

Farelerde 3-Metilkolantren İle İndüklenen Fibrosarkoma Üzerine Sisteaminin Etkileri: Genotoksisitenin Araştırılması

Pınar AKSU ¹  Abdullah DOĞAN ¹ Süleyman GÜL ² Ayşe KANICI ¹

¹ Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, TR-36100 Kars - TÜRKİYE

² Kafkas Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, TR-36100 Kars - TÜRKİYE

Makale Kodu (Article Code): KVFD-2013-9172

Özet

Bu çalışmada, fare kemik iliği hücrelerinde 3-Metilkolantrenin genotoksisitesine karşı sisteaminin etkisi araştırıldı. Deneyde beyaz erkek fareler (*Mus musculus albino*) kullanıldı. Fareler her gruba 15 adet olacak şekilde beş gruba ayrıldı. Birinci grup negatif kontrol grubu olarak tutuldu. İkinci gruba susam yağı (0.2 ml, deri altı), üçüncü gruba sisteamin (%0.1 suda oral *ad libitum*), dördüncü gruba 3-Metilkolantren (1 mg 3-Metilkolantren/0.2 ml susam yağı çözeltisinden 0.2 ml deri altı yolla), beşinci gruba 3-Metilkolantren (1 mg 3-Metilkolantren/0.2 ml susam yağı çözeltisinden 0.2 ml deri altı yolla) ve sisteamin (%0.1 oranında suda hazırlanmış sisteamin çözeltisinden oral yolla *ad libitum* olarak verildi. Bütün gruplardaki hayvanlar 4 ay sonra eter anestezisi eşliğinde servikal dislokasyonla ötanazi edildi. Her gruptan 8 adet farenin femur kemik iliği hücrelerinde mitotik aktivite ile mikronükleus testi kullanılarak genotoksik ve sitotoksik etkiler belirlendi. 3-Metilkolantren'in mikronükleuslu polikromatik eritrositlerin sayılarında çoğalma ve kemik iliği hücrelerinde sitotoksik etki meydana getirdiği tespit edildi. Ayrıca mitotik aktiviteyi düşürdüğü gözlemlendi. Bu etkiler istatistiksel açıdan önemli bulundu ($P<0.01$). Sisteaminin ise genotoksik ve sitotoksik etki yapmadığı belirlendi. 3-Metilkolantren ile birlikte uygulanan sisteaminin yalnız başına verilen 3-Metilkolantrene göre mikronükleuslu polikromatik eritrosit sayılarında önemli derecede düşüş, mitotik aktivitede ise artış yaptığı gözlemlendi. Araştırma sonucunda sisteaminin farelerde 3-Metilkolantren ile indüklenen genotoksisiteye karşı koruyucu etki gösterdiği belirlendi.




Anahtar sözcükler: 3-Metilkolantren, Sisteamin, Genotoksisite

The Effects of Cysteamine On the Mice with the 3-Methylcholanthrene and Induced Fibrosarcoma: Investigation of the Genotoxicity

Summary

In this study, the effect of cysteamine against the genotoxicity of 3 Methylcholanthrene's in the cell of mouse bone marrow was examined. In the experiment total of 75 white male mice were used. They were split into 5 groups. First group was kept as negative control group. Sesame oil to the second group (0.2 ml, subcutaneous), cysteamine to the third group (oral *ad libitum* 0.1% in water), 3-Methylcholanthrene to the fourth group (1 mg 3- Methylcholanthrene /0.2 ml from the sesame oil solution 0.2 ml, subcutaneously) and cysteamine (*ad libitum* via oral route from the solution of cysteamine that was prepared in water at the rate of 0.1%) was given. Four months later animals in all groups were euthanased with cervical dislocation (with ether anesthesia). Genotoxic and cytotoxic effects were defined by using mitotic activity and micronucleus in the cells of femur bone marrow of 8 mice from each group. It was determined that 3- Methylcholanthrene has brought about reproduction in the numbers of micronucleus polychromatic erythrocytes and cytotoxic effects in the cells of bone marrow. Furthermore, it was observed that it has slow down the mitotic activity. These effects were statistically considered as significant ($P<0.01$). On the other hand it was determined that the cysteamine did not has an genotoxic and cytotoxic effect. It was observed that when cysteamine used with 3- Methylcholanthrene caused to fall in the numbers of micronucleus polychromatic erythrocytes and upregulation in mitotic activity in comparison with 3- Methylcholanthrene that was given by itself. In the end of the study, it was observed that cysteamine had protective effect against the genotoxicity induced with 3- Methylcholanthrene on the mice.

