



ESKİŞEHİR TEKNİK ÜNİVERSİTESİ BİLİM VE TEKNOLOJİ DERGİSİ C- YAŞAM BİLİMLERİ VE BİYOTEKNOLOJİ

Eskişehir Technical University Journal of Science and Technology C- Life Sciences and Biotechnology

2019, 8 (2), syf. 261 - 269, DOI: 10.18036/estubtdc.599209

DERLEME

GENO-SİTOTOKSİSİTE ÇALIŞMALARINA SİTOM YAKLAŞIMI

Ceren BÖRÇEK KASURKA *

Ordu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Ordu, Türkiye

ÖZET

DNA hasarının kromozom seviyesinde çalışılması, genetik toksikoloji araştırmalarının temel dayanaklarından biridir. Mikronükleus yöntemi, kromozom hasarını değerlendirmek amacıyla geliştirilen yöntemlerden biridir. Mikronükleuslar; sentromeri olmayan kromozom veya kromatid fragmentlerinden ya da anafazda geç kalıp kutuplara göç edemeyen kromozom veya kromatidlerden oluşan ve telofazda hücre zarı ile kuşatılarak kardeş hücre çekirdeklerine dahil olmadan sitoplazmada kalan, çekirdek dışı küçük cisimciklerdir. Bu yöntemde mikronükleusların yanısıra nükleoplazmik köprüler (NPK) ve nükleer tomurcuklar (NT) değerlendirilebilmekte ve hücre ölümü ile nükleer bölünme indeksi de ölçülebilmektedir. Disentrik kromozomların sentromerlerinin farklı kutuplara göç etmesinden orjinlenen NPK, DNA'nın yanlış onarımının; kromozom rearanjmanının, telomer uç birleşmesinin; NT ise gen amplifikasyonu ve/veya değişmiş gen dozajının göstergesi olarak sayılmaktadır. Ayrıca her hücrenin sahip olduğu çekirdek sayısının değerlendirilerek nükleer bölünme indeksinin hesaplanmasının yanısıra nekrotik ve apoptotik hücrelerin de belirlenebilmesi mitotik aktivite ve sitotoksitenin tayinine olanak sağlamaktadır. Analiz edilebilen tüm bu parametreler mikronükleus yöntemini genetik kusurların, beslenme yetersizliklerinin veya ekzojen kaynaklı genotoksinlerin sebep olduğu kromozomal instabilite fenotipinin ve değişmiş hücresel canlılığın kapsamlı olarak ölçülebildiği "sitom" yöntemi haline getirmiştir. Bu derlemede mikronükleus yönteminin genotoksiste çalışmalarındaki yeri ve önemi ile sitom yaklaşımının bu yöneme kattığı yeniliklere değinilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mikronükleus, Sitom, Genotoksiste, Sitotoksiste

CYTOM APPROACH TO GENO-CYTOTOXICITY STUDIES

ABSTRACT

Working at the chromosomal level of DNA damage is the mainstay of the genetic toxicology researches. The micronucleus assay is one of the developed methods to evaluate chromosomal damage. Micronuclei are non-centromeric chromosomes/chromatids fragments, or chromosomes/chromatids which lagging in the anaphase and cannot migrate to the poles, located in the cytoplasm without being included in the sister cell nuclei and surrounded by cell membranes in telophase. In this method, besides micronuclei, nucleoplasmic bridges (NPBs) and nuclear buds (NBUDs) can be evaluated, cell death and nuclear division index (NDI) can be measured. NPBs originated from the centromeres of dicentric chromosomes migrating to different poles, are indicative of DNA mis-repair, chromosome rearrangement, telomere end-fusions. NBUDs are considered as markers of gene amplification and/or altered gene dosage. In addition to NDI, establishing to necrotic and apoptotic cells may allow the determination of mitotic activity and cytotoxicity. All these analysed parameters have transformed micronucleus method into "cytome" assay by which chromosomal instability phenotypes and altered cellular viability caused by genetic defects, nutritional deficiencies, genotoxins from exogenous sources can be measured comprehensively. In this review, the place and importance of micronucleus method in genotoxicity studies and the innovations caused by the cytome approach are mentioned.

