

RİFAMİSİNİN İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRLERİNDE SİSTER CHROMATID EXCHANGE (SCE) FREKANSINA ETKİSİ

Ayşen TEZEL, Neşe ATABEY, Meral SAKIZLI

ÖZET

Antibakteriyal, antiviral ve özellikle de antimikobakteriyal etkisi nedeniyle sık kullanılan antibiyotiklerden birisi olan rifamisin (RFM) farklı konsantrasyonlarının (0.5-50 mcg/ml) insan periferik kan lenfositleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) ile işaretlenen kromozomlar, metafaz aşamasında incelenerek SCE frekansı saptanmıştır. Antibiyotik eklenmemiş kontrol grubunda 6 ± 1.61 SCE/hücre olan SCE frekansının 0.5 mcg/ml RFM'de 7.4 ± 2.29 , 1 mcg/ml RFM'de 8.2 ± 3.30 , 2 mcg/ml RFM'de 9.8 ± 2.82 , 4 mcg/ml RFM'de 9.9 ± 2.52 , 10 mcg/ml RFM'de 10.07 ± 2.63 , 50 mcg/ml RFM'de ise 10.93 ± 1.86 SCE/hücre olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar istatistiksel olarak t-testi ile değerlendirildiğinde kontrole oranla SCE frekansındaki artışın 0.5 ve 1 mcg/ml'lik RFM konsantrasyonlarında anlamsız ($p > 0.05$), diğer konsantrasyonlarda anlamlı olduğu belirlenmiştir.

SUMMARY

The effects of rifamycin to sister chromatid exchange (SCE) frequency on the human lymphocyte cultures.

The effects on peripheral human blood lymphocytes of different concentrations (0.5-50 mcg/ml) of RFM which is one of the frequently used antibiotics due to its antibacterial, antiviral and especially antimycobacterial activity, were examined. SCE frequency was assessed by examining of chromosomes which were labelled with 5-bromo-2'-deoxyuridine during the stage of metaphase. It was found that SCE frequency is 6 ± 1.61 SCE/cell in the control group without antibiotic, 7.4 ± 2.29 in the group containing 0.5 mcg/ml RFM, 8.2 ± 3.30 in the group containing 1 mcg/ml RFM, 9.8 ± 2.82 in the group containing 2 mcg/ml RFM, 9.9 ± 2.52 in the group containing 4 mcg/ml RFM, 10.07 ± 2.63 in the group containing 10 mcg/ml RFM, 10.93 ± 1.86 in the group containing 50 mcg/ml RFM. The results were evaluated by student t-test. The increase of SCE frequency was found to be significant in 2 mcg/ml and higher RFM concentrations.

GİRİŞ

Antibiyotikler gerek infeksiyon hastalıklarının tedavisinde gerekse profilaktik amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunların pek çok yan etkilerinin olduğu bilinmektedir. Son yıllarda antibiyotiklerin bilinen yan etkilerinin yanısıra sitogenetik etkilerinin olabileceği de düşünülmektedir.

Bu sitogenetik etkilerin saptanmasında farklı yöntemler kullanılmaktadır. Çeşitli maddelerin DNA'yı etkileyip etkilemediğini belirlemek amacıyla kullanılan yöntemlerden birisi de SCE'dir. Bu maddelerin etkisiyle kardeş kromatidler arasında aynı lokusta parça değişimi varsa, bu değişim SCE ile saptanabilir (2,5-7,10,15).

Antibakteriyel, antitüberkülo ve antiviral etkileri nedeniyle yaygın olarak kullanılan rifamisinler (RFM), DNA kontrolü altında yapılan mRNA sentezini, RNA polimeraz çarşımını inhibe ederek bozar ve böylece bakterisit etki gösterir (14). Bu nedenle zararlı sitogenetik etkilerinin olması da mümkündür.

