.

### KAYNAKLAR

1. Önen S. Radyasyon Biyofiziği Ders Kitabı. İstanbul Üniversitesi Basımevi. İstanbul. 1993.

2. Özbayrak S. Dış Hekimliğinde Röntgen Işınları, Etkileri ve Radyasyondan Korunma. Cemay Organizasyon Matbaacılık. İstanbul. 1987.

3. Hittelman, W.N. , Sen, P.: Heterogeneity in Chromosome Damage and Repair Rates After Bleomycin in Ataxia Telangiectasia cells. Cancer Research, 1988, 48:276- 279.

4. Zuckerman JE, RaffinTA, Brown JM, et al: In-vitro Selection and characterization of a bleomycin-resistant subline of b:16 Melanoma. Cancer-Res 1986; 46:1748-1753.

5. Wegner, RD, Metzgerm M, Hanefeld F, Jaspers NG, Baan C, Magdorf K, Kunze J, Sperling K: A new chromosomal instability disorder confirmed by complementation studies. Clinical Genetics, 1988; 3:20-32.

6. Moore, CW: Internucleosomal cleavage and chromosomal degradation by bleomycin and phleomycin in yeast. Cancer Research, 1988; 48:6837-6843.

7. Vijayalaxmi and Burkart W,: Resistance and Cross-Resistance to chromosome damage in human blood lymphocytes adapted to bleomycin. Mutation Research, 1989; 21: 1-5.

8. Schantz, SP, Hsu, TC, Ainsle, N, Moser, RP.: Young Adults with head and Neck Cancer Express Increased susceptibility to mutagen-Induced Chromosome Damage JAMA, 1989; 262:3313-3315.

9. Giaccia AJ, Denko N, MacLeran D, et al,: Human chromosome 5 complements the DNA Double-strand Break Repair Deficiency and Gamma-Ray Sensitivity of the XR-I Hamster Variant. Am.J. Hum.Genet, 1990; 47:459-469.

10. Moorhead PS, Novel PC, Moolman WS, et al. Chromosome preparation of leucocytes cultured from human peripheral blood. Exp, Cell Res, 1961;20:613-616.

11. Başaran N. Tıbbi Genetik (Ders Kitabı 4. Baskı. Bilim ve Teknik Yayınevi. Eskişehir. 1986.

12. Mueller RF, Young ID; Emery's Elements of Medical Genetics. Tenth Ed. Churchill Livingstone.1998.

13. Şaylı BS. Medikal Genetik Teorik ve Klinik Sitogenetik 4. Baskı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayını Sayı 381. Ankara 1979.

14. Gustashaw KM: Chromosome Stains. In: Barch Margaret J,: The Acts Cytogenetics Laboratory Manual Second Ed. Ravend Press. New York. 1991-205-269.

15. Yurtseven N. Deneysel İstatistiksel Metotlar. Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı Köy Hizmetleri Genel Müdürlüğü Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Yayınları Teknik Yayın Ankara.1984; 56: 90-313.

16. Erkan A. Bleomycin'in İnsan Kromozomları Üzerine Etkisi (Yüksek Lisans Tezi). Diyarbakır. 1989.

17. Shubber EK, Al-Shaikly AW,: Cytogenetic analysis of blood lymphocytes from X-ray radiographers. Int Arch of Occup Environ Health, 1989; 61:385-389.

18. Ohama K, Kadotani T. Cytologic effects of bleomycin on cultured human lymphocytes. Jap Jour Hum Genet 1970: 14: 293-297.

