

EDOFERON-KA' NIN SIÇAN KROMOZOMLARI ÜZERİNE ETKİSİ*

The effect of edoferon-KA on rat chromosomes

Ecir Ali ÇAKMAK¹, Mustafa SOLAK¹, Tevhide FİSTİK², Kadir DEMİRCAN³, Halide Gül AKYAR⁴, Çetin ÖZMETİN⁴, Özer ALTUĞ⁵

Özet

Amaç: Bu çalışmada yeni bir teknik (holotransformasyon) üretilen paramagnetik, nonspesifik immünmodülatör ve antineoplastik kimyasal bir ajan olan Edoferon-KA ile Asetil salisilik asitin siçan kromozomları üzerine in vivo etkisinin araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Ortalama ağırlıkları 190 - 245 gr. olan üç aylık 17 adet *Rattus norvegicus* türü beyaz siçan kullanıldı. 1. gruba (kontrol, n = 5) 0.2ml/gün dimetil sülfoksit (DMSO), 2. gruba (n = 6) 16mg/kg/gün asetil salisilik asit ve 3. gruba (n=6) 16mg/kg/gün edoferon-KA 0.2 ml i.p olarak yedi gün süreyle verildi. Asetil salisilik asit ve edoferon-KA, DMSO içinde çözüldü. Deney sonunda siçanların her iki femurundan alınan kemik iliğinden kromozom analizi yapıldı. Hazırlanan preparatlar, mitotik indeks ile yapısal ve sayısal kromozom düzensizlikleri yönünden değerlendirildi.

Bulgular: Yapılan değerlendirme sonunda mitotik indeks; kontrol grubunda 5.9 ± 0.7 , Edoferon-KA grubunda 3.2 ± 0.4 ve Asetil salisilik asit grubunda ise 6.1 ± 0.8 olarak bulundu. Diğer taraftan gözlenen kromozom düzensizlik oranı ise kontrol grubunda $\% 3.8 \pm 0.9$, edoferon-KA grubunda $\% 4.7 \pm 0.8$ ve asetil salisilik asit grubunda $\% 3.5 \pm 0.8$ olarak bulundu.

Sonuç: Sonuç olarak edoferon-KA'nın mitotik indeksi düşürdüğü ancak kromozom düzensizliği yönünden anlamlı bir etki yapmadığı gözlemlendi. Bu çalışmanın sonucunda Edoferon-KA'nın bir mitotik inhibitör olabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Metil salisilat, Mitotik indeks, Kromozom anomalisi

Summary

Purpose: In this study, the effects of acetyl salicylic acid and Edoferon-KA on rat chromosomes were investigated in vivo. Edoferon-KA, produced by holotransformation is a paramagnetic, nonspecific immunomodulator and an antineoplastic chemical agent.

Material and Methods: Seventeen male rats (*Rattus norvegicus*) weighing 190-245 g and aged three months were used. The animals were divided into three groups. The animals in the first group (n=5) received 0.2 ml/day dimethyl sulphoxide (DMSO), the second group (n=6) 16 mg/kg/day acetyl salicylic acid and the third group (n=6) 16 mg/kg/day edoferon-KA intraperitoneally for seven days. Acetyl salicylic acid and Edoferon-KA were dissolved in DMSO. At the end of the experiment, chromosomes were analysed in the rat bone marrow obtained from both femurs. Chromosome abnormalities and mitotic index were evaluated by the light microscope.

Results: The mitotic indexes in the 1st (control), 2nd and 3rd group were 5.9 ± 0.7 , 3.2 ± 0.4 and 6.1 ± 0.8 respectively. On the other hand, the ratio of chromosome abnormalities in the 1st, 2nd and 3rd groups were $3.8 \pm 0.9\%$, $4.7 \pm 0.8\%$ and $3.5 \pm 0.8\%$ respectively.

Conclusion: It was concluded that edoferon-KA decreased mitotic index, without causing any effect on rat chromosomes. Therefore, edoferon-KA may be considered as a mitotic inhibitory agent.