Bu olası etkilerin in-vitro koşullarda saptanabilmesi amacıyla insan periferik kan lenfosit kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (0.5-50 mcg/ml) RFM eklenmiştir (1,8). BrdU ile işaretlenen kromozom FPG (Fluorescence plus Giemsa) boyama yöntemiyle boyanarak metafaz kromozomları incelenmiştir (6,10,15).

GEREÇ VE YÖNTEM

Periferik kan lenfositleri aşağıdaki özellikleri içeren sağlıklı-yetişkin erkek bireylerden elde edilmiştir:

En az 6 ay radyasyon almamış olmak.

En az 3 ay süreyle antibiyotik veya bir ilaç kullanmamış olmak.

Herhangi bir malignite veya kuşkusu bulunmamak.

Down sendromu, Turner sendromu gibi sitogenetik ve Bloom sendromu, ataxia telangiectasia gibi kromozom kırıklarıyla asosiyet genetik sendromlardan birisini göstermemek,

Kan örneğinin alındığı sırada akut viral enfeksiyonu olmamak (9).

Sitogenetik Uygulama:

1. Kan örneğinin alınması: Steril koşullarda heparinle sıvanmış enjektöre alınan kan; önceden hazırlanan kültüre, aseptik koşullarda konmuştur (9).

2. Kromozom ortamının hazırlanması:

% 80 RPMI 1640 (Flow)

% 20 Föetal dana serumu (Seromed)

% 3 Fitohemaglutinin-M (Seromed)

% 1 L-glutamin (200mM-Merck).

Daha önce hazırlanan ortamlar, aseptik koşullarda ağzı vidalı kapaklı polisitren tüplere 5'er ml olmak üzere dağıtılarak kullanılmaya kadar -20°C 'de bekletilmiştir.

3. Kan örneklerinin ortama eklenmesi (2,7)

4. Kromozomların elde edilmesi (Harvest)

5. FPG boyama yöntemi (5)

6. Preparatlar, ışık mikroskopunda incelenmiştir. Farklı rifamisin konsantrasyonlarında muamele edilen preparatların her birinde 2. mitozda bulunan 30 metafaz incelenmiştir.

100X plan objektifle değerlendirilen metafazların Leitz Laborlux ışık mikroskopuyla Kodacolor Gold 100 Asa 35 mm'lik film kullanarak mikrofotografı çekilmiştir (1,4,9).

İstatistiksel değerlendirme Student-t testi ile yapılmıştır (13).

BULGULAR

İn-vitro şartlarda, farklı rifamisin konsantrasyonlarının periferik kan lenfositleri üzerindeki etkisi sitogenetik yönden incelenmiştir (Tablo). Rifamisin DNA düzeyindeki oluşturabileceği hasar, mitotik indeks üzerindeki etki, bu yöntemle saptanmıştır. DNA düzeyinde oluşturabileceği hasar, her konsantrasyon için hazırlanan preparatlarda, BrdU varlığında iki mitoz geçirmiş hücrelerde metafaz safhasında incelenerek saptanmıştır. Her konsantrasyon için en az 30 metafaz incelenmiş ve elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri Student-t testi ile hesaplanmıştır (Şekil).

Çalışmamızda birisi kontrol, altısı deney olmak üzere 7 ayrı lenfosit kültür seti kullanılmıştır. Tüm deneyler en az iki kez tekrarlanmıştır.

