

Bleomycin'in Kronik Olarak Radyasyona (X-Işını) Maruz Kalan Bireylerde Satellit Assosiyasyonlarına 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 yapılan bu çalışma, kronik olarak radyasyona (X- ışını) maruz kalan 5 bireyden alınan periferik kanla yapılmıştır.

Kültüre edilen hücrelerden toplam 2639 metafaz değerlendirilmiştir. Bleomycin uygulanan lenfosit kültüründeki satellit assosiyasyonları değerleri göz önüne alındığında farklı doz ve süre kombinasyonlarında olduğu gibi, eşit doz ve sürenin uygulandığı denekler arasında da belirgin farklılıklar göstermektedir. Kontrol gruplarında hücrelerin %31.7'sinde, doz gruplarında ise 0.3 µg/ml' de hücrelerin %30.9'u, 3 µg/ml'de hücrelerin %27.2'si ve 30 µg/ml'de de hücrelerin %19.7'sinde satellit assosiyasyonu olduğu saptanmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmede; 6 saatlik Bleomycin uygulama süresinde kontrol grubu ile doz grupları arasındaki farkın anlamlı olmadığı ($P>0.05$), 24 saatlik süre uygulamasında kontrol grubu ile 30µg/ml lik doz grubu arasındaki farkın anlamlı olduğu ($P<0.05$), 48 saatlik süre uygulamasında da kontrol grubu ile 3µg/ml ve 30µg/ml lik doz grubu arasındaki farkın anlamlı olduğu saptanmıştır ($P<0.01$).

Anahtar Kelimeler: Bleomycin, Satellit Assosiyasyonu

The Effect of Bleomycin to the Satellite Association who were Exposed to Radiation (X-Ray) 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 (x-ray) chronically.

The satellite association was evaluated in 2639 metaphases from preparations belong to control and experiment groups.

The satellite association was showed difference value to the difference bleomycin dose and the between difference samples. As the satellite association 31.7% for the control group, this value fall to 30.9% at 0.3 µg/ml, 27.2% at 3 µg/ml and 19.7% at 30 µg/ml. Statistically; there were no significant differences between in the 6 hour control group and dose groups ($P>0.05$). There were significant differences between in the 24 hour control group and 30 µg/ml dose groups ($P<0.05$). There were significant differences between in the 48 hour control group and 3 µg/ml and 30 µg/ml dose groups ($P<0.01$).

Key Words: Bleomycin, Satellite Association

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

Radyasyonda ışınlama sırasında hücre hangi evrede olursa olsun siklus G₂ evresinde bloke olur. DNA'nın iki şeridinde de radyasyon zararı karşılıklı noktalarda meydana gelmişse hücre bunu düzeltmez (1, 3).

Bleomycin 1962 yılında Dr. Hamao Umezawa ve arkadaşları tarafından *Streptomyces verticilos*' un bir fermentasyon 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 G₂ 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).

D grubu (13, 14 ve 15 nolu) ve G grubu (21 ve 22 nolu) kromozomların kısa kollarına bağlanan yuvarlak kromatin materyalına satellit adı verilmektedir. İnsandaki akrosentrik kromozomların (13, 14, 15, 21, 22) p kolunda bulunan satellitler hücrenin interfaz evresinde nukleolusun yapısına katılırlar. Kimi zaman akrosentrik kromozomlardaki satellitler biri birine yaklaşarak satellit assosiyasyonlarını oluştururlar (10, 11). Satellit assosiyasyonları bir kromozom düzensizliği olarak kabul edilmemekle beraber, bunların aneuploidy tipi kromozom düzensizliklerine neden olduğu konusunda görüşler ileri sürülmektedir (12).

Houghton (13) akrosentrik kromozomlardaki satellit assosiyasyonları kromozomal non-disjunction'a neden olabilir ifadesine karşılık, Wachtler (14) satellit assosiyasyonu ile mayotik non-disjunction arasında bir ilişki olmadığını ifade etmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızın araştırma popülasyonu: Yakın geçmişlerinde virütik enfeksiyon geçirmemiş, herhangi bir antibiyotik ve benzeri kemoterapötik ilaç kullanmamış ve 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 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 lenfosit kültürü ortamında final kullanım konsantrasyonu 0.3 µg/ml, 3 µg/ml ve 30 µg/ml olacak şekilde dilue edilerek hazırlandı.

Çalışmamızda Moorhead ve arkadaşlarının geliştirdikleri "standart" makrokültür tekniğinin modifiye şekli olan "tüm kan tekniği"



ya da “mikroteknik” olarak bilinen yöntem uygulanmıştır (10, 15-18). Kültür, preparasyon ve giemsa (GTG) bantlama aşamalarında Seabright ‘ın (1971) yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır (19,20).