Keywords: Micronucleus, Cytome, Genotoxicity, Cytotoxicity

*Sorumlu Yazar: cerenborcek@yahoo.com

Geliş: 03.07.2018 Kabul: 11.03.2019

1. GİRİŞ

Bileşiklerin toksik etkisi, bileşiğin konsantrasyonu ve maruz kalma süresinin bileşkesidir. Bir toksine maruz kalan hücre popülasyonunda, hücre tipine ve yoğunluğa bağlı olmakla beraber dinamik değişiklikler ortaya çıkar. *In vitro* şartlarda yetişen hücrelerde bileşiklerin etkilerinin analiz edilmesi, tüm hayvanlarda potansiyel toksik etkilere dair öngörü oluşturmak amacıyla yapılmaktadır [1].

Çekirdekte, kromozomlarda ve/veya DNA yapısında meydana gelen hasarları nitelemek amacıyla “genetik toksisite” ya da “genotoksisite” terimleri kullanılmaktadır. Başka bir deyişle genotoksisite, kimyasal maddelerin DNA’ya veya genomun doğruluğunu düzenleyen hücresel bileşenlere (iğ iplikçiklerine, topoizomerazlara, DNA onarım sistemine, DNA polimerazlara) zarar verme kapasitesini ve genetik bilgi üzerindeki yan etkileri ifade etmektedir. Genetik materyale potansiyel zararı olan maddelerin etkileri, doğrudan veya dolaylı yoldan gerçekleşebilmektedir. Zararlı etkiler sadece mutajenik maddelerden kaynaklanmayabilir. Bu nedenle, genotoksisite, mutasyonlarda artış yapma yeteneği demek olan mutajeniteden daha kapsamlı bir biyolojik olaydır. Sitotoksisite terimi ise hücre ölümüne neden olan anlamını taşımaktadır [2-4].

Genotoksisitesi araştırılacak maddelerin güvenlik değerlendirmeleri yapılırken; gen mutasyonu, klastojenite ve anöploidi gibi anormallikleri değerlendiren farklı testlerin kombinasyonları uygulanır. Çünkü bu üç sonlanım noktası genel olarak insan hastalıkları ile ilişkilendirilen genetik hasarlara yol açmaktadır. Bu üç genetik değişim, eğer germ hücrelerinde oluşursa kalıtılabilir etkilere sahip olarak ileriki nesiller açısından ciddi risk oluşturma potansiyeli de taşımaktadırlar. Somatik hücrelerdeki benzer değişimler ise malignansi oluşumunda önemli rol üstlenirler. Maruziyet süresi ve maddenin konsantrasyonuna bağlı olarak genotoksik veya mutajenik maddelerin oluşturacağı genetik hasarın derecesi değişebilmektedir [3, 5, 6].

İnsanoğlunun genetik bütünlüğü kimyasal ve fiziksel genotoksinlere maruziyete sebep olan endüstriyel faaliyetlerin, beslenme alışkanlıkları gibi hayat stili faktörlerinin, çeşitli tıbbi tedavilerin, UV maruziyetinde artışa sebep olan iklimsel değişiklikler gibi etkenlerin giderek artan tehdidi altındadır. Bu nedenle, insan popülasyonunda genetik hasarın kabul edilebilir seviyesini, belirli genotoksinlere aşırı duyarlı olabilecek bireyleri, çevreye salınan yeni kimyasalların olası etkilerini, büyük bir kazadan sonra bir popülasyonda genetik hasar artış oranını belirleyebilmek ve mesleki açıdan genetik düzeyde zararlı olabilecek ajanlara maruz kalan kişileri rutin olarak izlemek önemlidir [7]. Birçok kronik dejeneratif hastalığın temelinde genetik hasar yatmaktadır. Hatasız ölçümler, hasarın önlenmesi ve genomik sağlık durumunun geliştirilmesi açısından önemlidir. Bu sebeple DNA hasarının ölçülebilmesi amacıyla çeşitli metotlar geliştirilmiştir. Son 50 yılda kimyasalların rutin analizinde, çevresel araştırmalarda ve ayrıca mesleki maruziyetin, yaşam tarzı faktörlerinin ve beslenmenin DNA bütünlüğü üzerindeki etkisine ilişkin insan çalışmalarında kullanılmak amacıyla geliştirilen genotoksisite test prosedürleri geniş bir yelpazede oluşturmuştur [8, 9]. Genotoksik olduğu bilinen kimyasalların kromozom anomalileri ile kardeş kromatid değişimlerini indüklediği 1970’lerde belirlenmiştir [6]. Aradan geçen süre içinde çok çeşitli genotoksisite testleri geliştirilmiş olmakla birlikte hiçbir yöntem tek başına etkili bir tarama sağlayamamaktadır [7].