Keywords: The 3-Methylcholanthrene, Sisteamin, Genotoxicity

 İletişim (Correspondence)
 +90 474 2251150/5126
 pinar-aksu@hotmail.com

GİRİŞ

Günümüzde hızlı ve yanlış planlanan endüstrileşme çevre kirliliğine neden olmaktadır. Dolayısıyla insan, hayvan ve bitkiler çevre kirlenmesinde rol oynayan fiziksel ve kimyasal ajanlara maruz kalmaktadır. Bu nedenle maddelerin toksik etkileri ile zehirlenmelerin tedavi ve korunma yöntemlerinin bilinmesi büyük önem arz etmektedir. Zehirlerin özellikle alerjik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik özelliklerinin tespit edilmesi ve bu tip etkili maddelere karşı önlemler alınması kaçınılmaz görülmektedir [1]. Bu konuda oldukça yaygın araştırmalar yapılmakta olup mutajenik, kanserojenik, teratojenik ve alerjik testlere sıkça başvurulmaktadır. Bir maddenin mutajen ya da karsinojen, diğer bir deyişle genotoksik etkiye sahip olup olmadığının tespit edilmesinde kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom aberasyonu (KA) ve mikronükleus (MN) testi, sık kullanılan testler olup kısa süre içerisinde sonuç vermektedirler [2-7]. Yetişkin kemiricilerde kemik iliği birinci derecede hematopoietik organdır. Hematopoietik hücrelerin bölünmeleri esnasında bazı kimyasal maddeler kromozom hasarına ya da mitozun engellenmesine neden olmaktadır. Kromozomlardaki aberasyon oranındaki artış, kanser riskinin artması anlamına gelmektedir. Kromozomal aberasyonların DNA'daki zincir kırıklarının yanlış onarılmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir. Kromozomal aberasyonlara neden olan kimyasal maddelere bağlı olarak ya tüm kromozomlar, ya da kromozom parçaları hücre bölünmesi esnasında ayrı bir bölüm olarak geride kalıp mikronükleusu oluşturmaktadır. Mikronükleus, mitozun anafaz safhasında kardeş çekirdeğe katılmayan tüm kromozom ya da kromozom parçalarından oluşmuş, genetik materyal (DNA) taşıyan küçük parçacıklardır. Normal hücre çekirdeğinin 1/5 ile 1/20' si arasında bir büyüklüğe sahiptir [8]. Ortaya çıkan mikronükleus sıklığının belirlenmesi mikronükleus testi ile yapılmaktadır. Bu mikronükleus testi, *in vivo* ve *in vitro* olarak mutajen, klastojen ve diğer kimyasal maddeler tarafından indüklenen DNA hasarının belirlenmesinde kullanılan sitogenetik bir testtir. Mikronükleus testi ile uygulanan kimyasal maddenin olgun olmayan polikromatik eritrositlerde (PCE) oluşturduğu kromozom kayıpları ve hasarları, ayrıca dolaşımdaki kanda olgun normokromatik eritrosit'in (NCE) oluşumu üzerindeki etkileri belirlenebilmektedir. Mikronükleus testi kromozomlarda ortaya çıkan sayısal ve yapısal düzensizliklerin dolaylı olarak gösterilmesinde kullanılmaktadır. Organizmayı etkileyen çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların sitogenetik etkilerinin büyük çaplı tarama çalışmalarıyla ortaya konulmasında kullanılabilen güvenli bir test olarak değerlendirilmektedir [1].

Kimyasal maddeler ya doğrudan ya da metabolizma reaksiyonları ile etkinleştikten sonra genetik materyal üzerine etki etmektedirler. Kimyasal karsinojenlerin hücrelerin nükleofillerine karşı affinite gösterip, onları bağlayarak genetik yapının bozulmasına neden olduğu bilinmektedir. Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) en güçlü karsino-

jenler olarak bilinmektedir. PAH'ların içinde yer alan 3-Metilkolanren'in (3-MC) memeli sistemlerinde deneysel olarak toksik ve karsinojenik etkileri gösterilmiştir. 3-MC gibi PAH'lara zift, kurum, sıvı ve katı yakıtlar nedeniyle havada, ekzoz gazında, sigara dumanında, dumanlanmış yiyeceklerde sıklıkla rastlanmaktadır. Toksik etkileri nedeniyle 3-MC çevre sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Vücuda alındığında, mikrozomal P-450 enzim sistemini stimüle ederek fizyolojik madde ve ilaçların metabolizma ve toksisitesini değiştirmektedir [9-12]. Yaptığı indüksiyon sonucu vücutta N-oksidasyon ve hidrosilasyon reaksiyonlarında hızlanmaya neden olmaktadır [10,11,13]. 3-MC ile indüklenen sitokrom P-4501A çok sayıda maddenin biyoaktivasyonunda rol oynamaktadır. Bu nedenle 3-MC hem doğrudan hem de diğer maddeleri aktive ederek mutasyona neden olduğu bilinmektedir. Yaptığı genotoksik etkiler sonucu teratojenite ve çeşitli kanser tipleri ortaya çıkmaktadır [10,11,14].

Sisteamin tiyoetanolanin, beta-merkaptotilamin veya 2-aminoetantiyol yapısında olup, vücutta sisteaminin dekarboksilasyonu ile oluşmaktadır. Koenzim A'nın yapısına girmesi nedeniyle enerji üretimi için gerekli olup antioksidan ve antiklastojenik bir maddedir. İlaç ve zehirlerin detoksifikasyonuna katılan, sisteamin, glutamin ve glisinden oluşan ve bir tripeptit olan glutatyonun yapısında dolaylı olarak yer almaktadır [15-17]. Ayrıca genetik bir hastalık olan sistinozis tedavisinde kullanılmaktadır. Sisteamin vücutta sistin halinde depo edilmektedir. Sistin redüktaz enzimiyle indirgenerek protein sentezinde kullanılmaktadır. Sistini indirgeyen enzim genetik yapıdaki mutasyona bağlı olarak bazı bireylerde bulunmamaktadır. Böyle bireylerde sistin özellikle böbrek, göz, kas ve beyin gibi organlarda hücre içine fazla miktarda çökerek sistinozis denilen hastalığa neden olur. Sisteamin sistin molekülündeki disülfid bağını kopararak sisteamin-sistin ve sisteamin açığa çıkarır. Sisteamin dopamin beta-hidroksilaz enzimini inhibe ederek somatostatini sentezini bloke eder. İnsülin sekresyonunu artırır. Bu etkileri nedeniyle sisteaminin büyümeyi stimüle ettiği bilinmektedir [18-20]. Sisteamin hücre metabolizmasında görev alır. Yapısına girdiği glutatiyondan dolayı sisteaminin hücre savunma sistemlerinde bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. Sisteamin vücutta hipotaurine dönüşerek idrarla atılmaktadır [21-23]. Bu araştırmada sisteaminin farelerde 3-MC ile indüklenen genotoksisite üzerine koruyucu etkisinin olup, olmadığı araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bu araştırma Kafkas Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulundan izin alınarak yapıldı (KAÜ-HADYEK 26.11.2010/49). Araştırmada ağırlıkları 20±2 g olan *Mus musculus* albino fareler kullanıldı. Fareler standart diyet ve çeşme suyuyla *ad libitum* olarak 4 ay süreyle beslendi. Sisteamin (CAS: 156-57-0) Fluka ve 3-MC (CAS: 56-49-

