

X- IŞINI VE TRİMETHOPRİM'İN LENFOSİT KÜLTÜRLERİNDE MITOTİK AKTİVİTEYE KOMBİNE ETKİLERİ*

Combined effects of X-rays and trimethoprim on the mitotic activity in lymphocyte cultures

Etem AKBAŞ¹, Ayla ÇELİK², Gökhan GÖRKEM², Şule YÜKSEKBAŞ³, Betül DALGINLI³

Özet

Amaç: Bu çalışmada X ışınının hücre biyomolekül yapısına ve mitotik aktiviteye etkisi ile çeşitli enfeksiyon hastalıklarının sağaltımı amacıyla kullanılan ancak mitoz mekanizmasında aksamalara yol açma riski bulunan trimethoprimin(TMP) lenfosit kültürlerinde mitotik aktiviteye kombine etkileri araştırılmıştır. X ışınının biyolojik etkisi iki yönlüdür. Doğrudan etkisi çarptıkları biyomoleküllerin yapısını deforme ederek elektron koparmak şeklindedir. İndirekt etkisi de dokudan geçen absorbe olan X ışınının biyomolekül yapılarında deformasyon oluşturması şeklindedir. DNA, RNA, protein ve enzim gibi biyomoleküllerin yapısal deformasyonunun organizmanın düzenli çalışması üzerine etkisi büyüktür, çünkü bunlar organizma için yaşamsal önem taşır.

Gereç ve yöntem: Çalışma beş bireyde yapıldı ve her birey için üç kontrol grubu kullanıldı. Kan örneklerinden mikrokültür yöntemi ile 72 saatlik lenfosit kültürleri hazırlandı ve üç farklı sürede TMP uygulandıktan sonra mitotik indeks incelendi.

Bulgular: Yapılan istatistiksel değerlendirmede, artan TMP dozuna paralel olarak mitotik indeks oranı düşerken ($P<0.01$), uygulama süresi artışı mitotik indeks oranını etkilememiştir ($P>0.05$). Trimethoprim uygulama süresi sabit tutularak-dozunun artırılması mitotik indeks oranını düşürürken ($P<0.01$), trimethoprim dozunun sabit tutularak uygulama süresinin artırılması mitotik indeks oranlarını etkilememiştir ($P>0.05$).

Sonuç: Trimethoprim uygulaması dozla orantılı olarak mitotik indekste düşmeye yol açmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Mitotik aktivite, Mitotik indeks, Trimethoprim, X ışını

Abstract

Purpose: This study investigates the damaging effects of X-rays on the structure of biomolecules in the cell and on the mitotic activity of the cells combined with the effects of trimethoprim (TMP) on mitotic activity in lymphocyte cultures. TMP interferes with the biosynthesis of monomers such as DNA, RNA and proteins. The biological effects of X rays are twofold: the direct effect of X ray is to deform the structure of biomolecules they collide with by breaking off the electrons. The indirect effect is that while passing through the tissues, X ray loses energy and this energy is absorbed by the tissue. As a result a deformation in the structure of the biomolecules occurs. Structural deformation in biomolecules such as DNA, RNA, proteins, and enzymes have profound effects on the proper functioning of the organisms because they are crucial for the survival of the organism. Trimethoprim is a chemotherapeutic agent which is widely used in the treatment of infections.

Material and methods: The blood taken from the nonsmoking radiodiagnostic unit technicians was used in the preparation of the lymphocyte cultures as time-dosage combinations.

Results: In the statistical analysis, while the ratio of mitotic index decreased with increasing doses of TMP ($p<0.01$), it was not affected by the increased duration of treatment ($p>0.05$). The usage of TMP with constant time and increased dosage decreased the ratio of mitotic index ($p<0.01$). However, the usage of TMP with constant dosage and increased time has not changed the ratio of mitotic index ($P>0.05$).

Conclusion: Trimethoprim application causes a decrease of mitotic index and this is inversely proportional with the dosage.

