

Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi

Micronucleus test for determining genotoxic damage

Vedat ŞEKEROĞLU¹, Zülal ATLI-ŞEKEROĞLU¹

ÖZET

Mikronükleus (MN)'lar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkarlar ve esas çekirdeğe dâhil olmazlar. MN'ler tam kromozom veya asentrik kromozom parçalarından köken alan oluşumlardır. MN sayısındaki artış, somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın göstergesidir. MN testi, fiziksel ve kimyasal ajanların hücrelerde oluşturduğu genotoksik etkinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir testtir. Bu test mitoz bölünme ile oluşan hemen hemen tüm hücre tipleri üzerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak uygulanabilmekte ve kromozom anormallikleri testine göre daha kolay ve hızlı sonuç vermektedir. Kültürde bir kez bölünmesini tamamlamış binükleat hücrelerde MN frekansını saptayan ve sitokalsin-B ile sitokinezin bloklanmasına dayanan metodun gelişmesi ile MN testinin güvenilirliği ve geçerliliği artmıştır. MN testi aynı zamanda, *in vitro* çalışmalarda nükleer bölünme indeksi, *in vivo* çalışmalarda ise polikromatik eritrositler ile normokromatik eritrositler arasındaki oran kullanılarak sitotoksitenin tahmin edilmesini de sağlamaktadır. İnsan ve diğer türler çevrelerinde bulunan çok sayıda farklı kimyasal ve fiziksel etkenlere maruz kalmaktadır. Bu nedenle kimyasal ve fiziksel faktörlerin potansiyel riskleri ve olumsuz etkilerini değerlendiren genotoksisite çalışmaları giderek daha çok önem kazanmaktadır. MN testi; fiziksel etkenlerin, ilaçların, çevresel kirlenmeler ve gıda katkı maddeleri gibi günlük yaşamda sıklıkla maruz kaldığımız her türlü kimyasal maddenin genotoksik ve kanserojenik potansiyellerinin ve güvenilirliklerinin araştırılmasını, kanser riskinin tahmin edilmesini ve

ABSTRACT

Micronuclei (MN) are formed during mitosis and do not integrate in the main nucleus. They may arise from a whole lagging chromosome or an acentric chromosome fragment. An increase of MN frequency indicates genomic instability. The MN test is commonly used to determine the genotoxic effects of chemical and physical agents on somatic cells. It is applied to all types of cells reproducing by mitosis *in vitro* and *in vivo*, and it is easier and faster to perform than the chromosome aberration assay. With the development of the *in vitro* cytochalasin-B block method for detecting MN frequency in binuclear cells, its reliability and validity has been increased. At the same time, the test enables an estimation of cytotoxicity using the frequency of nuclear division index in *in vitro* studies, and the ratio between polychromatic erythrocytes and normochromatic erythrocytes in *in vivo* studies. Human beings and other species are exposed to a large number of chemical and physical factors in their environment. Therefore, the genotoxic studies about the adverse effects and potential risks of those factors gain importance exponentially. The MN test is a practical bio-monitoring test that provides an investigation tool on genotoxic and carcinogenic potentials and reliability of physical agents, drugs and all types of other chemical such as pollutants, food additives to which people are exposed daily, and it helps to predict and monitor the cancer risk. The MN technique,

¹ Ordu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ORDU

İletişim / Corresponding Author : Zülal ATLI-ŞEKEROĞLU

Ordu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ORDU

Tel : +90 452 234 50 10 - 16 67 E-posta / E-mail : zulalas@odu.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 07.03.2011

Kabul Tarihi / Accepted : 25.04.2011

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2011.06977

Şekeroğlu V, Atli-Şekeroğlu Z. Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. Türk Hij Den Biyol Derg, 2011; 68(4): 241-52.

kanserin izlenmesini sağlayan oldukça kullanışlı bir biyoizlem testidir. Basitliği, güvenilirliği, geçerliliği ve farklı hücre tiplerine uygulanabilirliği gibi avantajlara sahip olması nedeniyle yıllardır kullanılmakta olan MN testinin, gelecekte de mutajenitenin belirlenmesi ve önlenmesinde önemli bir rolü olacaktır. Bu derlemenin amacı hücrelerdeki genetik hasarın indirekt göstergesi olarak değerlendirilen MN tekniği hakkında bilgi vermektir.

Anahtar Sözcükler: Mikronükleus testi, kromozom hasarı, genotoksisite

which has been used for many years due to its advantages such as simplicity, reliability, validity and applicability to different types of cells, will also carry on an important role in the future in the evaluation and prevention of mutagenicity. The aim of this review is to give information about the MN technique, which is considered to be an indirect indication for genetic damage in cells.

