

İndol-3-asetik asit'in üçüncü nesil farelerin kemik iliği hücrelerinde mitotik indeks üzerine etkisi

H. Ramazan Yılmaz*, Eşref Yüksel**

*Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, Isparta,
**Gazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara

Özet

Bir bitki büyüme hormonu olan oksin İndol-3-Asetik Asit'in (IAA) reaktif oksijen türlerini (ROT) ürettiği, nötrofil, lenfosit ve makrofajlar üzerine sitotoksik etkisi olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, IAA'in üçüncü nesil farelerin (Mus musculus) kemik iliği hücreleri mitotik indeksine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, dişi fareler IAA, kontrol etanol ve kontrol serum fizyolojik grubu olmak üzere üç gruba bölündü. İki dişi bir erkekle çiftleştirildi. IAA, farelere 300 mg/kg vücut ağırlığı dozu 1/40 sulandırılarak üç günde bir deri altına (ip) verildi. Kontrol etanol grubuna IAA'nın çözündüğü etanol ve kontrol serum fizyolojik grubuna da serum fizyolojik aynı yolla verildi. Bu işlemler üç nesil boyunca tekrarlandı. Çalışma sonunda, IAA'in üçüncü nesil farelerde mitotik indeksi, kontrol grubuna göre arttırdığı gözlemlendi. Sonuç olarak, IAA'in mitotik indeksi aktive ettiği söylenebilir.

Anahtar kelimeler: İndol-3-asetik asit, mitotik indeks, fare.

Abstract

The effect of indole-3-acetic acid on mitotic index on bone marrow cells of third generation mice

The plant growth-hormone auxin indole-3-acetic acid (IAA) is known to generate reactive oxygen species and be cytotoxic on neutrophils, macrophages and lymphocytes. The aim of present study was to investigate the effect of IAA on mitotic index in the bone marrow cells of third offsprings mice (Mus musculus). Female mice were divided into three groups: IAA-treated group and ethanol control group and serum physiologic control group. For mating, two females and one male were held in a stainless steel cage. All chemicals were applied intraperitoneally (i.p.). IAA was administered to maternal mice as a 1/40 dilution of 300 mg/kg body weight in 3 day intervals. Ethanol and serum physiologic was administered in the control group. These applications were continued for three generations.

Mitotic index increased in the IAA groups compared to control groups in the bone marrow cells of the third generations mice.

The results demonstrated that IAA increased mitotic index in the bone marrow cells of the third generations of mice.

Key words: Indole-3-acetic acid, mitotic index, mice.

Bu çalışma, V. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi 09-12 Ekim 2002 Konya'da poster olarak sunulmuştur.

Giriş

Tarımsal üretimi artırma durumundaki ülkeler bitki büyüme hormonlarının yanında bazı pestisit ve herbisitleri de yoğun olarak kullanmaktadır. Ancak, bu kimyasalların kullanımı aynı zamanda çevre kirliliğine de sebep olmaktadır. Bu maddelerin yarılanma ömürleri oldukça uzun olup, toprakta, sebze ve meyveler üzerinde kalmakta ve besin zinciri ile de insana kadar ulaşmaktadır. Bilhassa bitki büyüme hormonları canlı sistemden tamamen atılmayıp organlarda depolanmakta ve fonksiyon

bozukluklarına neden olmaktadır (1,2). İndol-3-asetik asit (IAA, C₁₀H₉NO₂, MW 175.2) bitki büyüme maddesi olarak bitkilerde embriyogenezden senesense kadar gelişimin her evresinde etkili olmaktadır (3).

Bitki büyüme maddeleri tarımda ve seracılıkta yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu maddelerin bir kısmı bitkilerde özellikle de sebze ve meyvelerde tam yıkıma uğramadan depolanmakta, böylece bu besinlerin hayvanlar ve insanlar tarafından alınmasıyla bitki büyüme maddeleri hayvansal dokularda birikmektedir (1,2).