Çeşitli etki mekanizmaları ile doğrudan veya dolaylı olarak genetik hasarı indükleyen maddeleri belirlemek amacıyla *in vitro* ve *in vivo* olarak tanımlanan genotoksisite testleri uygulanmaktadır. Genotoksisite testlerinin uygulanışı, uzun dönemli karsinojenite çalışmalarının tasarlanması, yürütülmesi ve yorumlanması için de önemlidir. Yüksek hassasiyetleri ve hızlı sonuç vermeleri nedeniyle genotoksisite araştırmalarında *in vitro* yöntemlerin kullanımı tercih edilmektedir [5].

Genotoksik ve mutajenik açıdan incelenecek maddelerin etkilerini ortaya çıkarmak amacıyla en yaygın kullanılan *in vivo* ve *in vitro* testler Ames Testi, Comet Testi, Kromozom Anormallikleri Testi, Mikronükleus Testi ve Kardeş Kromatid Değişim Testidir [2, 3, 5, 10-12].

2. MİKRONÜKLEUS YÖNTEMİ

Radyasyon tarafından indüklenen asentrik kromatid veya kromozom fragmanlarından kaynaklanan ve normal çekirdeklerden görece küçük olan; mikronükleus (MN) -ilk çalışmalarda fragment nükleus olarak da geçmekteydi- olarak isimlendirilen ilave çekirdeklerin varlığı; mikronükleus sıklığının kromozom aberasyon sıklığı ile ilişkili olduğu ve bu sebeple kromozomal hasar miktarının ölçülmesi amacıyla kullanılabilmesi 1950'lerden beri bilinmektedir. İlk mikronükleus çalışmaları bitki kökleri üzerinde yapılmıştır [13-15]. Mikronükleus sayımının kemik iliği gibi bölünen hücrelerde *in vivo* kromozom hasarını değerlendirmek için bir alternatif olabileceği Schmid [16] ve Heddle [17] tarafından bağımsız olarak önerilmiştir. O tarihten bu yana mikronükleus yöntemi, genetik toksikoloji çalışmalarının vazgeçilmez testlerinden biri haline gelmiştir [14, 18].

Mikronükleus yönteminin farklı hücre tiplerine uygulanması yoluyla popülasyondaki genetik hasarın izlenmesi, genotoksik ilaçların araştırılması, radyasyona karşı tümör duyarlılığının tespiti ve radyasyon duyarlılığının değerlendirilmesi mümkün olmaktadır. Protokol farklılıklarına rağmen MN indüksiyonu, hastalıkların ve DNA hasarının indüksiyonu ile ilgili süreçlerde de etkili bir biomarker olarak dikkate alınmaktadır [14]. MN yöntemi, çevresel ajanlardan kaynaklanan genetik hasarın belirlenmesi için biyolojik bir belirteç olarak ya da nanopartikül veya ilaçlar gibi yeni ürünlerin biyolojik uyumluluğunu tanımlamak için de kullanılmaktadır [19].

MN tekniği ile hem klastojen hem de önojen maddeler tespit edilebilir. Ayrıca immünokimyasal etiketleme sayesinde kinetokor, sentromer veya telomer gibi spesifik nükleer elemanların MN doğası ve mekanizması üzerindeki rolü de incelenebilmektedir [3].

Artmış MN sıklığı kümülatif DNA hasarını ve bazı hastalıklar için yüksek riski göstermektedir. Bu sebeple normal bir populasyon için referans frekansı belirlemek, genomik hasarın derecesini ve farklı çevresel genotoksik faktörlere maruz kalan populasyonlar ile normal populasyon arasında kanser ve diğer hastalıklar açısından riski değerlendirmek ve karşılaştırmak için temel oluşturur [8, 19]. Bu amaçla, 1997 yılında, dünya çapında farklı laboratuvarlarda, farklı popülasyonlarda MN sıklığının referans değerini belirlemek amacıyla Michael Fenech ve Stefano Bonassi önderliğinde "HUMAN MicroNucleus" projesi başlatılmıştır. MN sıklığının ölçümünde karışıklığa neden olan etkenleri tanımlamak, populasyon bazlı çalışmalarda standart protokol(ler) olarak kullanılan farklı teknikleri karşılaştırmak, olgu-kontrol çalışmaları olarak kontrollü giden prospektif çalışmalar uygulamak ve MN'nin yaşlanmayı da içeren kanser ve diğer hastalıklar için bir biyolojik belirteç olarak uygunluğunu incelemek projenin hedefleri arasındadır [20].