Key Words: Methyl salicylate, Mitotic index, Chromosome aberrations

*XV. Gevher Nesibe Tıp Günleri, 27-30 Mayıs 1997, Kayseri Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi MANİSA Tıbbi Biyoloji ve Genetik. Doç.Dr.¹, Uzm.Dr.², Araş.Gör.Dr.³, Biolog.⁴, Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Bornova, İZMİR Uzm.Dr. Vet.Hek.⁵

Geliş tarihi: 29 Mayıs 1997

Edoferon-KA, non-spesifik immünmodülatör ve antineoplastik özellikte kimyasal bir maddedir. Büyükkoca tarafından laser reaktöründe sentetik olarak üretilmiş ve paramagnetik maddelerin süperkritik sıvı ekstraksiyonu ve separasyon tekniği ile purifiye edilmiştir. Edoferon-KA'nın, temel

yapısı metil salisilatır (Şekil 1). Laser uygulamasından sonra fiziksel ve kimyasal karakteri değişmemekle birlikte yeni biyolojik özellikler kazanmaktadır (1). Edoferon-KA'nın biyolojik aktiviteyi kazanmasında holotransformasyon adı verilen bir yöntemle (2) bütün fiziksel ve kimyasal özellikleri salisine benzeyen bir molekül elde edilmiştir. Yeni biyolojik özellikler kazanan bu kimyasal kompleksin paramagnetik ve diamagnetik olarak birbirine ters olan hem elektron alıcı hem elektron verici iki özelliğe sahip olduğu bildirilmektedir (1, 2). Yapılan bir diğer çalışmada Edoferon - KA'nın asetil salisilik asitten iyon özelliklerinin önemli bir farkının olmadığı saptanmıştır (3).

Bu çalışma; nonspesifik immünmodülatör ve antineoplastik özellikte olan Edoferon -KA ile asetil salisilik asitin sıçan kemik iliği hücrelerinde mitotik indeks ile sıçan kromozomları üzerine in vivo etkilerini araştırmak amacıyla planlanmıştır.

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden sağlanan ve ortalama ağırlıkları 190 - 245 g olan üç aylık 17 adet *Rattus norvegicus* türü beyaz sıçan kullanıldı. Sıçanlar normal yaşam şartlarında tutularak yeterince su içmeleri ve yem yemeleri sağlandı. Hayvanların genel sağlık kontrolleri yapıldıktan sonra üç gruba ayrıldı. birinci gruba (n=5) 0.2 ml/gün dimetil sülfoksit (DMSO), ikinci gruba (n=6) 16 mg/kg/gün asetil salisilik asit, üçüncü gruba (n=6) ise 16 mg/kg/gün edoferon KA DMSO içinde çözülerek her hayvana 0.2 ml. olacak şekilde yedi gün süreyle i.p. olarak verildi.

Deney süresi bitiminde tüm gruplardaki hayvanlara 4 mg/kg colchicine i.p olarak verildi. İki saat sonra kromozom analizi için eter anestezisi altında her iki femurdan her birinin içinde 3 ml fetal calf serum bulunan enjektörlere alınabildiği kadar kemik iliği çekildi. Her biri 1200 rpm de 7 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellete 0.075 M KCL çözeltisinden 5 ml ilave edilerek 37°C de 20 dakika bekletildi ve tekrar 1200 rpm de 7 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak tüpte kalan

pellet metanol : asetik asit (3:1) fiksatifinde iki defa yıkandı ve süpernatant atıldı ve bu esnadan sonra tüpte kalan hücre süspansiyonu preparat üzerine yayılarak oda ısısında havada kurutuldu. Bu preparatlar % 5 Giemsa solusyonu ile 5 dakika boyanarak incelemeye alındı. Her hayvan için hazırlanan preparatlarda mitotik indeksi tesbit için 1000 hücre sayıldı. Ayrıca her hayvan için sayısal ve yapısal kromozom düzensizlikleri yönünden toplam 100 metafaz plağı incelendi.

Sonuçlar bilgisayara uyarlanmış Instat 2.0 (Graph Pad Software and San Diego U.S.A) programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Farklılık bulunan gruplarda Scheffe testi uygulanmıştır.

BULGULAR

Çalışmamızda Edoferon-KA ve asetil salisilik asitin sıçan kemik iliği hücrelerindeki mitotik indeks ve sıçan kromozomları üzerine in vivo etkileri değerlendirildi.