Key Words: Micronucleus technique, chromosome damage, genotoxicity

GİRİŞ

Mikronükleus (MN)'lar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlar olarak tanımlanmaktadır. Bu oluşumla genellikle hücre siklüsünü kontrol eden genlerdeki eksikliklerden, mitotik iğdeki hatalardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasarlardan kaynaklanmaktadır. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunmaktadırlar. Bu nedenle hücrelerde MN sayısında artış saptanması somatik hücrelerdeki genomik kararsızlığın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (1-5).

MN testi; skorlanması oldukça kolay, ekstra kültür işlemi basamağı olmadan uygulanabilen ve farklı hücre tiplerinde kullanılabilen bir testtir. MN testi, klastojenik etkili bileşikler tarafından oluşturulan kromozomal hasarların değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan standart genotoksisite test sistemi içerisinde yer alır ve *in vivo* ve *in vitro* olarak uygulanabilir. MN'ler hücre döngüsü boyunca meydana gelen hasar nerede olursa olsun hücre bölünmesi süresince oluşur. Aksine, kromozomal

aberasyonlar, hücre döngüsü aşamalarının herhangi birinde meydana gelebilir (6). Ayrıca, sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi gibi avantajları sayesinde yaygın kullanım alanı bulan bir tekniktir (1-3, 5, 7-13).

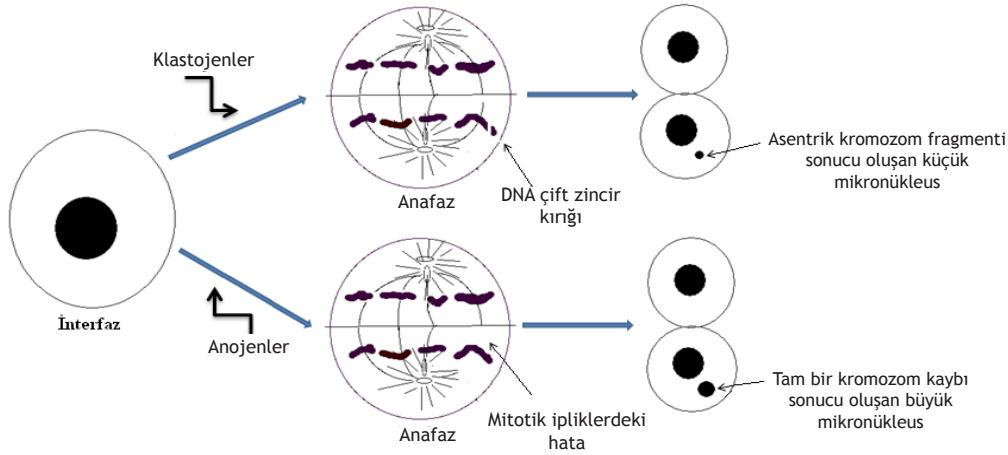
MN TESTİNİN GELİŞİMİ

MN testi 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde ve daha sonra kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır (5, 7, 13). Birçok araştırmacı MN testi için çeşitli teknikler kullanmışlardır. Bunların başında lenfosit hücre kültürleri ve direkt kemik iliği veya periferik kan hücrelerinin analizi gelmektedir. Bazı araştırmacılar geliştirdikleri modifiye metotlarla anöploidiyi yol açan ajanlar ile klastojenleri birbirinden ayırmada MN büyüklük farkından yararlanmışlardır. Klastojenlerce uyarılan hücrelerde asentrik kromozomal fragmentler içeren küçük ebatlı MN'ler oluşmasına rağmen, anojenlerce uyarılan hücrelerde tam kromozom içeren daha büyük ebatlı MN'ler ortaya çıkmaktadır (14-16) (Şekil 1). Eastmond ve Tucker (17) aynı amaçla antikinetokor antikoranları kullanarak kinetokor pozitif MN'lerin tam bir kromozom, kinetokor negatif MN'lerin ise asentrik