Mikronükleus yöntemi, nükleer bölünmesini tamamlayan ama sitoplazma bölünmesi aktin polimeraz inhibitörü sitokalsin-B ile engellenmiş hücrelerde çekirdek dışında kalmış genetik materyallerin belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntem ile kromozom kayıpları ve kromozom kırıkları hatasız şekilde ölçülüp değerlendirilmektedir. Standart protokole göre 44.saatte sitokalsin B eklenir ve 72. saatte kültür sonlandırılır. Oysa geç bölünen hücrelerin sayısını maksimuma çıkarmak için sitokalsin B'yi 24. saatte eklemek ve 96. saatte kültürü sonlandırmak da standart protokolle aynı ölçüde kullanışlıdır Periferale lenfositler, toplandıkları zaman hasar belirlenmesi için ideal olan G₀ fazındadırlar. Oysa hücreler S, G₂ ve M fazlarında genotoksik etkenlere karşı daha hassastır, bu sebeple test edilecek maddeleri, hücrelerin çoğu bölünürken uygulamak esastır (Fenech, 2000; Mateuca et al., 2006; OECD, 2016b).

Klasik sitogenetik tekniklerde kromozomlar, metafazlarda aberasyonlar gözlenerek ve sayılarak doğrudan çalışılır. Bu yaklaşım en ayrıntılı analizi sağlasa da metafazlardaki aberasyonların değerlendirilmesinin zahmetli ve karmaşık oluşu ayrıca preparasyon tekniğinden kaynaklı kayıplar ve artefaktlar, kromozom hasarının değerlendirilmesi için daha basit bir sistem geliştirilmesi gerekliliğini doğurmuştur. Mikronükleus yöntemi, klasik kromozom analiz yöntemi kadar hassas bir DNA hasarı indikatörü olarak değerlendirilmektedir. İlaveten, MN tekniği, kromozom aberasyon tekniği ile karşılaştırıldığında skorlaması daha kolaydır. Buna ek olarak kromozom analiz yöntemi ile karşılaştırıldığında değerlendirme yapmak için sayımının görece basit olması, ileri tecrübe gerektirmemesi ve zaman kullanımını açısından da daha tasarruflu bir yöntem olduğu araştırmacılar tarafından öne sürülmektedir. Ama bu yöntemin asıl avantajı, daha fazla sayıda hücre incelenmesine dayanan istatistiksel değerlendirme sonucunun yüksek güvenilirlikte olmasıdır. Bu avantaj, kromozom analizinde kullanılan kolşisin blokajının 1-4 saat, mikronükleus yönteminde uygulanan sitokinez blokajının ise 24-28 saat sürmesi ve akabinde etkilenen toplam hücre miktarından kaynaklanmaktadır [12, 21].