Yapılan değerlendirme sonucunda Tablo I'de görüldüğü gibi Edoferon-KA'nın asetil salisilik asit ve kontrol grubuna göre mitotik indeksi düşürdüğü ve bu düşüşün istatistiksel düzeyde anlamlı olduğu gözlenmiştir. (p< 0.05).

Bu sonuç Edoferon-KA'nın mitotik inhibitör etkisi gösterdiğini ortaya koymaktadır. Yine Tablo I'de çalışma gruplarında gözlenen kromozom düzensizlikleri yer almaktadır. Bu bulgulara göre Edoferon-KA diğer gruplara oranla daha fazla kromatid tipi kırık, gap ve fragment tipi yapısal düzensizlikler oluşturmaktadır. Ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p 0.05, Resim 1).

Yine yapılan değerlendirmede plaklarda kromozom tipi kırık, translokasyon ve ring kromozom gibi yapısal anomaliye rastlanmamıştır.

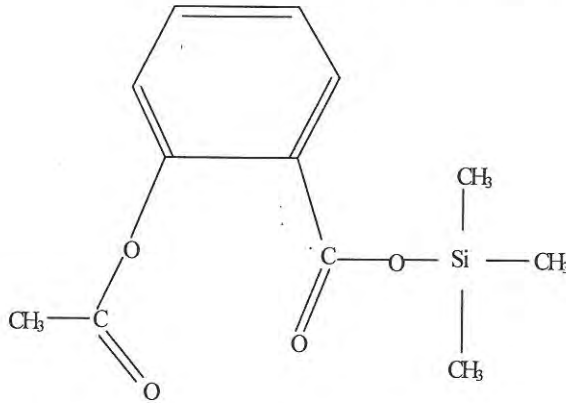
Çalışmada yer alan her üç gruba ilişkin hazırlanan preparatlarda öploidi ve anöploidi türünde herhangi bir anomaliye rastlanmamıştır (Resim 2).

Tablo I. Edoferon-KA ve Asetil salisilik asitte mitotik indeks ve oluşan kromozom düzensizlikleri (SH = Standart hata).

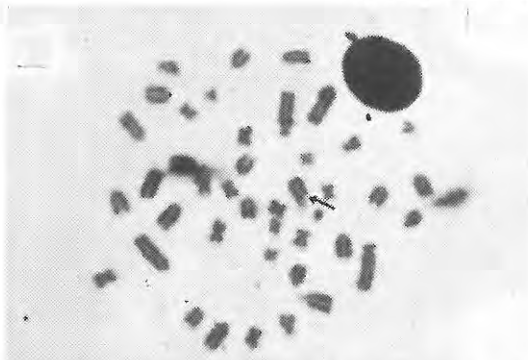
Gruplar	n	Mitotik İndeks X SH	Kromatid Tipi Kırık X SH	Gap X SH	Fragment X SH	Toplam Anomalisi% X SH
1. Grup (Kontrol)	5	5.90.7	1.40.2	1.80.9	0.60.2	3.80.9
2. Grup (Asetil salisilik asit)	6	6.10.8	1.20.5	2.00.3	0.50.3	3.50.8
3. Grup (Edoferon-KA)	6	3.20.4*	1.80.4	1.70.4	0.80.4	4.70.8

* p 0.05

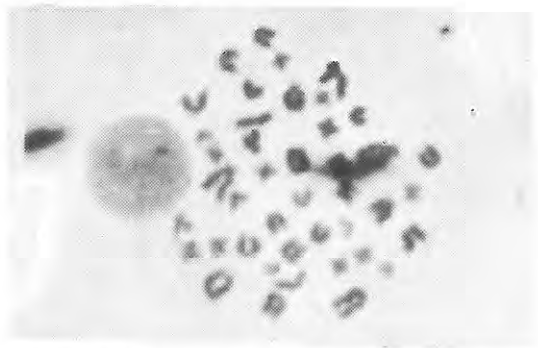
F= 5.79 p < 0.05 F= 0.74 p > 0.05 F= 0.11 p > 0.05 F= 1.12 p > 0.05 F= .62 p > 0.05