5) Supelco firmalarından temin edildi. Toplam 75 adet fare her grupta 15 adet olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Birinci grup, kontrol grubu olarak tutuldu. İkinci gruptaki hayvanlara skapula hizasından sırt bölgesi derisi altına 0.2 ml susam yağı, üçüncü gruba ad libitum olarak içme suyuyla %0.1 oranında sisteamin 4 ay süreyle verildi (Sisteamin çözeltileri üç günlük hazırlandı). Dördüncü gruptaki hayvanlara sırt bölgesi derisi altına 1 mg 3-MC/0.2 ml susam yağı solüsyonundan 0.2 ml bir kez enjekte edildi (bu gruba sisteamin içme suyuyla verilmedi). Beşinci gruptaki farelere sırt bölgesi derisi altına 1 mg 3-MC/0.2 ml susam yağı solüsyonundan 0.2 ml deri altı yolla bir kez enjekte edildi ve enjeksiyonu takiben içme suyuyla %0.1 oranında sisteamin 4 ay süreyle ad libitum olarak verildi. Süre sonunda hayvanlar tartıldı. Farelere, ötanaziden 2 saat önce 4 mg/kg dozunda kolşisin distile suda çözümlenerek intraperitoneal olarak enjekte edildi. Hayvanlar eter anestezi altında servikal dislokasyon yöntemi ile öldürülüp, her gruptan 8 adet farenin femur kemikleri çıkartıldı. Kemikler kaslarından iyice temizlenerek görünür hale getirildi. Femur kemiklerinden biri mitotik indeksin tespitinde, diğeri ise mikronükleus testinde kullanıldı.

Mitotik aktivite için metafaz preparatları Preston'a göre laboratuvar ve çalışma koşulları göz önünde bulundurularak yapıldı [24]. Her iki femura ait kemik iliği enjektör yardımı ile santrifüj tüpüne aktarıldı (içerisinde 3 ml fetal dana serumu bulunan). Femur örneklerinden birine ait tüpler, 1.100 rpm'de 10 dak. santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Etüvde 0.075 M 5 ml KCl solüsyonu 37°C'de 30 dak. ısıtıldı. Isıtılan hipotonik çözeltide hücreler, 20-30 dak. inkübe edildi. İnkübasyondan sonra hücreler 1.100 rpm'de 10 dak. tekrar santrifüj edilerek, süpernatant atıldı. Hücreler taze olarak hazırlanmış 5 ml soğuk Carnoy's (metanol:glasiyel asetik asit 3:1) içerisinde fikse edilerek, santrifüjlenip, tekrar süpernatant kısmı atıldı. Bu fiksasyon işlemi 3 kez tekrarlanıp, santrifüjden sonra süpernatant kısım, tüpün dibinde 0.5 ml kalacak şekilde uzaklaştırıldı. Dipte kalan hücreler pastör pipeti yardımıyla süspansiyon edildi ve nemli temiz lamlara 3-4 cm yukarıdan damlatılarak yayıldı. Yayma işlemi bittikten sonra preparatlar oda sıcaklığında kurutuldu ve önceden hazırlanan %10'luk giemsa ile 10 dak. boyandı. Olympus CX21 marka ışık mikroskopunda, mitotik aktivite için x1000 büyütmede her hayvan örneğinden rastgele 1.000 hücre sayıldı. Sayılan hücrelerin içerisinde metafaz safhasında olanların adetleri tespit edilip, mitotik indeksleri belirlendi.

Mikronükleus tespiti için kemik iliği preparatları ilk kez Schmid tarafından geliştirilen ve laboratuvar koşullarına göre modifiye edilmiş yöntem ile hazırlandı [25]. Femur kemiği iki ucundan kesilerek, kemik iliği enjektör yardımı ile içerisinde 3 ml dana serumu bulunan santrifüj tüpüne aktarıldı. İçerisinde kemik iliği numunesi bulunan tüpler 2.000 rpm de 5 dak. santrifüj edildi ve süpernatantları atıldı. Tüpte kalan kısmın üzerine bir damla dana serumu konularak süspansiyon edildi. Bundan alınan bir damla örnek

temiz lamlar üzerine yayıldı. Yayma işlemi tamamlanan lamlar havada kurutuldu ve metil alkolde 10 dak. fikse edildi. Fikse edilmiş preparatlar %0.25'lik May Grunwald boyası ile 5 dak. boyanarak saf su ile yıkandı. Daha sonra %0.125'lik May Grunwald boyası ile 5 dak. tekrar boyanarak saf suda yıkandı. En son %20'lik Giemsa boyası ile 30 dak. boyanıp, yıkandı ve kurumaya bırakıldı. Hazırlanan her preparattan rastgele 2.000 adet PCE sayıldı. Bunların içerisinde MNPCE'lerin sayıları belirlenerek, yüzdeleri çıkarıldı. Ayrıca her hayvan örneğinden 1.000 adet eritrosit (PCE+NCE) sayılarak PCE/NCE oranları tespit edildi.