Key Words: Mitotic activity, Mitotic index, Radiation, Trimethoprim, X-rays

* 4-7 Haziran 1996 XIV. Gevher Nesibe Tıp Günleri Mersin Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi MERSİN Moleküler Biyoloji. Y.Doç.Dr.¹, Araş.Gör.Dr.², Biyolog³.

Geliş tarihi: 13 Aralık 1996

Folik asit antagonisti olan TMP, hücrede dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek folinik asit oluşumunu engellemektedir. Folinik asit ise adenin, guanin ve timin nükleotidleri ile glisin, serin ve metionin amino asitlerinin biosentezinde bir

öncül moleküldür. Hücrede folinik asit eksikliği; hücre için yaşamsal öneme sahip olan DNA, RNA ve protein sentezinde aksamalara neden olması söz konusudur (1-4). Bu aksaklıklar ise vücudumuzdaki bölünebilir dokularda mitoz mekanizmasını kısıtlayıcı yönde etkilemektedir.

Radyoloji teknisyenleri mesleki yaşantıları gereği X ışını etkisinde kalmak durumundadırlar. X ışını biyomoleküllere iki şekilde olumsuz etki gösterir. Çarpmış olduğu molekülün elektronlarını kopararak direkt etki veya dokudan geçmesi sırasında kaybettiği enerji komşu moleküllere soğurular ve enerji değeri yükselen bu moleküllerden elektronların kopmasına neden olur (iyonizan etki). Elektron kaybeden biyomolekül, hem yapısı bozulduğundan işlevini yerine getiremez hem de kararsız bir ara radikale indirgendiğinden kaybettiği elektronu komşu moleküllerden kopararak onların yapısını bozar (5- 7).

Uluslararası Radyasyon Korunma Komitesi (ICRP) radyoloji teknisyenleri için yıllık kişisel doz sınırlamalarını el, ayak ve cilt için 500 mili sievert (mSv), göz için 150 mSv bütün vücut için ise 50 mSv olarak belirlemiştir(8). Çalışma grubunu oluşturan radyoloji teknisyenleri günde ortalama 100 röntgen filmi çekmektedir. Her röntgen filminde film çekilen bireye ortalama 0,4 mSv civarında lokal olarak radyasyon uygulanmaktadır. 100 film için bu doz $100 \times 0,4 = 40$ mSv eder. Ancak bu doz hastalara uygulanan doz miktarıdır. Ortama yayılan ışın miktarı bu dozun çok sınırlı bir bölümüdür ve bu dozla da teknisyenler endirekt olarak etkilenmektedir. Ayrıca giyilen özel kıyafetler ve yer yer film banyosu için ortamdaki uzaklaşmalar bu dozu daha da düşürmektedir. Bu nedenlerle teknisyenlerin etkilendikleri ışın dozunu tam olarak saptamak çok güç güçtür. Tüm koruma önlemlerine karşın bu önlemlerdeki eksiklikler, teknisyenlerdeki bilgilendirme yetersizliği ve aşırı iş yükü nedeniyle bu sınırların üzerinde X ışını etkisinde kalabilmektedirler.

Bu çalışmada; çeşitli enfeksiyon hastalıklarında sağaltım amacıyla zorunlu olarak kullanılan ancak

mitoz mekanizmasında aksamalara yol açma riski bulunan trimethoprim ve biyomoleküllerin yapısında bozulmaya yol açarak mitoz mekanizmasını aksatması söz konusu olan X ışınının lenfosit kültürlerinde mitotik aktiviteye kombine etkileri araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