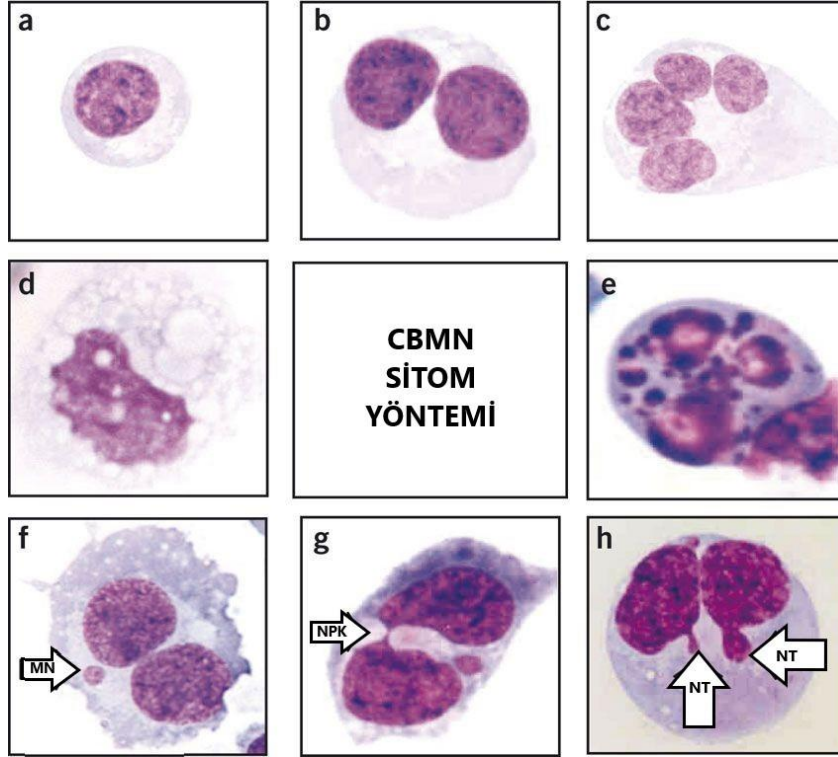
Mikronükleus tekniği ilk kullanılmaya başlandığında sadece bölünme sürecini tamamlamış hücrelerde MN oluşumu görülebilmekteydi. Bu sebeple ilk çalışmalarda maruziyetin ardından bölünen hücrelerde MN oluşumlarının değerlendirilebildiği biyolojik bir dozimetre olarak nitelendirilmiştir. Araştırmacıların bir küf mantarının metaboliti olan sitokalsin-B'nin kültüre eklenmesi sonucu hücrelerde sitokinezin engellendiğini bulması sayesinde bu durum aşılmış oldu ve böylece bir nükleer bölünmesini tamamlamış hücrelerin binükleat görünümü ile tanınmasına olanak sağlandı. Bu gelişimin ardında teknik artık "Sitokinezi Bloklanmış Mikronükleus Tekniği (The cytokinesis-block micronucleus technique-CBMN)" olarak literatüre geçti [22]. Günümüzde CBMN tekniği, bölünen ve bölünmeyen hücreler arasında ayırım yapamayan konvansiyonel yöntemlerden daha kesin ve daha duyarlı bir teknik olarak kabul görmektedir. Ayrıca maruziyetin ardında bir bölünme geçiren hücrelerin ayırtedilebilmesi de yöntemsel gelişimde önemli bir basamaktır [20].

3. MİKRONÜKLEUS YÖNTEMİNDE "SİTOM" YAKLAŞIMI

İnsan hücrelerindeki MN indeksi, genetik toksikoloji araştırmaları için standart sitogenetik testlerden biri haline geldi. Geçen yıllar için CBMN tekniği kromozom kırığı, kromozom kaybı, ayırlamama, nekroz, apoptoz ve sitositazin ölçüldüğü karşılaştırmalı bir metoda dönüştü. Binükleat hücrelerde MN sayılarken nükleoplazmik köprülerin (NPK) de değerlendirilmesiyle kromozom rearanjmanlarının da kaydedilmesi sağlandı. "Sitom (cytome)" konsepti, incelenen sistemdeki her hücrenin canlılık durumu (nekroz, apoptoz), mitotik durum (mononükleotid, metafaz, anafaz, bir nükleuslu, çok çekirdekli) ve kromozomal instabilitesi ya da hasar durumu (MN, NPK'ler, NT'ler) açısından sitolojik olarak skorlandığını göstermektedir [23]. CBMN tekniğinin "CBMN-cytome" tekniğine evrilmesi ile MN, NPK ve NT sayesinde kromozomal instabilite veya hasar durumu; hücrelerin çekirdek sayısı ve hücre döngüsü evrelerinin değerlendirilmesi ile mitotik durum ve nekrotik ve apoptatik hücrelerin değerlendirilmesi ile de canlılık durumu hakkında bilgi sağlamaktadır (Şekil 1) [24].

Mikronükleusların oluşum mekanizmalarına baktığımızda; sentromeri olmayan kromozom veya kromatid fragmentlerinden ya da anafazda geç kalıp kutuplara göç edemeyen kromozom veya kromatidler karşımıza çıkmaktadır. Arta kalan bu genetik materyallerin çevresi telofazda hücre zarı ile kuşatılır ve kardeş hücre çekirdeklerine dahil olmadan sitoplazmada yer alan çekirdek dışı küçük cisimcikler olarak kalır. Mikronükleus adı da bu durumdan köken almaktadır. Mikronükleusları oluşturan kromozom fragmentleri; doğrudan çift zincir kırıkları, replikasyonun ardından çift zincir kırığına dönüşen tek zincir kırıkları veya DNA sentezinin inhibisyonu sonucu oluşmaktadır. Oluşan kırık tekrar birleşmez ise, bir delesyonlu kromozom ve bir asentrik fragment meydana gelir. Kromozom kırılması sonucu oluşan