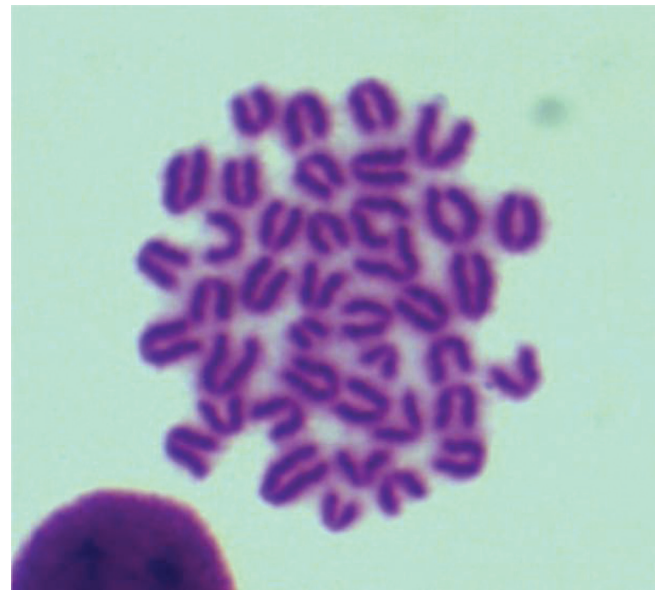
Gruplar arasında gözlenen farklılığın önemi (SPSS 18 paket programı) One - Way ANOVA Duncan testi ile istatistiksel açıdan değerlendirildi. P<0.05 önemli kabul edildi [26].

BULGULAR

Deneyde 4 ay içerisinde dördüncü grupta üç, beşinci grupta ise bir adet fare olmak üzere toplam 4 ölüme rastlandı. Mitotik aktivite ve mikronükleus testi sağlam kalan ve ötanazi edilen hayvanlarda gerçekleştirildi.

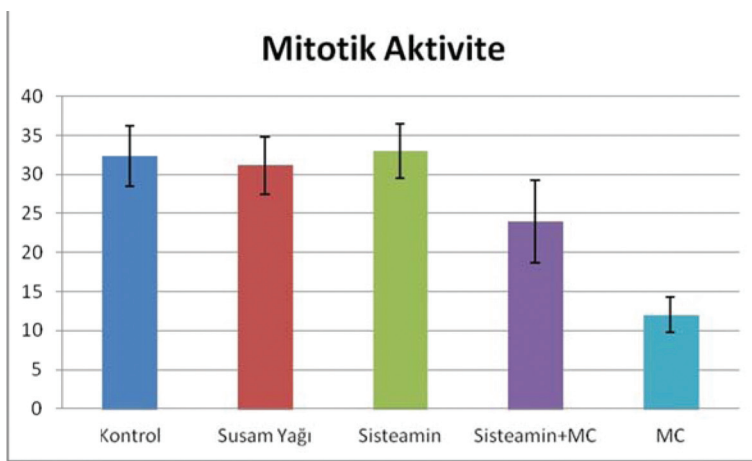
Kontrol ve Deney Gruplarında Mitotik Aktivite

Araştırma *Mus musculus* ırkı albino erkek fare kemik iliği hücrelerindeki mitotik aktivite üzerine etkisinin olup olmadığını belirlemek için her gruptan yaşayan 8 farenin kemik iliği hücreleri üzerinde gerçekleştirildi. Her hayvandan rastgele belirlenen 1.000 hücre sayıldı ve metafaz evresindeki hücreler belirlenerek mitotik aktivite tespit edildi (Şekil 1). Kontrol ve deney gruplarında mitoz görülen hücrelerin yüzde ortalamaları Şekil 2 ve Tablo 1'de gösterilmiştir. Aynı şekilde kontrol ve deney gruplarından elde



Şekil 1. Fare metafaz örneği

Fig 1. Mouse metaphase example



Şekil 2. Mitotik aktivitenin gruplara göre değişimi

Fig 2. Mitotic activity change according to the groups

Tablo 1. Kontrol ve deney gruplarının mitotik aktivite bakımından karşılaştırılması

Table 1. Comparison of the experimental and control groups in terms of mitotic activity

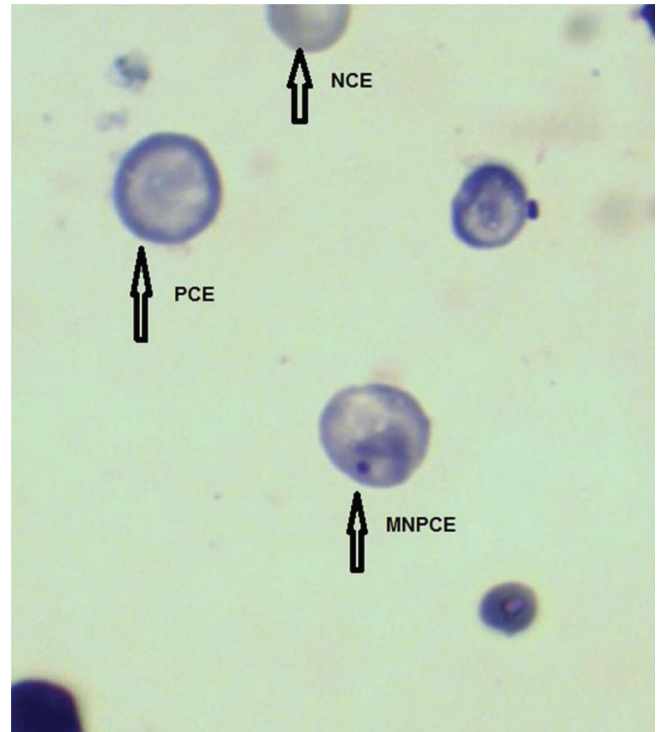
Gruplar	Denek Sayısı	Toplam Hücre Sayısı	İnterfaz Hücre Sayısı	Metafaz Hücre Sayısı	Grup Ortalaması	Metafaz Hücre Oranı Ortalaması (%)
Kontrol	8	8000	7741	259	32.38±3.89 ^c	3.238
Susam Yağı	8	8000	7751	249	31.13±3.68 ^c	3.113
Sisteamin	8	8000	7736	264	33±3.46 ^c	3.3
Sisteamin+MC	8	8000	7807	193	24±5.26 ^b	2.42
MC	8	8000	7904	96	12±2.27 ^a	1.2