En az beş yıldan beri radyoloji teknisyenliği yapan ve sigara içmeyen 25[±]5 yaşlarında erkek bireylerden alınan kan örneklerinden mikrokültür yöntemi ile 72 saatlik lenfosit kültürleri (100 ml Medium 199-*Gibco* + 18 ml Fetal calf serum-*Gibco* + 4,2 ml Phytohemaglutinin-*Difco* + 0.05 ml streptomisin + 0.01 ml penicillin G) hazırlandı. Çalışma beş bireyde yapıldı ve her birey için üç kontrol grubu (her uygulama süresi için ilgili saatlerde medium 199 eklendi), üç farklı uygulama süresi (6, 24 ve 48 saat) ile terapötik dozundan başlamak üzere artan üç farklı doz TMP (8, 35 ve 60 µg/ml) kombinasyonu olmak üzere 12 kültür hazırlanmıştır. Trimethoprim uygulanması ilgili dozları sağlayacak şekilde stok çözeltilerden (Medium 199 içerisinde TMP çözdürülerek hazırlanmıştır) 0.5 ml alınarak; TMP uygulama süresi 6 saat olan kültürlerle 66. saatte, 24 saat olanlara 48. saatte ve 48 saat olanlara 24. saatte eklendi. Preparasyon saatinden bir saat önce kültürlerle kolşisin eklenerek mitoz aşamasına gelen hücrelerin tutulması sağlandı.

Preparasyon işlemlerinde sırası ile ve 10'ar dakikalık periodlarla hipotonik (% 0,055 KCl) ve beş kez fiksatif (1 hacim asetik asit + 3 hacim metanol) uygulandı. En son fiksatif işleminden sonra periferik yayma işlemi ile preparatlar hazırlandı ve preparatlar % 5 giemsa boyası ile 10 dakika boyanıp aseton ve ksilolden geçirildikten sonra kapatıldı. Radyoloji teknisyenlerinin X ışınlarından etkilenimi in vivo olmasına karşın trimethoprim uygulaması lenfosit kültürlerine in vitro olarak yapılmıştır.

Mitotik indeks: Toplam hücre içinde mitoz aşamasında bulunan hücrelerin % oranı olarak tanımlanmakla beraber - rakamların daha sağlıklı

olabilmesi için, her bir doz süre kombinasyonu için 1000 adet hücre sayıldı ve içeriğindeki mitozun aşamalarına ait hücreler değerlendirmeye alındı. Bu değerler daha sonra yeniden yüzdelere dönüştürüldü. İstatistiksel değerlendirmeler tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Doz gruplarına ait bulgular - Scheffe testi ile test edilerek karşılaştırıldı. Bulgularımız sayımla elde edilen değerlerden oluştuğundan bu testin uygulanabilmesi için, değerler önce yüzde oranlara, daha sonra arcsin transformasyonu ile açı değerlerine dönüştürüldü. Açı değerleri üzerinden yapılan istatistiksel değerlendirmeler ile TMP doz artışı ve TMP uygulama süresi artışının mitotik aktiviteye etkileri belirlendi.

BULGULAR

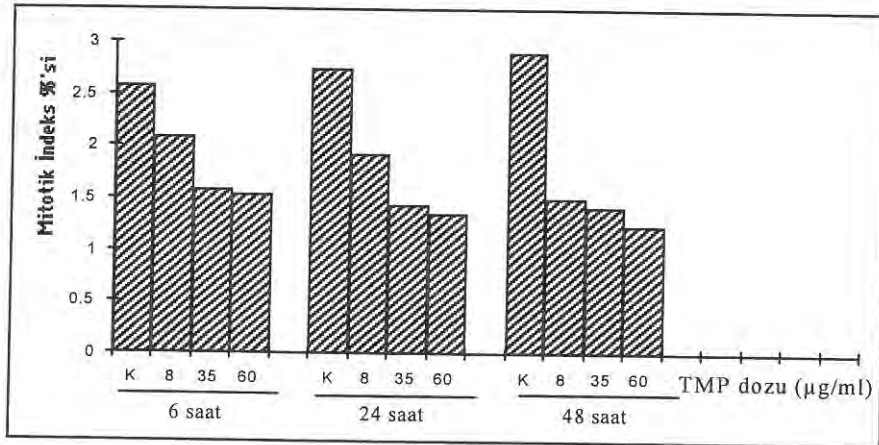
Çalışmalarımızda her uygulama süresi için bir tane olmak üzere; üç kontrol grubu + üç farklı uygulama

süresi (6, 24 ve 48 saat) ile trimethoprimin terapötik dozundan başlamak üzere üç farklı doz (8, 35 ve 60 µg/ml) kombinasyonu uygulanmıştır. Deney ve kontrol grubuna ait bulgular genel olarak incelendiğinde kontrol grubuna göre deney gruplarında mitotik indeks oranlarının belirgin şekilde düştüğü görülmektedir (Tablo I).