asentrik parçalar ya metafazda kaybolur ya da anafazda mikronükleusları oluştururlar. Sentromerik ve perisentromerik tekrar bölgelerindeki sitozin rezidülerinin hipometilasyonu da mikronükleus oluşumunu etkileyen bir diğer faktördür. Metilasyon profili değişen tekrar bölgeleri, kinetokor proteinlerinin iğ iplikçikleri ile doğru bağlantı kurma yeteneğinin kaybolmasına ve dolayısıyla kromozom kayıplarına yol açmaktadır. Diğer yandan, mitoz kontrol noktalarındaki hatalar, anormal sentrozom amplifikasyonları ve mitotik iğ iplikçiklerinin toplanmasındaki kusurlar da kromozom kayıplarını artırarak mikronükleus oluşumuna katkı sağlamaktadırlar. Mikronükleus oluşumunun satelit DNA bölgelerinin hipometilasyonunun sonucu olarak artabileceği de düşünülmektedir. Ayrıca hücre döngüsü kontrol noktalarında veya DNA tamirinde görevli “housekeeping” genlerin promotor bölgelerindeki ya da yakınlarındaki CpG adacıklarının hipermetilasyonu da genom hasarını arttırabilmektedir [12, 14, 18, 25]. Spontan mikronükleus oluşumuna katkı sağlayabilecek mutasyonlar ise; kinetokor proteinleri, sentromerler ve iğ iplikçiklerinde meydana gelen ve eşit olmayan kromozom dağılımına veya anafazda kromozom kaybına sebebiyet veren mutasyonlar ile endojen veya ekzojen mutajenlerden kaynaklanan DNA zincir kırıklarının tamir edilmemesinin sebebiyet verdiği asentrik kromozom fragmentleri olarak sıralanabilir [7].



Şekil 1: CBMN-cyt analizi için değerlendirilen parametreler (a) Mononükleated hücre (b) Binükleat hücre; (c) Multinükleat hücre; (d) Erken nekrotik hücre; (e) Geç apoptotik hücre; (f) Mikronükleus taşıyan binükleat hücre; (g) Nükleoplazmik köprü ve mikronükleus taşıyan binükleat hücre (h) Nükleer tomurcuklar bulunduran binükleat hücre [23].

Mikronükleuslar, morfolojik olarak ana çekirdeğe benzemekle birlikte daha küçüktürler. Fenech [7]; mikronükleusların değerlendirme kriterlerini (i) Çapları, ana çekirdeğin 1/16 ile 1/3 olmalı; (ii) Işık

kırılmasına sebep olmamalı; (iii) Nükleoplasmik bir köprü ile ana çekirdeğe bağlı olmamalı şeklinde bildirmiştir.

Binükleat hücrelerin çekirdekleri arasındaki köprüler; “Nükleoplasmik köprüler” de kromozom rearanjmanının ölçütü olarak CBMN-cyt tekniğinde MN’ların yanısıra sayılmalıdır. Disentrik kromozomların sentromerlerinin anafazda hücrenin karşı kutuplarına çekilmesiyle NPK’lerin meydana geldiği kabul edilmektedir. NPK’lerin oluşumlarında rol alan temel mekanizmalar; disentrik veya multisentrik kromozomların sentromerlerinin anafazda farklı kutuplara çekilmesi; DNA kırıklarının yanlış onarımı; fazla kısa olan telomerlere, işlevsiz telomerlere ya da telomer olmamasına bağlı olarak telomer uç birleşmeleri; anafazda kardeş kromatidlerin hatalı ayrılması olarak sayılabilir [18, 23].

Nükleer tomurcukların oluşum süreci, gen amplifikasyonunu indükleyen kuvvetli seçici koşullar altında yetiştirilen kültürlerde gözlenmiştir. Gen amplifikasyonunun, metotreksat gibi ilaçlara karşı hücrel dirençte ve tümör progresyonunda önemli bir olay olduğu düşünülmektedir. Çekirdekten nükleer materyalin aktif eliminasyon süreci; kırık-birleşme-köprü döngüsü ile oluşan amplifiye DNA’nın eliminasyonu; DNA tamirinde DNA-protein komplekslerinin eliminasyonu; kazla kromozomların eliminasyonu (polipoid hücrelerde anöploididen kurtulmayı kolaylaştırmak için); kırılmış NPK’lerin kalıntılarının iki çekirdek arasında çekilmesi bir veya her iki çekirdekte de geçici bir NT ile sonuçlanabilir [18].