Sütunlarda farklı harfler (a,b,c) istatistiksel olarak önemliliği göstermektedir (P<0.001) c-b=P<0.01, c-a=P<0.001, a-b=P<0.001

edilen metafaz evresindeki hücrelerin grup ortalamaları arasında gözlenen farklılığın anlamının belirlenmesi için Duncan Testi yapıldı ve elde edilen sonuçlar Tablo 1'de verildi (P≤0.001). Kontrol ve deney grupları arasında gözlenen farklılık istatistiksel açıdan önemine göre tablo üzerinde harflerle belirtildi. Kontrol, susam yağı ve sisteamin grupları arasında mitotik aktivitede istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmazken, 3-MC'nin mitotik aktiviteyi kontrol gruplarına göre anlamlı bir derecede düşürdüğü tespit edildi (P<0.001). 3-MC ile birlikte uygulanan sisteaminin (Grup 5) kontrol grubuna kıyasla mitotik aktiviteyi önemli ölçüde düşürdüğü fakat bu düşüşün yalnız başına verilen 3-MC'li grup (Grup 4) kadar olmadığı belirlendi (P<0.01).

Kontrol ve Deney Gruplarında Mikronükleus Sıklığı

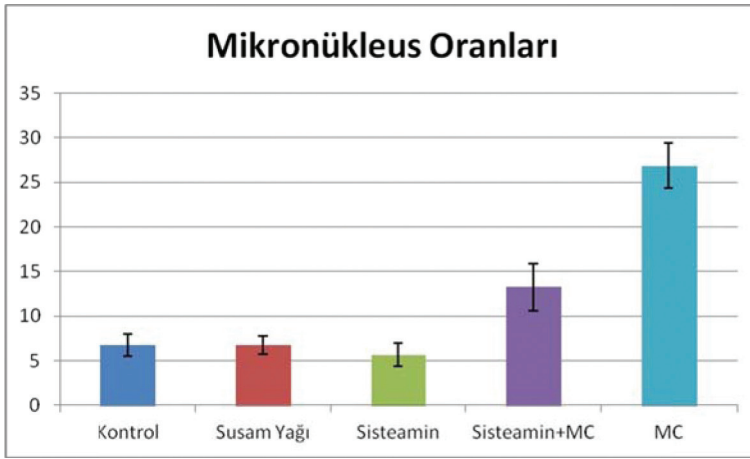
Mikronükleus testi için her bir hayvanın kemik iliği preparatlarında toplam 2000 PCE sayıldı. Sayılan bu 2.000 hücrede MNPCE sayısı belirlendi. Ayrıca her hayvan örneğinden toplam 1.000 eritrosit sayılarak PCE/NCE oranları hesaplandı. 3-MC *Mus musculus* ırkı albino farelerin kemik iliği polikromatik eritrositlerinde mikronükleus oluşturduğu Şekil 3'te gösterildi (MNPCE ve PCE/NCE). Kontrol ve deney gruplarından elde edilen MNPCE ve PCE/NCE oranları Şekil 4 ve Tablo 2'de verildi. Gruplardan elde edilen sonuçlara Duncan Testi uygulanarak bulunan anlamlı sonuçlar (P≤0.001) Tablo 2'de gösterildi. 3-MC uygulanan grupta MNPCE sayısında istatistiksel açıdan önemli bir artış saptandı (P<0.001). Kontrol, susam yağı



Şekil 3. Fare eritrosit (PCE), (NCE), (MNPCE) örnekleri

Fig 3. Mouse erythrocyte (PCE), (NCE), (MNPC) samples

ve sisteamin gruplarında artış gözlenmezken, 3-MC + sisteamin uygulanan grupta kontrol gruplarına kıyasla mikronükleus sayısında önemli bir artış gözlemlendi. Fakat



Şekil 4. Mikronükleus sıklığının gruplara göre değişimi

Fig 4. Micronucleus frequency change according to the groups

Tablo 2. Kontrol ve deney grupları arasında mikronükleus testinden elde edilen sonuçların karşılaştırılması (PCE: Polikromatik Eritrosit, MNPCE: Mikronükleuslu Polikromatik Eritrosit, NCE: Normokromatik Eritrosit)

Table 2. Between the control and experimental groups to compare the results of the micronucleus test (PCE: Polychromatic Erythrocytes, MNPC: Polychromatic Erythrocyte Micronucleus, NE: Normochromatic erythrocyte)

Gruplar	Toplam PCE	MNPCE	MNPCE (%)	Grup Ortalaması	Toplam Eritrosit (PCE+NCE)	PCE Sayısı	NCE Sayısı	PCE/NCE Oranı
Kontrol	16000	54	0.33	6.75±1.28 ^c	8000	4993	3007	1.660 ^b
Susam Yağı	16000	54	0.33	6.75±1.04 ^c	8000	4996	3004	1.663 ^b
Sisteamin	16000	45	0.28	5.63±1.30 ^c	8000	4999	3001	1.665 ^b
Sisteamin+MC	16000	106	0.66	13.25±2.66 ^b	8000	3840	4160	0.923 ^a
MC	16000	215	1.34	26.88±2.53 ^a	8000	3523	4477	0.786 ^a