Satellit assosiyasyonlarının farklı doz ve süre kombinasyonlarına ait verilerin istatistiksel değerlendirilmesi t oran testi ile yapılmıştır. (21).

BULGULAR

Satellit Assosiyasyonlarına Ait Bulgular

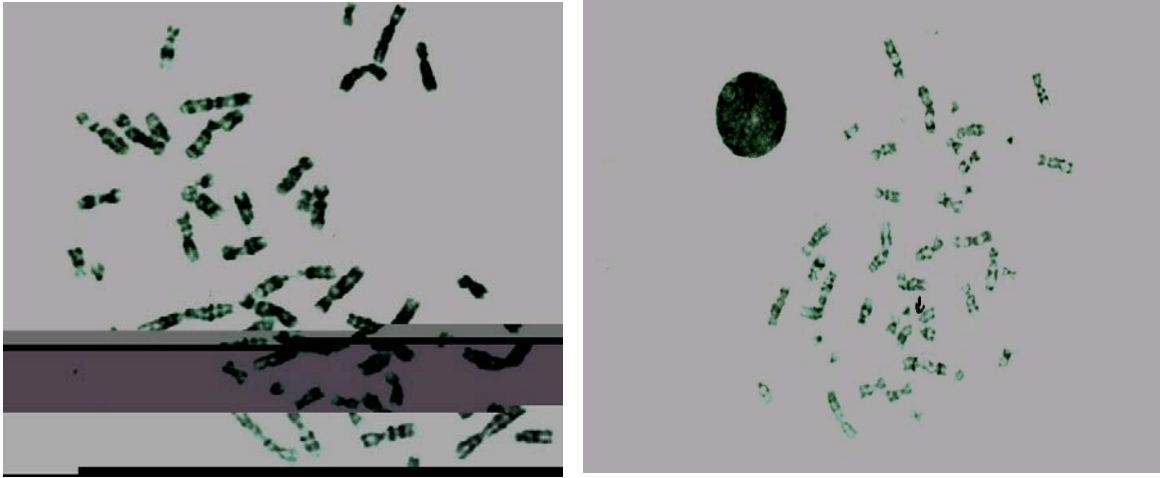
Çalışmada kullanılmış olan bleomycinin, mitozu giren hücrelerde satellit assosiyasyonları oranları üzerinde her hangi bir etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Kontrol ve deney gruplarında incelenen 2639 metafazda toplam 728 hücrede satellit assosiyasyonu saptanmıştır (Şekil 1).

Kontrol grubunda değerlendirilen 679 metafazda 215 hücrede ve doz gruplarında değerlendirilen 1960 metafazda 513 hücrede satellit assosiyasyonu saptanmıştır. Bulgular tablo 1’ de verilmiş, ayrıca gerekli istatistiksel değerlendirmeler de yapılarak sonuçlar 2, 3 ve 4 numaralı tablolarda sunulmuştur.

Satellit assosiyasyonu açısından tüm deneklere ait bulguların değerlendirilmesinde; kontrol gruplarının genel aritmetik ortalamasında %31.7 oranında, 0.3µg/ml lik doz grubunda %30.9, 3 µg/ml’ lik doz grubunda %27 ve 30 µg/ml lik doz grubunda ise %19.7 oranındaki hücrede satellit assosiyasyonu saptanmıştır.

Satellit assosiyasyonu değeri; en yüksek kontrol grubunda %31.7 oranında, 0.3µg/ml lik doz grubunda %30.9, 3 µg/ml’ lik doz grubunda %27 ve en düşük 30 µg/ml lik doz grubunda %19.7 oranında saptanmıştır.



Şekil 1. Satellit Assosiyasyonu saptanan iki metafaz plağı (1000X).



Tablo 1. Satelit Assosiyasyonlarının Sayı ve Yüzdeleri

Doz-Süre Kombinasyonu	İncelenen Metafaz Sayısı	Satellit Assosiyasyonu Sayısı	Satellit Assosiyasyonu %'si
Kontrol - 6 Saat	213	55	25.8
Kontrol - 24 Saat	250	82	32.8
Kontrol - 48 Saat	216	78	36.1
Kontrol Toplamı	679	215	31.7
0.3µg/ml - 6 Saat	216	64	29.6
0.3µg/ml- 24 Saat	250	76	30.4
0.3µg/ml- 48 Saat	230	75	32.6
0.3µg/ml Toplamı	696	215	30.9
3µg/ml - 6 Saat	250	71	28.4
3µg/ml - 24 Saat	196	55	28.1
3µg/ml - 48 Saat	204	51	25.0
3µg/ml Toplamı	650	177	27.2
30µg/ml - 6 Saat	238	53	22.3
30µg/ml - 24 Saat	194	43	22.2
30µg/ml - 48 Saat	182	25	13.7
30µg/ml Toplamı	614	121	19.7
Doz Grupları Toplamı	1960	513	26.2

Satellit Assosiyasyonu Bulgularının İstatistiksel Değerlendirmesi

Deneklere ait farklı doz-süre kombinasyonlarına ait satelit assosiyasyonu 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 satelit assosiyasyonu oranını etkileyip etkilemediği belirlenmiştir.