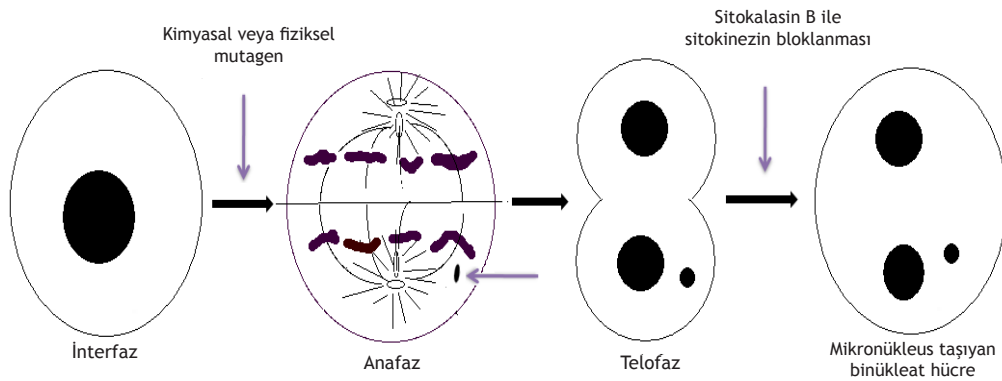
kromozom fragmenti içerdiğini ve bu yöntemin anöploidi uyaran ajanları klastojenlerden ayırmada daha kesin bir yol olduğunu vurgulamışlardır. Daha sonra Fenech ve Morley (18) tarafından, küf mantarlarının metabolitlerinden olan sitokalsin-B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanan ve bir hücre siklusunu tamamlayan hücrelerin binükleer görünümüyle ayırt edilmesine olanak sağlayan modifiye bir teknik geliştirilmiştir (Şekil 2). Cyt-B, bölünen hücrenin ikiye ayrılmasını uyaran mikrofilamentleri oluşturacak olan aktin molekülüne bağlanarak aktin polimerizasyonunu inhibe etmektedir. Bu inhibisyonun dolaylı olarak

bağlı tüm hareketler engellenmekte ve sitokinez inhibe olmaktadır. Sitokinezi bloklayıcı metotlarla bazı kinetik problemler ortadan kalkmış ve *in vitro* MN tekniğinin uygulanmasındaki güvenilirlik artmıştır (4, 5, 11, 19).

Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B eklenmesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücrelerde, MN bulunduran hücrelerin oranı tespit edilmektedir (5, 18). Sitokinezi bloklanmış hücrelerde binükleat hücreler ve MN sayımında şu kriterler kullanılmaktadır (11, 15, 20):



Şekil 1. Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MN'ler.



Şekil 2. Sitokinezin bloklanması yöntemiyle MN içeren binükleat hücrenin oluşumu.

1. Hücreler çift nükleusa sahip olmalıdır ve belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak veya oval görünümlü olmalıdır.

2. Nükleuslar belirgin nükleus zarıyla çevrili yuvarlak veya oval olmalıdır.

3. MN çapı ana nükleusun 1/3'ü kadar veya daha küçük olmalıdır.

4. MN'ler yuvarlak ve oval şekillerde olmalıdır.

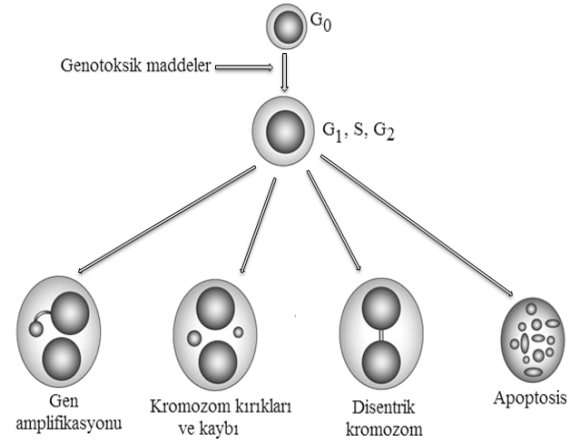
5. MN'ler ana nükleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır veya mikronükleer sınırlar nükleer sınırlardan ayırt edilebilir olmalıdır.

6. Boya alma yoğunluğunun ana nükleus ile aynı olmalıdır.

7. Sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MN'lerin sayılması esas alınmalıdır.

Bu modifiye yöntem ile hücrelerin sadece MN içerip içermediği saptanmakta ve bu sayım işlemi kromozom anormallikleri testine göre daha hızlı gerçekleşmektedir. Bütün halde kromozom şeklinde MN oluşumuna neden olan ve kromozomal anormallik testleriyle çalışılması güç olan anöploidiyi indükleyici ajanlar da bu testle kolaylıkla saptanabilmektedir (19, 21). Ayrıca kimyasal bir madde uygulanmış hücrelerden oluşan yavru hücrelerdeki MN'lerin incelenmesi, en az bir hücre bölünmesi yoluyla yavru hücrelere geçen genetik hasarı ifade etmektedir. Yani iki çekirdekli hücrelerdeki MN'lerin sayılması ile hücrenin bir kez bölünmüş olduğu ispatlanmış olur. Sitokinezi bloklanmış hücrelerde MN yöntemi kullanılarak kromozom kırıkları, kromozom kaybı, disentrik kromozom oluşumu gibi yeniden düzenlenmeler, gen amplifikasyonu ve apoptosiz gibi olayların frekansı da değerlendirilebilir. MN içeriğindeki kromozomal fragmentler, direkt DNA kırıklarından veya DNA sentez hatalarından kaynaklanabilir. Onarılmamış kromozom kırıkları, bir disentrik kromozom ve bir asentrik fragment oluşumu ile yeniden düzenlenmelere öncüllük edebilir. Genellikle disentrik kromozomların sentromerleri anafazda nükleuslar arasında nükleoplazmik köprü