Sütunlarda farklı harfler (a,b,c) istatistiksel olarak önemliliği göstermektedir (P<0.001), c-b=P<0.001, c-a=P<0.001, b-a=P<0.001

bu artışın 3-MC uygulanan gruptakinden daha az olduğu tespit edildi.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Genotoksik ajanlar hücre DNA'sı üzerinde olumsuz etkilere neden olan, diğer bir deyişle genetik materyali bozan maddelerdir. Yaptıkları genotoksik etkiler mutasyona neden olur. Mutasyon normal somatik hücrelerinde kanserojen, germ hücrelerinde ise teratojen ve kanserojen etkilerle kendisini gösterebilir. Ayrıca çeşitli idiosinkratik ve alerjik reaksiyonlara neden olur. Bu olumsuz etkiler gelecek nesillere aktarılır. Bu nedenle mutasyon daima dikkate alınması gereken bir konudur. Sağlık açısından mutasyon yapıcı ajanların araştırılması ve ortaya konması büyük bir önem arz eder. Ancak her mutasyonun kötü sonuçlara neden olmayabileceğinin unutulmaması gerekir [27].

Bazı farmasötik (yüksek dozlarda) ve kimyasal maddeler, kanser tedavisinde kullanılan sitotoksik (antineoplastik) ajanlar, ayrıca radyoaktif ilaçlar veya böyle maddeleri ihtiva eden atıklar genotoksik etkilere neden olabilmektedirler. Bu tür genotoksik maddeler doğrudan etkili olabilecekleri gibi bazıları metabolik reaksiyonlarla aktif hale dönüşerek genotoksisiteye neden olmaktadır. Vücuttan atılan aktif formları aynı etkiyi diğer canlılar için gösterebilmektedir. İdrar, dışkı veya diğer vücut artıkları

ile aktif formlarda atılan bu tip ajanlar çevredeki diğer canlılarda geno-toksisiteye sebep olabilmektedir. Bu tip canlılar arasında bakteri ve mantarlar da bulunur. Sonuçta bu durum mikroorganizmaların patojenisitesi değişebilir [27].

Deneyel kanser oluşturmada 3-MC fazla kullanılan ajanlar arasındadır. Kansere neden olan bu madde klastojenik etkilidir. Bakterilerde mutajenik etkinliği gösterilmiştir. Bu nedenle kimyasal karsinojen ve mutajen olarak tanımlanmıştır. Hayvanlarda DNA'yı uyardığı bildirilmiştir. Cyp-450 gen ekspresyonunu artırarak kanser gelişimine neden olmaktadır. Yapılan in vivo araştırmalarda 3-MC'nin 40 mg/Kg dozda intraperitoneal olarak bir kez enjekte edilmesiyle 6 saat içerisinde Cyp1A gen transkripsiyon oranında 179 kez artışa neden olduğu belirlenmiştir. Yine Cyp 2C11 geninde transkripsiyon oranında kontrole göre %51 oranında redüklenmeye neden olduğu gösterilmiştir [28-31].

Yapılan bir çalışmada, dimetilnitrozamin, asetilaminofloren, aflatoksin B₁ ve 3-metilkolantrenin mikronükleus testi ile hem fare hem de hamsterlarda genotoksisitesi araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan bu dört kimyasalın kemik iliği hücrelerinde mikronükleus frekansını artırdığı tespit edilmiştir [32].

Yapılan diğer bir çalışmada ise 3-MC'nin fare ve ratlarda fototoksisiteye neden olduğu ortaya konmuştur.

Yine aynı çalışmada 3-MC'nin mutasyona neden olduğu mikronükleus testi ile ispatlanmıştır^[33].

Çeşitli araştırmacılar tarafından sisteaminin antikanerojenik ve antimutajenik etkileri de çalışılmıştır. Doğan ve ark.^[34] yaptıkları araştırmada sisteaminin 3-MC ile indüklenen fibrosarkoma insidensinde azalma yaptığını belirlemişlerdir.

Bianchi ve ark.^[35] tarafından yapılan bir başka çalışmada ise ultraviyole ve floresan ışığına maruz kalan hücrelerde sisteaminin etkisine bakılmıştır. Hücre kültürüne eklenen sisteaminin SCE frekansını artırmadığı, UV ve floresan ışığa maruz kalan hücrelerde SCE frekansında artış olduğu gözlemlenmiştir. UV ve floresan ışığı ile indüklenen hücrelerin sisteamin varlığında SCE frekansında önemli bir düşüş olduğu da tespit edilmiştir.

Tatsuta ve ark.^[36] Wistar ırkı ratlara N-metil-N-Nitro-N-nitrozoguanidin verilerek indüklenen gastrik adenokarsinomaya karşı oral verilen sisteaminin etkisine bakılmış, oral olarak verilen sisteaminin adenokarsinoma sayısını önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir.

Major ve ark.^[37] normal periferik kan lenfositleri, in vitro kültürü yapılmış normal embriyo fibroblastları, down sendromlu hastaların periferik kan lenfositleri ve Trisomy 21'li embriyo fibroblastlarının 3-MC uygulamasından sonraki indüklenbilir kardeş kromatit değişimleri araştırılmıştır. Down sendromu bulunanların lenfositlerinde SCE frekansı sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında 2.5 kat arttığı gözlemlenmiştir. Ancak Trisomy 21'li fibroblastlar normal fibroblastlarla karşılaştırıldığında, MC uygulamasına duyarlı bir yükseliş göstermemişlerdir.