Deney ve kontrol gruplarına ait bulgular üzerinde yapılan istatistiksel değerlendirmelerde; artan trimethoprim dozuna paralel olarak mitotik indeks düşerken ($P < 0.01$), mitotik indeks oranları uygulama süresi artışından etkilenmemiştir ($P > 0.05$). Bu nedenle yaptığımız değerlendirmelerde uygulama süresi artışı dışlanarak trimethoprim dozu artışı esas alınmıştır. Uygulama süresinin 6, 24 ve 48 saatte sabit tutularak Trimethoprim dozu artışında mitotik indeks oranları düşmüştür ($P < 0.01$). Trimethoprim dozunun 8, 35 ve 60 µg/ml'de sabit tutularak uygulama süresinin artırılması ise mitotik indeks oranlarını etkilememiştir.

Tablo I. Kontrol ve doz gruplarına ait bulguların istatistiksel değerlendirme sonuçları

Mitotik indeks	Kontrol (X_1) (n=15)	8 µg/ml (X_2) (n=15)	35 µg/ml (X_3) (n=15)	60 µg/ml (X_4) (n=15)	X_1-X_2	X_1-X_3	X_1-X_4	X_2-X_3	X_2-X_4	X_3-X_4
$\bar{X} \pm SD$	9.53±1.13	7.82±0.95	6.80±0.79	6.67±0.84	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P < 0.01$	$P > 0.05$	$P < 0.01$	$P > 0.05$



Şekil 1. Sigara içmeyen radyoloji teknisyenlerinde trimethoprim uygulama süresinin sabit tutulup-trimethoprim dozunun artırılmasında mitotik indeks oranları

TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda her birey için kontrol grubu ve üç farklı doz ile üç farklı sürenin kombinasyonu şeklinde 12 farklı kültür hazırlanmıştır. Her bir doz-süre kombinasyonu için 1000 adet hücre değerlendirmeye alınmıştır. Çalışma beş bireyde yapıldığından (5x12) x1000 =toplam 60 000 hücre değerlendirilmiştir. Mitotik indeks oranları kontrol gruplarında % 2.74 iken, bu oran 8 µg/ml 'de % 1.83, 35 µg/ml 'de % 1.48 ve 60 µg/ml 'de % 1.38'e düşmüştür. Uygulama süresinin üç farklı süre için sabit tutularak, kontrol grubundan doz gruplarına doğru gidildikçe mitotik indeks oranlarındaki bu düşme net şekilde görülmektedir (şekil 1).

Yapılan yayın taramalarında X ışını ve trimethoprimin mitotik aktiviteye kombine etkilerini doğrudan inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak konuya ışık tutabilecek bazı çalışma örnekleri aşağıda verilmiştir.