oluşturur ve asentrik fragment MN'yi oluşturur. Asentrik fragmentlerin ve kromatid veya kromozom kırıklarının veya tam bir kromozomun anafazda geri kalması sonucu oluşan MN'ler, telofazdaki nükleusların dışında kalan küçük nükleuslar olarak görülmektedir (Şekil 3) (19, 22).



Şekil 3. Sitokinezi bloklanmış MN yöntemi ile bazı sitogenetik anormalliklerin tayin edilmesi.

MİKRONÜKLEUS TEST PROTOKOLÜ

A. Hücre Tipleri

MN testi mitoz geçiren tüm bitki, hayvan ve insan hücrelerinde, fiziksel ve kimyasal ajanların oluşturduğu genotoksik etkinin belirlenmesinde kullanılabilir. Daha çok kan ve kemik iliği hücrelerine uygulanan bir yöntem olmasına rağmen, çeşitli çalışmalarda karaciğer, akciğer, solungaç, böbrek, bağırsak, embriyo, ağız epitel hücreleri, üriner epitel hücreleri, deri fibroblastları ve yumurtalık hücreleri gibi pek çok hücreye de MN testi uygulanmıştır. Farklı hücre çeşitlerine uygulanabilen MN testi, farklı organizmalar üzerinde de kullanılmaktadır. Bu amaçla insan lenfositleri, fare, sıçan, balık, kurbağa, midye, salyangoz ve bitkiler test organizması olarak kullanılmıştır (5, 6, 23-25). MN testi insanlarda genotoksisiteyi belirlemek amacıyla çoğunlukla periferik kan lenfositlerinde uygulanır. Çünkü

yapılan çalışmalarda, kanser hastalarından alınan periferik kan lenfositlerindeki MN frekansında belirlenen artış, kanser oluşan hedef dokudaki MN frekansı kadar bulunmuştur (1, 2, 4, 9, 10). Lenfosit kültürlerindeki çalışmalara paralel olarak MN tekniği, eksfoliyatif hücrelere de uygulanmıştır (26). Bu teknik sayesinde ağız, burun, bronş ve ürotelyal eksfoliyatif hücrelerde kimyasalların ve enfeksiyonların etkilerini değerlendirmek mümkün olmuştur (27, 28).