Prasanna ve ark.^[38] benzo[a]pyrene, 3-methylcholanthrene ve 3-methylcholanthrylene'nin Salmonella typhimurium TA98 ve TA100 s suşlarında oluşturduğu mutajenitenin selenyum ile inhibisyonunu çalışmışlardır. Bu maddelerin oluşturduğu mutajeniteyi selenyumun düşürdüğünü gözlemlemişlerdir.

Sozmen ve ark.^[39] farelerde 3-MC ile indüklenmiş fibrosarkomalarda mitosis ve apoptozis ile Tunel metodu kullanarak siklin A'nın ekspresyonunu araştırmışlardır. Sonuç olarak; siklin A ekspresyonunun önemli derecede pozitif korelasyon oluşturup 3-MC ile indüklenen fibrosarkomaların patogenesisinde önemli olabileceğini vurgulamışlardır.

Bu çalışmada 3-MC'nin genotoksik etkisi hem mikronükleus testi hem de mitotik aktivite yöntemi ile belirlenmiştir. 3-MC'nin mitotik aktiviteyi düşürdüğü, mikronükleus frekansını ise artırdığı tespit edilmiştir. Her iki durum kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlar 3-MC'nin genotoksik etkili olduğunu göstermektedir. Çalışmada sisteaminin genotoksik etkilerinde azalma yaptığı görülmektedir. Tablolara bakıldığı zaman kontrol grubunda mitotik aktivite grup ortalaması 32.38

iken, 3-MC'li grupta 12 ve MC + sisteaminli grupta ise 24 olarak bulunmuştur. Yine kontrol grubunda mikronükleus sıklığı grup ortalaması 6.75 iken, MC'li grupta 26.88 ve MC + sisteaminli grupta da 13.25 olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar diğer araştırmacıların elde ettiği bulgularla bir paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak, 3-MC'nin fare kemik iliği hücrelerinde genotoksisiteye neden olduğu, sisteaminin ise 3-MC tarafından oluşturulan bu genotoksik etkiyi azalttığı söylenebilir. Bu bulgular, sisteaminin 3-MC genotoksisitesine karşı kullanımı konusunda yapılacak yeni çalışmalara ışık tutacağı kanısındayız.

KAYNAKALAR

- Demirel S, Zamani AG:** Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Gen Tip Derg*, 12, 123-127, 2002.
- Tucker JD, Auletta A, Cimino MC, Dearfield KL, Jacobsonkram D, Tice RR, Carrano AV:** Sister-chromatid exchange: Second report of the gene-tox program. *Mutat Res*, 297 (2): 101-180, 1993.
- Carrano AV, Natarajan AT:** Consideration for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res*, 204 (3): 379-406, 1988.
- Anderson D:** Human biomonitoring. *Mutat Res*, 204, 353-541, 1988.
- Hagmar L, Brogger A, Hansteen IL, Heim S, Högstedt B, Knudsen L, Lambert B, Linnainmaa K, Mitelman F, Nordenson I, Reuterwall C, Salomaa S, Skerfving S, Sorsa M:** Cancer risk in human predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res*, 54, 2919-2922, 1994.
- Heddle JA, Cimino MC, Hayashi M, Romagna F, Shelby MD, Tucker JD, Vanparys P, Macgregor JT:** Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present and future. *Environ and Mol Mutagen*, 18, 277-291, 1991.
- Fenech M:** Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicol*, 181, 411-416, 2002.
- Lambert IB, Singer TM, Boucher SE, Douglas GR:** Detailed review of transgenic rodent mutation Assays. *Mutat Res*, 590, 1-280, 2005.
- Kaya S, Pirinçci İ:** Çevre Toksikolojisi. In, Kaya S, Pirinçci İ, Bilgili A (Eds): Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. 2. Baskı, 763-764. Medisan Yayınları No: 53, Ankara, 2002.
- Polat F, Turaçlar N, Gül E, Özdemir Ö, Bingöl G:** Mutation analysis of the proto-oncogenes ki-ras and c-myc in the soft tissue tumors of the rats that were format by 3-methylcholanthrene *in vivo*. *DU Fen Bil Enst Derg*, 17, 11-18, 2008.
- Polat F, Özdemir Ö, Elagöz Ş:** Analysis of ki-ras exon 2 gene mutations in 3-methylcholanthrene and butylated hydroxytoluene-induced rat lung tissues. *T J Biol*, 32, 277-282, 2008.
- Murphy SE, Nunes MG, Hatala MA:** Effects of phenobarbitale and 3-methylcholanthrene induction on the formation of free glucuronide metabolites of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, NNK. *Chem-Biol Interact*, 103 (3): 153-166, 1997.
- Lemaire B, Beck M, Jaspert M, Debier C, Calderon PB, Thome JB, Rees JF:** Precision-cut liver slices salmo salar as a tool to investigate the oxidative of CYP 1A-mediated PCP 126 and 3-methylcholanthrene metabolism. *Toxicol in Vitro*, 25 (1): 335-342, 2011.
- Kuroda M, Oikawa K, Yoshida K, Takeuchi A, Takeuchi M, Usui M, Umezawa A, Mukai K:** Effects of 3-methylcholanthrene on the transcriptional activity and mRNA accumulation of the oncogene hWAPL. *Cancer Lett*, 221 (1): 21-28, 2005.
- Kaya S, Ünsal A:** Zehirlerin etki şekilleri ve koruyucu mekanizmalar. In, Kaya S, Pirinçci İ, Bilgili A (Eds): Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. 2. Baskı, 149-179, Medisan Yayınları No: 53, Ankara, 2002.