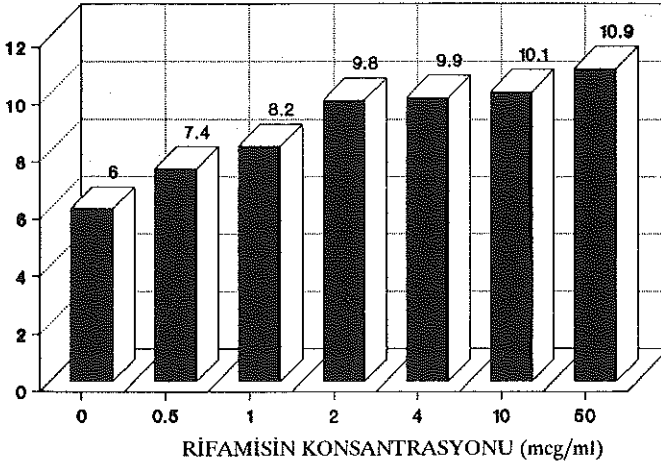
İstatistiksel değerlendirmeler sonucu kontrol grubundaki SCE frekansı 6 ± 1.6 SCE/hücre olarak bulunmuştur. 0.5 mcg/ml rifamisin içeren kromozom ortamındaki SCE frekansı 7.4 ± 2.3 SCE/hücre idi ve kontrol grubuna oranla bu sonucun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p > 0.05$) belirlenmiştir. 1 mcg/ml rifamisin içeren kromozom ortamında ise elde edilen sonuç 8.2 ± 3.3 SCE/hücre idi ve artan bu SCE frekansının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$).

2 mcg/ml rifamisin içeren kromozom ortamında elde edilen SCE frekansı 9.8 ± 2.8 SCE/hücre idi ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bu sonucun anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). 4 mcg/ml rifamisin konsantrasyonunda gözlenen SCE frekansı 9.9 ± 2.5 , 10 mcg/ml'de 10 ± 2.6 ve 50 mcg/ml'de ise 10.9 ± 1.8 SCE/hücre olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gözlenen SCE frekansının istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$).

Tablo. Farklı rifamisin konsantrasyonlarında SCE frekansı/hücre.

Metafaz No.	Rifamisin konsantrasyonu (mcg/ml)						
	0	0.5	1	2	4	10	50
1	2	5	10	3	12	11	10
2	6	8	10	10	11	10	9
3	5	6	10	13	11	8	12
4	8	3	7	9	9	12	15
5	5	5	6	7	7	8	9
6	6	9	11	11	9	8	11
7	4	8	9	10	9	12	10
8	6	5	9	14	7	8	12
9	6	6	6	8	7	18	10
10	5	8	3	10	7	8	15
11	8	7	5	11	18	8	12
12	2	11	15	5	11	12	9
13	7	8	12	10	8	15	9
14	5	8	5	12	9	8	11
15	7	9	8	14	15	15	10
16	7	10	14	12	12	10	13
17	5	14	7	13	9	14	10
18	8	10	5	9	9	9	10
19	6	8	3	10	11	7	11
20	6	8	11	8	10	8	12
21	8	8	7	8	7	12	10
22	8	10	4	9	8	7	9
23	7	8	10	6	12	8	12
24	7	6	6	11	8	10	10
25	7	8	8	7	11	10	11
26	9	6	10	8	8	10	9
27	8	9	11	11	14	9	10
28	4	7	6	12	9	8	9
29	7	8	6	11	9	10	10
30	8	4	9	16	10	9	12
Ortalama	6	7.4	8.2	9.8	9.9	10.1	10.9
\pm SD	± 1.8	± 2.3	± 3.3	± 2.8	± 2.6	± 2.8	± 1.9

SCE FREKANSI/HÜCRE



Şekil. Rifamisin konsantrasyonlarında artışa bağlı SCE frekansı değişimi.

TARTIŞMA

Çeşitli çalışmalarda bazı antibiyotiklerin (4,8,14) ve analjeziklerin (9) mitotik indeks üzerine etkilerinin araştırılmış olmalarına karşın, antibiyotiklerin SCE frekansına etkisine yönelik bir yayına, erişebildiğimiz kaynaklarda rastlanmamıştır.