Obe ve Weissenborn (9); Yüksek ısı altında periferik lenfositlerde radyasyon uygulama öncesi ve sonrasında X ışınının neden olduğu kromozom düzensizliklerini incelediği çalışmada: 4 ml Mc Coy's 5A medium-Gibco + 0.5 ml fetal calf serum-Gibco + 2.4% PHA-Gibco 100 units/ml penicillin ve 100 µg/ml streptomycine içeren kültür ortamında 48 saatlik lenfosit kültürleri hazırlayarak 0.04 µg/ml kolşisin ile 4 saat süre metafaz blokajına uğrattığı hücrelerde; radyasyon uygulanmayanlarda % 8.8 olan mitotik indeks oranlarını, 2 Gy radyasyon uygulananlarda % 7 ve 3 Gy radyasyon uygulananlarda % 3.7'ye düştüğünü belirtmişlerdir. Crown ve arkadaşları(10); radyasyonun; dolaşım kanındaki lenfositlerin morfolojileri ve kromozom düzensizliklerine etkilerini inceledikleri çalışmada; radyoterapi gören kanser hastalarında nötrofil, lenfosit, monosit ve trombosit sayısında ciddi düşüşler olduğunu belirlemişlerdir. Vyas ve arkadaşları(11); İnsan lenfositlerinde interfaz ve metafaz kromozomlarında radyasyonun etkilediği kırık bölgelerini inceledikleri çalışmada, 3 Gy X ışını uygulanan kültürlerde gözlenen metafaz sayısında belirgin azalmalar olduğunu kaydetmiştir.

X ışını ve trimethoprimin kombine uygulanması durumunda, lenfositlerde mitotik indeks oranlarının belirgin şekilde düştüğü şeklindeki bulgumuz; 9 ve 11 numaralı çalışmada, yalnızca radyasyon uygulanmasında mitotik indeksin düştüğü şeklinde, 10 numaralı çalışmada ise radyasyonun lenfositler yanında nötrofil, monosit ve trombositlerde de mitotik aktiviteyi kısıtladığı şeklindeki bulgular birbirini desteklemektedir. Obe ve arkadaşlarının çalışmalarında mitotik indeksin % 8,8 % 7 ve % 3.7 ye düşmesine karşın, bizim bulgularımızdan yüksek olması; kültür ortamının farklılığı, kültür süresindeki farklılık ve kolşisin uygulama sürelerinin bizimkinden dört kat daha yüksek olması ve de deneklerden alınan kan örneklerine X ışınının invitro olarak uygulanması gibi durumlar göz önüne alındığında normal görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Bruchall J. Mechanism of action of trimethoprim - sulphamethoxazole - II. *J Infect Dis* 1973; 128: 437 - 441.
2. Goodman, L S, Gilman A: *Trimethoprim-sulphamethoxazole. The Pharmacological Basis of Therapeutics (5th edition). Mac Millan Publishing Co, New York 1975; 56; pp 1124-1127.*
3. Hitchings GH. Mechanism of action trimethoprim-sulphamethoxazole-I. *J Infect Dis* 1973; 128: 433 - 436.
4. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji III.Cilt 5.baskı, Feryal Matbaası, Ankara 1990, ss 2341 - 2357.
5. Forni A. Chromosomal aberrations in monitoring exposure to mutagen-carcinogens. *IARC Sci Publ* 1984; 59: 325-337.
6. Natarajan AT, Darroudi F, Jha AN, Meijers M, Zdzienicka MZ. Ionising radiation induced DNA lesions which lead to chromosomal aberrations. *Mut Res* 1993; 299: 297-303.
7. Seachs RK, Breenner DJ. Effect of LET on chromosomal aberrations yield. I.no Longlived, exchange-prone double strand breaks play a risk. *Int J Radiat Biol* 1993; 64:6, 677-688.

8. Buyan A G. Radyasyon ile birlikte yaşam. T S E Tüketici Bülteni. 1995; 89: 4 - 7.
9. Obe G, Weissenborn U. Modification, of X-ray induced chromosome aberrations frequency by pre-and post irradiation hyperthermia of human peripheral lymphocytes. *Int J Radiat Biol*, 1991; 59: 973 - 984.
10. Crown J P, Jhanwar S, Haimi J, Andreef M, Gee T. Acquired cyclic haematopoiesis associated with a radiation induced chromosomal abnormality with clonal, morphologically normal circulating leucocytes. *Acta Haematol* 1991; 86: 103 -106.
11. Vyas RC, Darroudi F, Natarajan AT. Radiation-induced chromosomal breakage and rejoining in interphase-metaphase chromosomes of human lymphocytes. *Mut Res* 1991; 249: 29 - 35.