IAA, birçok hayvanın embriyo, larva, beyin omirilik sıvısı, kan, akciğer, böbrek, karaciğer ve beyinde tespit edilmiştir (4,5). Embriyonik gelişimde rolü

Yazışma Adresi: Dr. H.Ramazan YILMAZ
Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD (Morfoloji Binası) 32260, ISPARTA
Tel : [+90]246-211-3330 Fax: [+90]246-237-1165
E-mail: hramazany@yahoo.com

olan IAA'in farklı sentez yolları vardır. Farede triptofandan triptamin; triptaminden de IAA sentezlenir. Triptaminin ana metabolik ürünü olan IAA, insanın merkezi sinir sisteminde triptaminin fonksiyonel bir göstergesi olarak düşünülebilir (4,6). Triptamin canlıda çok düşük miktarlarda olduğundan (örneğin sıçan beyinde 0.5 ng/g) ölçülmesi oldukça zordur (6). Fakat, IAA'in düşük konsantrasyonlarda (10-15 ng/g fare beyinde) ölçülmesi mümkündür (6). İnsanda, IAA ve metabolitlerinin plazmadaki düzeylerinin, fenilketonuri ve böbrek yetmezliği gibi hastalıklarda arttığı bulunmuştur (5). IAA'in fare karaciğer ve böbreğinde triptofandan sentezlendiği ve yüksek konsantrasyonlarının, fare fibroblast 3T3 hücrelerine toksik etki yaptığı gösterilmiştir (4). Deneysel olarak, IAA'in kültür ortamındaki sıçan nötrofillerinde şekil bozukluklarına ve ölümlerine sebep olduğu, ayrıca güçlü bir teratojenik etkiye sahip olduğu açıklanmıştır (5,7). Sıçanlarda myotoniye, farelerde anti-inflamatuvar etkiye ve hem sıçan hem de insanda hypoglisemiye neden olduğu tesbit edilmiştir (5,7). IAA'in sıçan karaciğer ve böbreğinde malondialdehit seviyesini artırdığı, fare böbreğinde katalaz aktivitesini inhibe ettiği, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, heksokinaz, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz, 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, malat dehidrogenaz ve laktat dehidrogenaz enzimlerinin aktivitelerini değiştirmedeği belirtilmiştir (8-10) Bu çalışmada, bir bitki büyüme hormonu olan IAA'in düşük dozları hamile farelere deri altına uygulanarak, IAA'in üçüncü nesil farelerin kemik iliği hücrelerinde mitotik indeksi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda, ağırlıkları 18-22 g olan albino Mus musculus türü dişi fareler kullanıldı. Hayvanlar normal fare yemiyle beslendi ve yeterince su içmeleri sağlandı. IAA'in etkisinin açığa çıkarılması için, %70 etanol uygulanan kontrol grupları oluşturuldu. Ayrıca, %70 etanolün etkisini açığa çıkarmak için serum fizyolojik kontrol grubu oluşturuldu. Her grup için 5'er dişi kullanıldı. İki dişi bir erkekle çiftleştirilmek üzere kafeslere yerleştirildi ve iki gece bir arada tutularak çiftleştirildi. Üç günde bir IAA grubundaki dişilere 300 mg/kg vücut ağırlığı dozu 1/40 seyreltilerek i.p. olarak uygulandı (11). Bu uygulamaya yavrular doğduktan sonraki 55. güne kadar devam edildi. 55. günde deney için kullanılacak yavruların boyunları kırılarak öldürüldükten sonra kemik iliği alındı. Bu işlemler üç nesil boyunca

yapıldı. Mitotik indeks çalışmasında sadece yavrular kullanıldı.

Mitotik indeks ile ilgili incelemeler için Patton (12)'nin "Colchicinehypotonic citrate" tekniğinin Yüksel (13) tarafından modifiye edilen yöntemi kullanıldı. Fareler eterle bayıltılarak intraperitoneal olarak 1 g vücut ağırlığı başına, %1 kolşisinden 0.01ml enjekte edildikten sonra 2,5-3,5 saat kadar bekletildi. Daha sonra hayvanların boyun kemikleri kırılarak öldürüldü ve femur ilikleri %1 sodyum sitrat enjeksiyonu ile bir tüp içerisine alındı ve 30°C'de 15 dakika hipotenize edildi. Hücreler metanol-asetik asit (3:1, v/v) içinde fikse edildi, soğuk lamlar üzerine damlatıldı ve kurutuldu. Mitotik indeksin incelenmesi için lamlar %10 giemsa ile boyandı. Hazırlanmış olan preparatlar Olympus Vanox araştırma mikroskobu ile incelendi.