Şekil 1. Edoferon-KA'nın moleküler yapısı



Resim 1. Edoferon verilen gruba ilişkin metafaz plağı örneği (→ kromatid tipi kırık)



Resim 2. Kontrol grubuna ilişkin metafaz plağı

TARTIŞMA

Edoferon KA'nın moleküler yapısının kütle spektrumunda I.R, U.V, 13C ve 1H değerlendirmelerinde salisin ile aynı özellikler gösterdiği, ancak ESR ile farklı bir spin taşıdığı saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda Edoferon-KA'nın, fare embriyo kültürlerinde toksik dozunun, salisinin üç katı olduğu, tümörlü farelerde yaşam süresini, periferik kan hücrelerinin fagositik aktivitesini ve P. aeruginosa ile infekte edilen ratlarda periferik kandaki PMNL sayısını önemli oranda arttırdığı ve aktivitelerine yardımcı olduğu saptanmıştır. (4-6). Yine diğer bir çalışmada Edoferon KA'nın asetil salisilik asitle aynı iyon özelliklerini gösterdiği saptanmıştır (3).

Yaptığımız literatür taramasında Edoferon-KA'nın sıçan kromozomları ve mitotik indeks üzerine olan etkisine ilişkin herhangi bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Bizim çalışmamızda Edoferon-KA'nın kromozom düzensizlikleri yönünden kontrol ve asetil salisik asit grubuyla aynı özellikte olduğu, ancak mitotik indeksi diğer gruplara göre önemli düzeyde düşürdüğü saptanmıştır (p<0.05). Edoferon-KA'nın mitotik indeksi önemli düzeyde düşürmesi antineoplastik özelliğini desteklemektedir. Ayrıca Edoferon-KA'nın bir taraftan mitotik indeksi önemli düzeyde düşürmesi diğer taraftan sayısal kromozom düzensizliği oluşturmaması ve yapısal kromozom düzensizliklerinden yalnızca kromatid tipi kırık, gap ve fragment gibi oluşturduğu düzensizliklerin önemsiz düzeyde olması sonucundan hareketle bu madenin hem bir mitotik inhibitör olarak kullanılabileceği ve hem de antineoplastik özelliğinden yararlanılabileceğine işaret etmektedir. Ancak bulgularımız konuya ilişkin ilk bulgular olup

tartışmaya açıktır. Konunun bu yönde yapılacak yeni deneylerle desteklenerek daha sağlıklı bir sonuca ulaşılabileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Büyükkoca E, Berkem ML, Agasiev AA, Altun E, Şengil AZ, Akgüney Y. *Sufi materials: A new generation in advanced materials. 35th IUPAC Congress Abstracts, Istanbul 1995, pp 477 - 478.*
2. Büyükkoca E. *Holotransformation: A new technique for evaluation of a forced convection equation from experimental data. (eds), Glasser PS, Scientific and Technical Data in New Era, Hemisphere Pub Paris 1990, pp 162 - 166.*
3. Şengil AZ, Uyanık BS, Alibey E, Çetinkaya Z. *Edoferon KA'nın iyon özellikleri, 3. Ulusal Biyomedikal Bilim ve Biyoteknoloji Sempozyumu Özet Kitabı, Bursa 1996, ss 57 -58.*
4. Gürbilek M, Şengil AZ, Kara H. *Bir biyomedulatör ajan olan Edoferonun GC - MS'deki analizi. Biyokimya Dergisi 1992;17: 29.*
5. Şengil AZ, Baykan M, Duman S, Gürbilek M, Baysal B, Büyükkoca E. *In vivo effectivity of Edoferon - KA as aparamagnetic substance in treatment alone and in combination with antibiotic agents P. aeruginosa infections in rats. 4th BICON Conference Abstracts, Prague 1992, pp 157.*
6. Şengil AZ, Gürbilek M, Büyükkoca E, Baysal B, Uysal H. *Effect of Adoferon - KA and Aspirin on Tumour Nectosis Factor - alpha in Balb / c mice with peritoneal Ehrlich Ascites tumours. Einhon J, Nord CE, and Norrby SR (Ed). In: Recent Advances in Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington DC 1994, pp 792.*