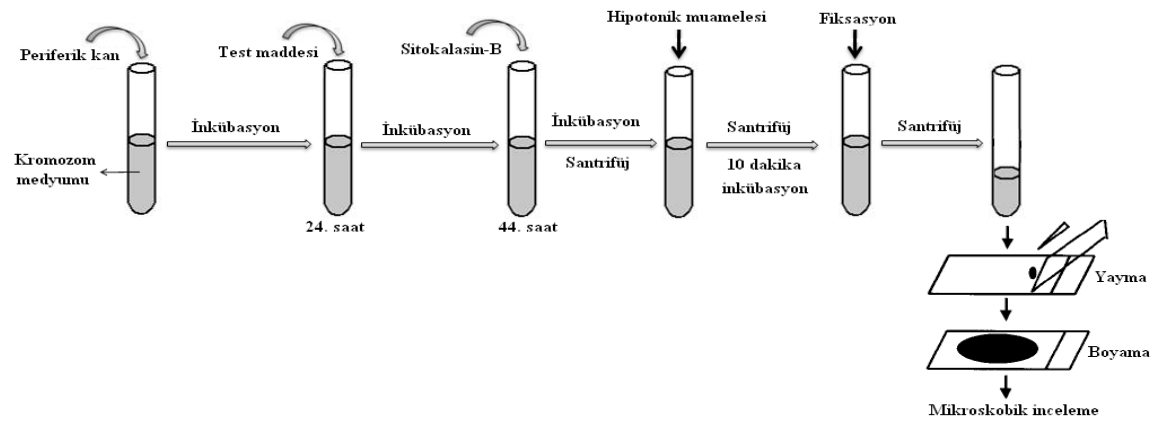
B. *In Vitro* MN Testi

In vitro MN testinde, hücrelerin mitoz bölünme geçirmesini sağlayan kromozom medyumunu bulunan steril tüplere, periferik kan örneklerinden alınan yeterli miktar steril şartlarda ekilir ve hücre kültürü inkübasyona bırakılır. Eğer kimyasal bir maddenin genotoksik etkisi incelenmek isteniyorsa, kültürler genellikle 24. saatte test bileşiği ilave edilir ve 48 saat boyunca test maddesi ile muamele edilir. Kültür tüpleri inkübasyona bırakıldıktan sonra, sitokinezi engelleyerek iki nükleuslu hücre oluşumunu sağlamak için, kültürün bitimine 24 saat kala (inkübasyonun başlangıcından 44 saat sonra) bütün tüplere Cyt-B ilave edilir. Kültür süresinin bitiminde tüpler santrifüjlenerek süpernatant atılır ve tüplere hipotonik eriyik ilave edilerek yaklaşık 10 dakika 37°C'de inkübasyona bırakılır. Süre sonunda tüpler santrifüjlenerek, tüplere glasiyal asetik asit ve metanol karışımından oluşan fiksatif ilave edilir.

İlk fiksatif ile oda sıcaklığında muamele edildikten sonra tüpler tekrar santrifüj edilir ve bu işlem tüpte kalan sıvının berraklaştığı görülünceye kadar 2-3 kez tekrarlanır. Daha sonra tüplerdeki sıvı lamların üzerine damlatılarak preparatlar hazırlanır. MN'lerin boyanması için preparatlar Giemsa-tampon boya eriyiğinde boyanır ve ışık mikroskobu ile incelenir (11, 29, 30) (Şekil 4).

1. MN Sayısının Saptanması : MN sayısını belirlemek amacıyla her bir preparatta genellikle 2000 binükleat hücre incelenir ve bu hücreler içerisinde MN taşıyanlar belirlenir (Şekil 5). Ayrıca incelenen binükleat hücrelerde toplam MN sayısı saptanarak, MN taşıyan binükleat hücrelerin oranı ve toplam MN sayısının incelenen binükleat hücre sayısına bölünmesiyle hücre başına düşen MN ortalaması ve % MN hesaplanır (11, 20).

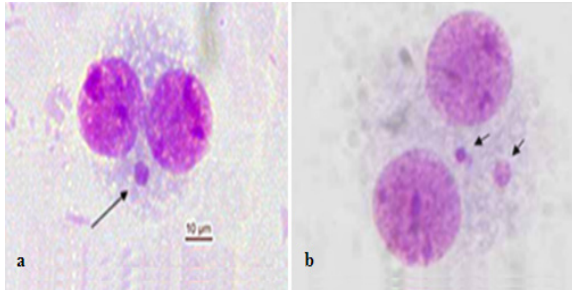
2. Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi: Sitotoksiste, büyük oranda DNA'daki bazların modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklara bağlıdır. Nükleer bölünme indeksi (NBI) ve mitotik indeks (MI) yeterli hücre proliferasyonu ve sitotoksiteyi göstermek için kullanılan indikatör testlerdir. MI ve/veya NBI'daki bir azalma hücre döngüsündeki bir inhibisyonu ve hücrenin proliferasyon kapasitesindeki bir kaybı yansıtır. Bu testler bazı kimyasalların hücrelerdeki etki mekanizması hakkında önemli bilgiler de vermektedir



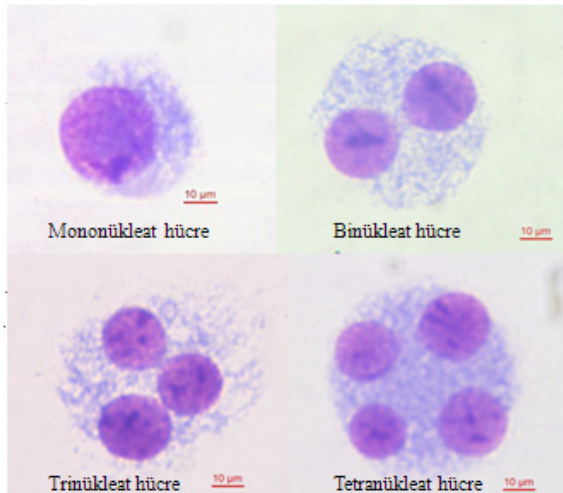
Şekil 4. *In vitro* MN test protokolü.

(31-34). Ayrıca sitotoksikite ve tümör oluşumu arasındaki ilişki pek çok araştırmada gösterilmiştir (35).