Satelit Assosiyasyonlarının Ortalamalarının İstatistiksel Değerlendirmesi

Altı Saatlik Sürede Satelit Assosiyasyonu Karşılaştırması

Altı saatlik süre uygulanmasındaki veriler karşılaştırıldığında; kontrol grubu ile 0.3µg/ml, 3µg/ml ve 30µg/ml lik deney grubu arasında satelit assosiyasyonu açısından anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır (P>0.05) (Tablo 2).

Tablo 2. Altı Saatlik Süre Uygulamasında Doz Grupları İle Kontrol Grubunun Satelit Assosiyasyonları Açısından İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması.

Karşılaştırılan Dozlar	t Değeri	Tablo Değeri	SONUÇ
		0.05	
0.3µg/ml-Kontrol	0.46	1.645	p>0.05
3µg/ml - Kontrol	0.62	1.645	p>0.05
30µg/ml - Kontrol	0.88	1.645	p>0.05

Yirmidört Saatlik Sürede Satelit Assosiyasyonu Karşılaştırması

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

satelit assosiyasyonu açısından anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır (P>0.05). Kontrol grubu ile 30µg/ml deney grubu arasında satelit assosiyasyonu açısından anlamlı bir farkın olduğu saptanmıştır (p<0.05) (Tablo 3).



Tablo 3. Yirmidört Saatlik Süre Uygulamasında Doz Grupları İle Kontrol Grubunun Satelit Assosiyasyonları Açısından İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması.

Karşılaştırılan Dozlar	t Değeri	Tablo Değeri	SONUÇ
		0.05	
0.3µg/ml - Kontrol	0.57	1.645	p>0.05
3µg/ml - Kontrol	1.19	1.645	p>0.05
30µg/ml - Kontrol	2.47	1.645	p<0.05

Kırksekiz Saatlik Sürede Satelit Assosiyasyonu Karşılaştırması

Kontrol grubu ile 0.3µg/ml'lik deney grubu arasında satelit assosiyasyonu açısından anlamlı bir farkın olmadığı saptanmıştır (p>0.05).

Kontrol grubu ile 3µg/ml ve 30µg/ml deney grubu arasında satelit assosiyasyonu açısından anlamlı bir farkın olduğu saptanmıştır (p<0.01) (Tablo 4).

Tablo 4. Kırksekiz Saatlik Süre Uygulamasında Doz Grupları İle Kontrol Grubunun Satelit Assosiyasyonları Açısından İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması.

Karşılaştırılan Dozlar	t Değeri	Tablo Değeri	SONUÇ
		0.05	
0.3µg/ml - Kontrol	1.14	1.645	p>0.05
3µg/ml - Kontrol	2.80	1.645	p<0.01
30µg/ml - Kontrol	5.37	1.645	p<0.01

TARTIŞMA

Satellit assosiyasyonlarının büyük çoğunluğu DD, DG, GG biçiminde olup; ikili veya D ve G grubu kromozomlarının değişik kombinasyonlarından oluşan üçlü, dördü, altılı assosiyasyonlara da rastlanmıştır (Şekil 1). Çalışmamızda bleomycinin, hücrede satelit assosiyasyonu oluşumu oranında bir azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Kontrol gruplarının ortalama %31.7 olan satelit assosiyasyonu değerlerinin 0.3µg/ml'lik doz grubunda %30.9, 3µg/ml'lik doz grubunda %27.2 ve 30µg/ml lik deney grubunda da %19.7'ye düştüğü görülmektedir (Tablo 1). 6, 24 ve 48 saatlik sürelerde, kontrol grupları ile doz gruplarının satelit assosiyasyonu değerleri karşılaştırıldığında; altı saatlik süre uygulamasında kontrol grubu ile doz grupları arasında bir fark görülmezken (p>0.05), 24 saatlik süre uygulamasında kontrol grubu ile 30µg/ml lik doz grubu arasında arasındaki farkın anlamlı olduğu (p<0.05), 48 saatlik süre uygulamasında da kontrol grubu ile 3µg/ml ve 30µg/ml lik doz grubu arasında istatistiksel olarak farkın anlamlı olduğu (p<0.01) tespit edilmiştir.