Mitotik indeks: Her farenin kemik iliği preparatında toplam 1000 hücrede bölünen hücre sayısı belirlendikten sonra yüzde olarak hesaplandı. Bulguların istatistiksel değerlendirilmesinde Ki kare testi kullanıldı.

Bulgular

Deney ve kontrol grubu farelerin F3 nesillerinin kemik iliği hücrelerinde mitotik indeks değerleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Üçüncü nesilde kemik iliği hücrelerinde mitotik indeks değerleri.

Gruplar	Hayvan Sayısı	Uygulanan Madde	Uygulama	İncelenen Hücre Sayısı	Mitotik İndeks (%)
Kontrol I	5	Serum Fizyolojik	i.p.	5000	2.90
Kontrol II	5	%70'lik Etanol	i.p.	5000	2.92
Deney	5	IAA	i.p.	5000	3.70*

*P<0.03

3. neslinde, IAA grubunda, kontrol gruplarına göre, mitotik indekste anlamlı bir artma tespit edildi (p<0.03). Kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada bitki büyüme hormonu olan IAA hamile farelere deri altına uygulanarak, IAA'in üçüncü nesil farelerin kemik iliği hücrelerinde mitotik indeksi üzerine etkisi araştırıldı. IAA'in üçüncü nesil fare kemik iliği hücrelerinde mitotik indeksi, kontrol grubuna göre arttırdığı gözlemlendi (P<0.03). Yaptığımız bir çalışmada, IAA'in birinci ve ikinci nesil farelerde kemik iliği hücrelerinde mitotik indeksi arttırdığını gözlemledik (14). Ayrıca, başka bir çalışmamızda, IAA'in farelerin üç nesil boyunca fare kemik iliğinde

kromozom sayısı ve yapısında bir anomaliye neden olmadığını gözledik (15). Mitotik indeksteki artış, IAA'nın DNA ve RNA miktarlarını artırmasından dolayı olabilir. Kowalska (16) yaptığı bir çalışmada, 3-indolasetik asitin insan fibroblast kültüründe DNA ve RNA miktarını arttırdığını belirtmiştir. IAA bitkilerde özel proteinlerin sentezi, hücre bölünmesi, büyümesi ve farklılaşması gibi fizyolojik fonksiyonları düzenlemektedir (17). IAA bazı bileşiklerle birleşerek hücre bölünmesi için aktivatör bir rol oynamış olabilir. Bertuzzi ve arkadaşları (7) IAA'nın insan serum albumini ile birleştiğini belirtmişlerdir. Bitkilerde IAA çoğu zaman, bazı aminoasit, peptit ve şekerlerle birleşebilir (18). Ayrıca IAA, hücre bölünmesini kontrol eden molekülleri uyararak hücre bölünmesini arttırmış olabilir. Hücre döngüsünün kontrolü G1/S ve G2/M geçiş noktalarının yakınında yapıldığı bilinmektedir. Bu iki noktada döngünün ilerlemesini ve durmasını sağlayan protein kinazlar ve siklinlerdir. Kinazların ve siklinlerin birbirleriyle etkileşimiyle hücrenin, hücre döngüsüne girişini düzenleyen bir kontrol molekülü üretilir (19). Çeşitli dokularda, organlarda ve hücre kültürü sistemlerinde hücre bölünmesinin aktivasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar, Cdk (siklin bağımlı kinaz) ekspresyonunun ve aktivitesinin oksinler aracılığıyla olduğunu belirtmektedir (20). Oksin, hücre döngüsü kontrolünde anahtar bir komponent olan Cdc2 aracılığıyla hücre bölünmesini artırır (21). Cdc2/Cdc2 kinaz, hücrenin S fazına girişi ve telomeraz aktivitesi için gereklidir (22).