Her bir test maddesi için hazırlanan preparatlardan genellikle 2000 hücre sayılarak, bu hücreler arasından mononükleat (bir nükleuslu), binükleat (iki nükleuslu), trinükleat (üç nükleuslu) ve tetranükleat (dört nükleuslu) olanların oranı saptanır (Şekil 6). Bu orandan yola çıkarak aşağıdaki formüle göre NBI hesaplanır. NBI'nın hesaplanması kimyasal veya fiziksel bir maddenin sitotoksik etkisini göstermede önemli bilgiler sağlar (17, 36, 37).



Şekil 5. a- Bir MN, b- İki MN içeren binükleat hücreler.



Şekil 6. Mononükleat, binükleat, trinükleat ve tetranükleat hücreler.

$$NBI = (MI + 2MII + 3MIII + 4MIV) / N$$

(MI: Bir nükleuslu hücreler, MII: İki nükleuslu hücreler, MIII: Üç nükleuslu hücreler, MIV: Dört nükleuslu hücreler ve N: Toplam hücre sayısı)

C. *In Vivo* MN Testi

Lenfosit kültürlerindeki çalışmalara paralel olarak MN tekniği, *in vivo* olarak da uygulanmaktadır. Memeli *in vivo* MN testi, *in vitro* test sistemlerinden elde edilen mutajenik etkinin daha detaylı araştırılmasına ve bileşiğin *in vivo* metabolizması, farmakokinetiği ve DNA onarım süreçleri gibi faktörlerin değerlendirilmesine de olanak sağlamaktadır (7, 12, 38-40). En sıklıkla kullanılan *in vivo* MN testi, memeli eritrositlerindeki MN sıklığının belirlendiği testtir. Bu test genellikle kemik iliğinde ve/veya periferik kan hücrelerindeki eritrositlerin analizi yapılarak, test edilen bileşiğin kromozomal hasar oluşturup oluşturmadığının saptanmasında kullanılır (7, 12, 38-40).

Kemik iliği yetişkin kemiricilerde temel hematopoietik organdır. Çeşitli kimyasal maddelerin uygulanması hematopoietik hücrelerin bölünmeleri sırasında, kromozom hasarına veya mitoz bölünmenin engellenmesine yol açmaktadır (41). Eritropoezis aşamasında son mitozdan sonra kemik iliğindeki eritroblastlar polikromatik eritrositlere (PCE) dönüşürken çekirdeklerini kaybetmekte ve bu sırada meydana gelen kromozomal hasar sitoplazmada MN oluşumuna neden olmaktadır. MN içeren tam olarak olgunlaşmamış (polikromatik) eritrosit sayısındaki artış kromozomal hasarın veya anafaz gecikmesi sonucu meydana gelen sitogenetik hasarın bir göstergesidir (14, 40, 42).

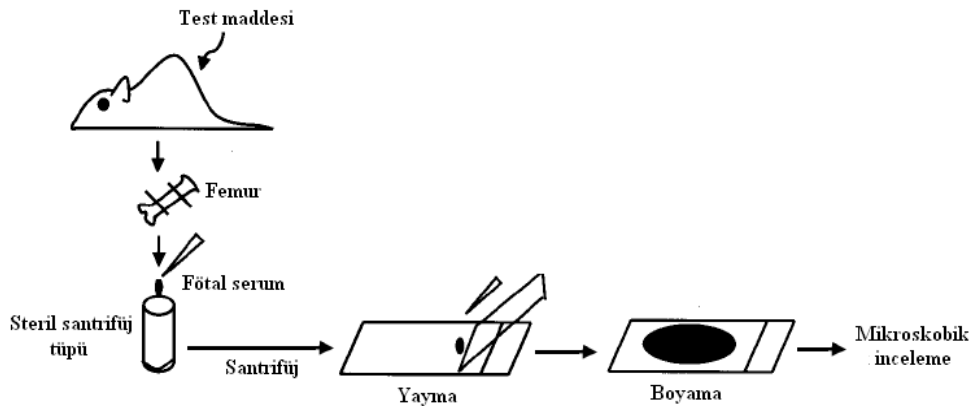
Genellikle *in vivo* MN çalışmalarında periferik kan daha az değişkenlik gösterdiğinden daha iyi çalışılmaktadır. Fakat kemiricilerde dalak, MN taşıyan PCE'leri seçici olarak uzaklaştırdığı için MN çalışmalarında rodentler kullanıldığı zaman dolaşım kanı yerine kemik iliği tercih edilmektedir (43). Kemik iliği preparatları ilk kez Schmid (7)

tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemde göre; test maddesinin hayvanlara uygulanmasından belirli süre sonra hayvanlar anestezi altında servikal dislokasyon yöntemi ile öldürülüp, femurlar çıkarılır ve femura ait kemik iliği, içerisinde fetal serum ihtiva eden enjektör ile santrifüj tüpüne aktarılır. Kemik iliği numunesi santrifüj edilir ve süpernatant atılır. Geride kalan kısma bir miktar fetal serum konularak süspansiyon edilir ve temiz lamlar üzerine yayılır. Lamlar May- Grunwald boyası ile boyanarak incelemeye hazır hale getirilir (Şekil 7).