Erkan'ın (22) 1989'da yaptığı çalışmada sigara içmeyen bireylerde kontrol grubunda %51.3, Bleomycin uyguladığı doz gruplarında ise düşük dozdaki bleomycin uygulanmasının satelit assosiyasyonunu teşvik ettiğini (0.3µg/ml'lik doz grubunda %60.2) yüksek dozdaki bleomycin'inde satelit assosiyasyonunu düşürdüğünü (3µg/ml'lik doz grubunda %54.7 30µg/ml'lik doz grubunda %48.8) belirtmiştir.

Akbaş (23) 1993 yılında yaptığı çalışmada sigara içmeyenlerde %12.9, sigara içen bireylerde %40.8, Sigara içmeyen radyoloji teknisyenlerinde %36.8 ve sigara içen radyoloji teknisyenlerinde %43.9 satelit assosiyasyonu saptadığını belirtmiştir

Çalışmamızdaki verilerle diğer araştırmacıların verileri arasında bir yakınlık yoktur. Ancak yüksek Bleomycin dozunun satelit assosiyasyonu oranlarını düşürdüğü yönündeki ifademiz sayısal değerler açısından farklı olmasına rağmen grupların kendi aralarındaki etkileşimi açısından Erkan'ın (22) sonuçları ile uyum gösterdiği söylenebilir.



KAYNAKLAR

1. Önen S. Radyasyon Biyofiziği Ders Kitabı. İstanbul Üniversitesi Basımevi. İstanbul. 1993.
2. Özbayrak S. Diş Hekimliğinde Röntgen Işımları, Etkileri ve Radyasyondan Korunma. Cemay Organizasyon Matbaacılık. İstanbul. 1987.
3. Hittelman WN, Sen P. Heterogeneity in Chromosome Damage and Repair Rates After Bleomycin in Ataxia Telangiectasia cells. Cancer Research, 1988;48:276-279.
4. Zuckerman JE, Raffin TA, 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, et al. 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 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. Başaran N. Tıbbi Genetik Ders Kitabı 4. Baskı. Bilim ve Teknik Yayınevi. Eskişehir. 1986.
11. Başaran A., Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı 5. baskı, Güneş ve Nobel Tıp Kitapevi, 1999.
12. Sezgin İ, Atalay A. Nitrosopyxolidin'in insan lenfosit kromozomlarına etkisi. Biyokimya Dergisi, XI Ulusal Biyokimya Kongresi Özel Sayısı No:81,1992.
13. Houghton J.A., Relationships between satellite association and the occurrence of non-disjunction in man, Mutat Res. 1979 jun;61(1): 103-114
14. Wachtler F., Andrie M., Rett A., Satellite association in trisomy 21, Wien Klin Wochenscher, 1981 Jan 9; 93(1):13-6
15. Moorhead P.S., Nowell P.C., Moolman W.S., et al. Chromosome preparation of leucocytes cultured from human peripheral blood. Exp. Cell Res. 1961.20:613-616.
16. Mueller RF., Young ID. Emery's Elements of Medical Genetics. Tenth Ed. Churchill Livingstone.1998.
17. Şaylı BS. Medikal Genetik Teorik ve Klinik Sitogenetik 4. Baskı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayını Sayı 381. Ankara 1979.
18. Gustashaw KM. Chromosome Stains. İn: Barch Margaret J.: The Acts Cytogenetics Laboratory Manual Second Ed. Raven Press. New York. 1991-205-269.
19. Rooney DE., Czepukowski BH. Human Cytogenetics. Volum II: 1-25. Oxford University Press. New York.1992.
20. Lüleci G., Başaran S., Bağcı G., Keser İ. Sitogenetik Uygulama Yöntemleri. Metaksan A.Ş. Ankara.1990. 1-50.
21. Yurtseven N. Deneysel İstatistiksel Metotlar. Tarım Orman ve Köy İşleri Bakanlığı Köy Hizmetleri Genel Müdürlüğü Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü Yayınları Teknik Yayın No: 56: 90-313. Ankara.1984.
22. Erkan A. Bleomycin'in İnsan Kromozomları Üzerine Etkisi (Yüksek Lisans Tezi). Diyarbakır. 1989.
23. Akbaş E., Trimethoprim, sigara kullanımı ve radyasyonun insan kromozomlarına etkileri (Doktora Tezi)., Diyarbakır, 1993.