- 16. Bentley R:** From reaktive C2 unitsto acetyl coenzyme A: A long trail with an acetyl phoshate detour. *Trends Biochem Sci*, 25 (6): 302-304, 2000.
- 17. Miller SL, Schlesinger G:** Prebiotic syntheses of vitamin coenzymes: I. Cysteamine and 2-mercaptoethanesulphonic acid (Coenzym M). *J Mol Evol*, 36 (4): 302-307, 1993.
- 18. Wilmer MJ, Kluijtmans AJ, Van Der Welden TJ, Willems PH, Scheffer PG, Masereeuw M, Monnens LA, Van Den Hauvel LP, Leftchenko EN:** Cysteamine restores glutathione redox status in cultured cystinotic proximal tubular epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1812 (6): 643-651, 2011.
- 19. Basouw M, Levchenko E:** Pharmacokinetics of cysteamine in cystinosis patient treated with hemodialysis. *Pediatr Nephrol*, 26 (4): 639-640, 2011.
- 20. Wenner WJ, Murphy JL:** The effects of cysteamine on the upper gastrointestinal tract of children with cystinosis. *Pediatr Nephrol*, 11 (5): 600-603, 1997.
- 21. Broyer M, Tete MJ, Guest G, Bertheleme JP, Labrousse F, Paison M:** Clinical polymorphysim of cystinosis encephalopathy. Results of treatment with cysteamine. *J Inher Methab Dis*, 19 (1): 65-75, 1996.
- 22. Ahren B, Böttcher G, Ekman R, Sundler F:** Cysteamine and the endocrine pancreas: Immunocytochemical, immunochemical and fonctional aspects. *Cell Tissues*, 256 (1): 159-166, 1998.
- 23. Vecsei L, Ekman R, Alling C, Widerlöv E:** Influence of cysteamine and cysteine on open-field behaviour, and on brain concentration of catecholamine, somatostatin, neuropeptide Y and corticotropin releasing hormone in the heart. *J Neuoral Transm Gen Sect*, 78 (1): 209-220, 1989.
- 24. Preston RJ, Dean BJ, Galloway S, Holden H, McFee AF, Shelby M:** Mammalian *in vivo* cytogenetic assays anaylsis of chromosome aberrations in bone marrow cells. *Mutat Res*, 189 (2): 157-165, 1987.
- 25. Schmid W:** The micronucleus test. *Mutat Res*, 31 (1): 9-15, 1975.
- 26. Tekin ME:** Sağlık Bilimleri İçin Örneklerle Bilgisayarda İstatistik. 2. Baskı, 72-80, Selçuk Üniversitesi Basım Evi, Konya, 2010.
- 27. Doğan A:** Farmakoloji I-II. Ders Notları. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Kars, 2012.
- 28. Rihn BH, Bottin MC, Coulais C, Rouget R, Monhoven N, Baranowski W, Eodorh A, Keith G:** Genotoxicity of 3-methylcholanthrene in liver of transgenic big Blue mice. *Environ Mol Mutagen*, 36 (4): 266-273, 2000.
- 29. Niwa O, Kamiya K, Furihata C, Nitta Y, Wang Z, Fan YJ, Ninomiya Y, Kotomura N, Numoto M, Kominami R:** Association of minisatellite instability with c-myc amplification and K-ras mutation in methylcholanthrene-induced mouse sarcomas. *Cancer Res*, 55 (23): 5670-5676, 1995.
- 30. Gressani KM, Leone-Kabler S, O'Sullivan MG, Case LD, Malkinson AM, Miller MS:** Strain-dependent lung tumor formation in mice transplacentally exposed to 3-methylcholanthrene and post-natally exposed to butylated hydroxytoluene. *Carcinogenesis*, 20 (11): 2159-2165, 1999.
- 31. Lee C, Riddick DS:** Transcriptional suppression of cytochrome P450 2C11 gene expression by 3-methylcholanthrene. *Biochem Pharmacol*, 59 (11): 1417-1423, 2000.
- 32. Friedman MA, Staub J:** Induction of micronuclei in mouse and hamster bone-marrow by chemical carcinogens. *Mutat Res*, 43 (2): 255-261, 1997.
- 33. Donovan PJ, Smith GT, Nardone R:** The mutagenic effect of 7,12-dimethylbenz (a)anthracene, 3-methylcholanthrene and benzo(a) pyrene to the developing syrian hamster fetus measured by an *in vivo/in vitro* mutation assay. *Mutat Res*, 554 (4): 111-117, 2004.
- 34. Doğan A, Aksu P, Erdağ D, Bayezit M, Doğan E, Özcan K:** Farelerde 3-metilkolantren ile indüklenen fibrosarkoma üzerine sisteaminin etkileri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 19 (1): 7-12, 2013.
- 35. Bianchi M, Bianchi N, Cortes Liliana, Reigosa M:** Cysteamine protection of SCEs induced by UV and fluorescent light. *Mutat Res*, 104 (4): 281-286.1982.
- 36. Tatsuta M, Lishi H, Yamamura H, Baba M, Mikoni T, Taniguchi H:** Protective effect of oral cysteamine against induction of gastric cancer by N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine in wistar rats. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 25 (1): 91-97, 1989.
- 37. Major J, Szende B, Lapis K, Thész Z:** Increased SCE inducibility by low doses of methylcholanthrene in lymphocytes obtained from patients with Down's disease. *Mutat Res*, 149 (1): 51-55, 1985.
- 38. Prasanna P, Jacobs MM, Yang SK:** Selenium inhibition of benzo[a]pyrene, 3-methylcholanthrene, and 3-methylcholanthrylene mutagenicity in Salmonella typhimurium strains TA98 and TA100. *Mutat Res*, 190 (2): 101-105, 1987.
- 39. Sozmen M, Tunca R, Erginsoy Dag S:** Cyclin A expression is associated with apoptosis and mitosis in murine 3-methylcholanthrene-induced fibrosarcomas. *Exp Toxicol Pathol*, 61 (1): 41-49, 2009.