1. MN Sayısının Belirlenmesi: Işık mikroskopunda her preparat üzerinde rastgele 1000 adet PCE sayılır ve bunların içerisindeki MN taşıyanların sayıları tespit edilerek yüzdeleri çıkarılır (Şekil 8) (41). PCE'ler gelişimlerinin ara aşamasında olan, olgun olmayan eritrositlerdir. Yapılarında hâlâ ribozom bulundurlar ve ribozomların boyanma özelliklerinden dolayı, gelişimlerini tamamlamış olgun normokromatik eritrositlerden (NCE) ayırt edilebilirler (12). NCE'ler ışık mikroskopunda sarımsı turuncu renkte görülürken, daha büyük olan PCE'ler mavi-yeşil arası bir renkte görülmektedirler. PCE'lerin içerisinde oluşan MN'ler ise, ana çekirdeğin üçte bir ya da daha az çapında, boyanma özelliği ana çekirdeğin boyanma özelliği ile aynı, yuvarlak şekilli, koyu mavi renkli olması nedeni ile kolaylıkla ayırt edilebilmektedirler (Şekil 8) (44).

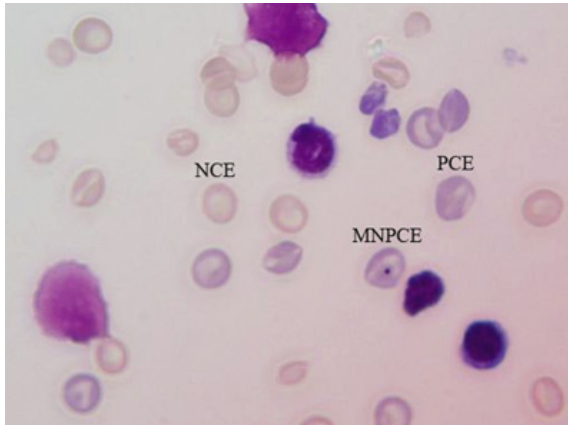
2. Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi: MN testi, uygulanan kimyasalın olgun olmayan PCE'lerde oluşturduğu kromozom kayıpları ve hasarlarının dolaşım kanındaki olgun NCE'nin oluşumu üzerindeki etkisini de belirlemektedir. PCE ile NCE arasındaki oran kemik iliği hücrelerini etkileyen kimyasal maddenin toksisitesini göstermesi açısından önemli bir indekstir (41, 44). Kontrol grubu ile kıyaslandığı zaman kimyasal ile muamele edilen hayvanlardaki PCE/NCE oranında gözlenen önemli azalma, uygulanan kimyasal maddenin kemik iliğine ulaştığının ve nükleuslu öncü eritrosit hücrelerinin çoğalmasını ve olgunlaşmasını engelleyerek eritrosit oluşumunu azalttığının ve toksik etki meydana getirdiğinin bir göstergesidir (41,44,45). Test maddesinin sitotoksitesi, rutin olarak sitotoksik etki gösteren kimyasal ile muamele sonrasında NCE'den yana artması ile gösterilen PCE'nin NCE'ye oranı ile tespit edilmektedir. Kimyasal ile muamele edilen hayvanlarda PCE/NCE oranının kontrol grubuna kıyasla önemli derecede azalması, uygulanan kimyasal maddenin kemik iliğine ulaştığının, nükleuslu hücrelerinin bölünmesi ve olgunlaşmaları üzerinde toksik etki meydana getirdiğini göstermektedir (41, 44).