Sonuç olarak, IAA'nın kemik iliğinde mitotik indeksi arttırdığı söylenebilir. IAA etkisinin daha iyi açıklanabilmesi için daha detaylı moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

1. WHO (World Health Organization). Environmental health criteria 29, 2,4-Di-chlorophenoxyacetic acid (2,4-D) Geneva 1984.
2. Göze İ, Yelkovan İ, Çınar Z. Daminozid'in civcivlerdeki enzimatik etkiler ve histopatolojisi. *Tr J of Biology* 1995;19:217-222.
3. Palavan - Ünsal, N. Bitki büyüme maddeleri, sayfa 21, 198, 232. İ.Ü. Basım Evi ve Film Merkezi, İstanbul, 1993.
4. Sinna GA. The effect of the plant hormone indole-3-acetic acid and chemically related compounds on the growth of mouse fibroblast 3T3 cells. *Comp Biochem Physiol.* 1983;75 C: 433-436.
5. Melo MR, Curi TCP, Miyasaka CK, Palanch AC, Curi CP. Effect of indole acetic acid on oxygen metabolism in cultured rat neutrophil. *Gen Pharmac.* 1998;4:573-578.
6. Tusell JM, Artigas F, Sunol C, Martinez E, and Gelpi E. Comparison of high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of indole-3-acetic acid in brain tissue. *J Chromatogr.* 1984;306:338-344.
7. Bertuzzi A, Mingrone G, Gandolfi A, Greco AV, Ringoir S, Vanholder R. Binding of indole-3-acetic acid to human serum albumin and competition with l-tryptophan. *Clin Chim Acta* 1997;265:183-192.
8. Çelik İ, Tülüce Y, Özok N. Effects of indoleacetic acid and kinetin on lipid peroxidation levels in various rat tissues. *Turk J Biol.* 2002;26:193-196,
9. Yılmaz HR, Yüksel E, Türköz Y. F2 nesil farelerde indol-3-asetik asitin böbrek katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine olan etkisi. *Van Tıp Dergisi* 2004;11 (3): 64-68,
10. Yılmaz HR, Yüksel E. The effect of indole-3-acetic acid on some metabolic enzymes in kidney of the second cross maternal mice and their offsprings. *EJM.* 2004;9 (1):1-3.
11. Yamada J, Sugimoto Y, Horisaka K. Indoleacetic acid-induced hypothermia and changes in serotonin metabolism in mice. *J Pharmacobiodyn.* 1985;8(7):564-70.
12. Patton JL. Chromosome studies of certain pocket mice genus *perognatus* (Rodentia, Heteromyidae). *J Mammalogy* 1967;48: 27-37.
13. Yüksel E. Cytogenetics study in *Spalax* (Rodentia, Spalacidae) from Turkey, Communications, Serie C: Biologie 1984;2:1-12.
14. Erdoğan K, Yılmaz HR, Yüksel E. İndol-3-asetik asit'in F1 ve F2 nesil farelerin (*Mus musculus*) kemik iliği hücrelerinde mitotik indeks üzerine etkisi. XVI. Ulusal Biyoloji Kongresi, Özetler, sayfa 89, 4-7 Eylül 2002, Malatya.
15. Yılmaz HR. Farede sentetik bitki büyüme hormonlarının biyolojik, teratojenik ve kalıtsal etkilerinin araştırılması. İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Malatya, 1999.
16. Kowalska E. Influence of 3-indoleacetic acid on cytochemical changes in nuclei and cytoplasm of human fibroblasts in the cell culture. *Folia morphol.* 1991;50:13-26.
17. Kojic'-Prodic' B, Kroon J, Puntarec V. Hydrogen bonding in phytohormone-auxin (IAA) and its derivatives. *J Mol Struct.* 1994;322:43-69.
18. Normanly J, Bartel B. Redundancy as a way of life-IAA metabolism. *Curr Opin Plant Biol.* 1999;2:207-213.
19. Öner C. Genetik Kavramlar, Altıncı Baskıdan Çeviri, sayfa 637, Palme Yayıncılık, Ankara 2002.
20. Hirt H, Pay A, Gyorgyey J, Bako L, Nemeth K, Bogre L, Schweyen RJ, Heberle-Bors E, Dudits D.

- Complementation of a yeast cell cycle mutant by an alfa cDNA encoding a protein kinase homologous to p34cdc2. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88:1636-1640.
21. Miao GH, Hong Z, Verma DP. Two functional soybean genes encoding p34cdc2 protein kinases are regulated by different plant developmental pathways. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90:943-947.
 22. Tamura K, Liu H, Takahashi H. Auxin Induction of cell cycle regulated activity of tobacco telomerase. J Biol Chem. 1999;274:20997-21002.