İlk çekirdek bölünmesini takiben kültüre eklenen sitokalsin-B, bölünen hücrelerin iki çekirdekli (binükleat) aşamada tutulmasını sağlamaktadır. Mikronükleus sayımında bu iki çekirdekli hücreler değerlendirilmektedir. Nükleer bölünme indeksi (NBİ) de birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü çekirdek bölünmelerini geçiren hücrelerin sayısıyla gerçekleşmektedir. Nükleer bölünme indeksi, hücre bölünmesinin inhibisyonu, yani sitotoksiste hakkında bilgi vermektedir [12, 14].

CBMN-cyt tekniğinde her slaytın analizinde en az 1000 binükleat hücre değerlendirilmeli ve MN’lar, NPK’ler ve NT’lar sayılmalıdır. Sağlıklı bireylere ait lenfositlerde 1000 binükleat hücre değerlendirildiğinde MN oranı 0-3 arasında olmalıdır. Bu oran genotoksin maruziyetine ve yaşa bağlı olarak artabilmektedir.

Nükleer bölünme indeksini (NBİ) hesaplamak üzere 500 hücre değerlendirip mononükleat, binükleat, trinükleat ve tetranükleat hücreler sayılmalıdır. NBİ ve binükleat hücrelerin oranı, lenfositlerin mitojenik cevabının ve kullanılan ajanın sitostatik etkilerinin karşılaştırılması için faydalı parametrelerdir.

Nükleer bölünmenin daha doğru şekilde değerlendirmesi için skorlanan hücrelerin toplam sayısına nekrotik ve apoptotik hücreler eklenmesiyle sağanabilir. Çünkü test edilen kimyasalların toksik olan daha yüksek dozlarında, hücrelerin büyük bir bölümünün canlı olmaması beklenmektedir. Nekrotik ve apoptotik hücrelerin dahil edilmediği değerlendirmelerde binükleat oranının ve NBİ’nin var olandan daha yüksek belirlendiği unutulmamalıdır. Nükleer bölünme sitotoksiste indeksi (NBSİ) hesaplaması yapabilmek için 500 hücre değerlendirilerek mononükleat, binükleat, trinükleat ve tetranükleat hücrelerin yanı sıra apoptotik veya nekrotik hücreler de sayılmalıdır. Ama tam kan kültürü MN tekniğinde kullanılan hipotonik uygulaması nekrotik ve apoptotik hücrelerin morfolojilerini bozarak yok edebilmektedir. Bu sebeple nekrotik ve apoptotik hücrelerin de değerlendirilebilmesi için hipotonik uygulaması gerektirmeyen hücre hattı kültürleri veya izole edilmiş lenfositlerden kurulan kültürlerle çalışmak gerekmektedir. NBİ ve NBSİ parametrelerinin hesaplanması için kullanılan formüller [14, 26];

$$NBİ = (M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4))/N$$

$$NBSİ = (Ap + Nec + M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4))/N$$

(Ap: Apoptotik hücre sayısı; Nec: Nekrotik hücre sayısı; M1: Mononükleat hücre sayısı; M2: Binükleat hücre sayısı; M3: Trinükleat hücre sayısı; M4: tetranükleat hücre sayısı; N: Toplam değerlendirilen hücre sayısı)

4. SONUÇ

CBMN-cyt tekniği sayesinde araştırmacılar; kromozomal instabilite fenotipi, kırık-füzyon-köprü döngüsü, DNA yanlış onarımı, kromozom kırığı ve asimetrik rearanjmanı, telemor uç birleşmesi, hücre döngüsü kontrol noktası işlev bozuklukları, kromozomların yanlış ayrılması (pansentromerik ve ya kromozom spesifik problemlerle kullanıldığında), gen amplifikasyonu ve fazla DNA'nın nükleer eliminasyonu, DNA hipometilasyonu, değişmiş mitotik aktivite ve/veya sitostatiz, nekroz veya apoptoz yoluyla hücre ölümü gibi hücrel ve nükleer disfonksiyon çalışmalarını yapabilmektedir.