Antibiyotiklerin bilinen yan etkilerinin yanısıra sitogenetik etkilerinin de araştırılması fikri 1960'lı yıllardan sonra yoğunluk kazanmıştır. 1965'de Neu ve arkadaşları (8) sağlıklı erkeklerden alınarak hazırlanan kan kültürlerinde penisilin, streptomisin, kloramfenikol ve tetrasiklinin in-vitro olarak sitogenetik etkilerini incelemişlerdir. İlaç konsantrasyonu artışına bağlı olarak mitotik indeksin azaldığını, 150 mcg/ml'nin üzerinde ise tamamen inhibe olduğunu belirlemişlerdir. Bu antibiyotiklerden bazılarının gebelerde kullanıldığı ve plasentadan geçebildikleri, buna bağlı olarak doğumsal bazı bozuklukların ortaya çıkabileceğini bildirmişlerdir. Daha sonra yapılan pek çok çalışmada birçok antibiyotiğin insan kromozomlarında düzensizliğe yol açtığı gösterilmiştir (3,11,12,14).

Rifamisin ve ko-trimoksazolun ve rifamisin+ko-trimoksazol kombinasyonunun mitotik indeks üzerine etkisini inceleyen bir çalışmada her üç grupta da tedavi sonrası mitotik indeksin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı ve buna bağlı olarak özellikle çocuklarda gelişimin yavaşlayabileceği belirtilmiştir (4).

Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre rifamisin SCE frekansını artırıcı etki yaptığı, bunun da rifamisin DNA'yı etkilediğinin bir göstergesi olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Baysal B, Şengil AZ, Saniç A, Özerol İH: Tüberküloz olgularında, basillerin isoniasid, streptomycin, ethambutol ve rifampicin'e duyarlılıkları, *ANKEM Derg* 4: 158 (1990).
2. Crossen PE: Giemsa banding patterns of human chromosomes, *Clin Genet* 3: 169 (1974).
3. Gebhart E: Chromosomal studies in bactrim therapy, *Mutat Res* 40 : 280 (1975).
4. Gökçay E, Tanındı Ş, Kacar E, Özcan O, Sezgin İ: Çocuklarda rifampisin, co-trimoxazol ve rifampisin + co-trimoxazol kombinasyonunun mitotik index üzerine etkisi, *Çocuk Hast Derg* 3: 899 (1988).
5. Ikushima T, Wolff S: Sister chromatid exchanges induced by light flashes to 5-bromodeoxy-uridine and 5-iododeoxyuridine substituted Chinese hamster chromosomes, *Exp Cell Res* 87: 15 (1974).
6. Korenberg J R, Freedlander E F: Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges, *Chromosoma* 48: 355 (1974).
7. Morgan W F, Crossen PE: The incidence of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes, *Mutat*

- Res* 42: 305 (1977).
8. Neu R, Aspillaga MJ, Gardner LI: Effects of antibiotics on chromosomes of cultured human leucocytes, *Nature* 205: 171 (1965).
 9. Oral U, Demir Ö, Şaylı BS, Uras A, Keseci J: Halotan ve nörolept anestezi uygulamalarının hücre bölünmesi ve kromozomlara etkilerinin incelenmesi, *Gata Bülleteni* 31: 33 (1989).
 10. Perry P, Wolff S: New giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature* 251: 156 (1974).
 11. Roman IC, Georgian L: Cytogenetics effects of some anti-tuberculosis drugs in vitro, *Mutat Res* 48: 215 (1977).
 12. Stevenson AC: Chromosomal studies in vivo and in vitro of Trimethoprim and Sulfamethoxazole, *Mutat Res* 17: 255 (1973).
 13. Sümülüoğlu K, Sümülüoğlu V: *Biyoistatistik*, Çağ matbaası, Ankara (1987).
 14. Vogel E, Obe G: Testing of rifampicin on possible genetic effects on *Drosophila melanogaster* and human leucocyte chromosomes in vitro, *Experientia* 28: 124 (1973).
 15. Wolff S, Perry P: Differential giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography, *Chromosoma* 48: 341 (1974).