CBMN yönteminin, *in vitro* veya *in vivo* yaşlanma, mikro besin eksikliği veya fazlalığı, genotoksin maruziyeti ve genom muhafazasında genetik kusurların neden olduğu hücrel ve nükleer disfonksiyonun çalışması için etkili bir araç olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca bu yöntemin nutrigenomik ve toksikogenomik alanlarında da verimli sonuçlar ortaya koyduğu son çalışmalar tarafından gösterilmiştir [23]. Sonuç olarak, CBMN yöntemi, kromozom instabilitesi, hücre ölümü ve sitostatin çeşitli yönlerinin doğrudan ve/veya dolaylı olarak ölçülmesini sağlayan etkili bir "sitome" yöntemi haline gelmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma 10-11.Kasım.2017 tarihinde düzenlenen III. Uluslararası Multidisipliner Çalışmaları Sempozyumu (ISMS)'nda sözlü bildiri olarak sunulmuş olup özet kısmı ilgili sempozyumun özet kitabında yer almaktadır.

KAYNAKLAR

- [1] Riss TL, Moravec RA, Niles AL. Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death. *Methods Mol Biol.* 2011; 740:103-14.
- [2] Atlı Şekeroğlu Z, Şekeroğlu V. Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 2011;4(3):221-9.
- [3] Eastmond DA, Hartwig A, Anderson D, Anwar WA, Cimino MC, Dobrev I, et al. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. *Mutagenesis*, 2009; 24(4):341-9.
- [4] Tokur O, Aksoy A. *In Vitro Sitotoksosite Testleri*, 2017; 112-8 p.
- [5] Jena GB, Kaul CL, Ramarao P. Genotoxicity Testing, A Regulatory Requirement For Drug Discovery And Development: Impact Of Ich Guidelines. *Indian Journal of Pharmacology*, 2002; 34:86-99.

- [6] Mark H, Naram R, Pham T, Shah K, Cousens LP, Wiersch C, et al. A practical cytogenetic protocol for in vitro cytotoxicity and genotoxicity testing. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 1994; 24(5):387-95.
- [7] Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1993; 285(1):35-44.
- [8] Cho NY, Kim KW, Kim KK. Genomic health status assessed by a cytokinesis-block micronucleus cytome assay in a healthy middle-aged Korean population. *Mutat Res.* 2017; 814:7-13.
- [9] Knasmüller S, Nersesyanyan A, Mišík M, Gerner C, Mikulits W, Ehrlich V, et al. Use of conventional and -omics based methods for health claims of dietary antioxidants: a critical overview. *British Journal of Nutrition*, 2008; 99(E-S1):ES3-ES52.
- [10] Kocaman AY, Rencüzoğulları E, Topaktaş M. In vitro investigation of the genotoxic and cytotoxic effects of thiacloprid in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Environmental toxicology*, 2014; 29(6):631-41.
- [11] Tucker JD, Preston RJ. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 1996; 365(1-3):147-59.
- [12] Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*, 2006; 88(11):1515-31.
- [13] Evans HJ, Neary GJ, Williamson FS. The Relative Biological Efficiency of Single Doses of Fast Neutrons and Gamma-rays on Vicia Faba Roots and the Effect of Oxygen. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 1959; 1(3):216-29.
- [14] Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2000; 455(1–2):81-95.
- [15] Thoday J. The Effect of Ionizing Radiations on the Broad Bean Root—Part IX. *The British journal of radiology*, 1951; 24(286):572-6.
- [16] Schmid W. The micronucleus test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 1975; 31(1):9-15.
- [17] Heddle JA. A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1973; 18(2):187-90.

- [18] Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, Surralles J, Crott JW, Parry J, et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, 2011; 26(1):125-32.
- [19] Coskun M, Cayir A, Coskun M, Tok H. Evaluation of background DNA damage in a Turkish population measured by means of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutat Res.* 2013; 757(1):23-7.
- [20] Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The HUMAN MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1999; 428(1–2):271-83.
- [21] Duan H, Leng S, Pan Z, Dai Y, Niu Y, Huang C, et al. Biomarkers measured by cytokinesis-block micronucleus cytome assay for evaluating genetic damages induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2009; 677(1-2):93-9.
- [22] Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 1985; 147(1):29-36.
- [23] Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res.* 2006; 600(1-2):58-66.
- [24] Donmez-Altuntas H, Bitgen N. Evaluation of the genotoxicity and cytotoxicity in the general population in Turkey by use of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutat Res.* 2012;748(1-2):1-7.
- [25] Üstüner D. Kromozom kırıkları ve mikronükleus-apoptoz. *TÜBAV Bilim Dergisi*, 2011; 4(1).
- [26] OECD. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. Paris: OECD Publishing; 2016.