In vivo kemik iliği MN testlerinde Cyt-B kullanılmaksızın genellikle kemik iliğindeki veya kandaki PCE'lerdeki MN sıklığı tespit edilmesine karşın, Uma Devi ve ark. (46) fibrosarkom, B16 F1



Şekil 7. *In vivo* MN test protokolü.

melanom C57 BL ve Ehrlich asit karsinomlu farelere tekrarlayan farklı dozlarda Cyt-B enjekte ederek, *in vivo* olarak sitokinezi bloklanmış binükleat tümör hücrelerinde MN oranını tespit etmişlerdir. Şekeroğlu (47), ratlara Cyt-B enjekte ederek, *in vivo* olarak sitokinezi bloklama yöntemini ilk kez kemik iliği hücrelerine uygulamış ve bu yöntemle bazı insektisitlerin kemik iliğinde binükleat hücrelerdeki MN sıklığına etkisini incelemiştir (Şekil 9). Tıpkı *in vitro* MN testinde olduğu gibi sitokinezi bloklama metodunun *in vivo* olarak da uygulanması, bu tekniğinin *in vivo* çalışmalarındaki güvenilirliğini daha da artıracaktır.

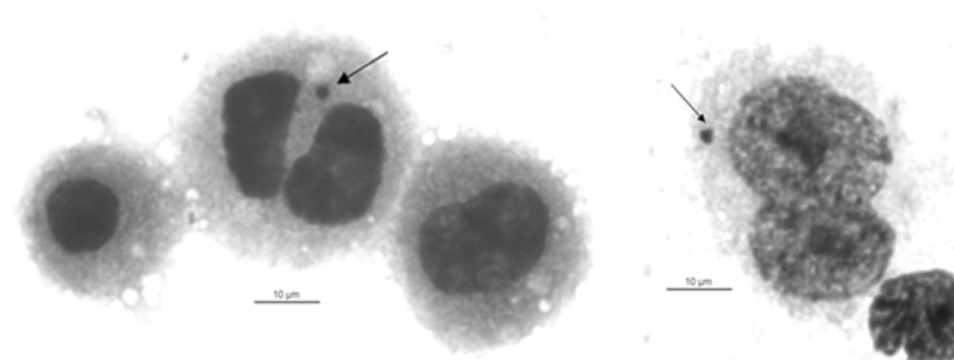


Şekil 8. Kemik iliğindeki normal polikromatik (PCE) ve normokromatik (NCE) eritrositler ve MN taşıyan polikromatik eritrosit (MNPCE) (44).

MN TESTİNİN KULLANIM ALANLARI

1980'den sonra özellikle deney hayvanlarıyla gerçekleştirilen kontrollü çalışmalarda, kimyasal ve fiziksel ajanların sebep olduğu sitogenetik harabiyetin güvenilir bir göstergesi olarak kullanılan MN çalışmalarının sayısı çok hızlı bir şekilde artmıştır. Günümüzde MN testi genotoksik, sitotoksik ve karsinojenik ajanların hücre genomu ve viabilitesi üzerine etkilerinin analizinde başarıyla kullanılmaktadır (4, 5). MN testi başlıca; kromozomları etkileyebilecek fiziksel etkenlerin (UV ve irradyasyon gibi) ve her türlü kimyasal maddenin genotoksik ve karsinojenik potansiyellerinin tespitinde, ilaçların piyasaya sürülmeden önce toksik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada, kanserden korunmada ve kanserin izlenmesinde bir biyoizlem testi olarak yaygın kullanılmaktadır (1, 4, 5).

Kullanım alanlarından biri olan kanser genetiğinde de hastalığın tanısının konulması ve takibinin yapılmasında önemli bir yer tutmaktadır. Bu teknik hücrelerin morfolojik bozukluğunu, kromozom kırıklarını, premalign değişiklikleri ve kanseri gösterebildiğinden bir biyomarker olarak değerlendirilebilmekte ve karsinojenlere maruz kalmış bireylerde artmış kanser riskini göstermek amacıyla kullanılabilir (27, 48-52). Tedavinin yanı sıra hastalığın ilerlemesi ile ortaya çıkan ikincil kromozomal değişikliklerin tespiti için oldukça kullanışlı bir yöntemdir (4, 10, 13, 19, 26, 27, 50, 53).



Şekil 9. Sitokinezi bloklanmış kemik iliği hücrelerindeki MN'ler (Şekeroğlu, 2010).

Ayrıca iyonize radyasyonun ve mikro dalga ışınların klastojenik etkisinin ortaya çıkarılmasında da geniş bir yer tutmaktadır (50, 54-56).

MN testi sigara, pestisitler, nanomateryaller, gıda katkı maddeleri ve diğer birçok kimyasal maddeler, parazitik enfeksiyonlar gibi çevresel ve mesleki etkileri değerlendirebilmek için de kolaylıkla kullanılmaktadır (6, 9, 33, 35, 40, 47, 48, 57-64).

İlaçların genotoksik etkilerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bu test, hem yeni üretilen ilaçların mutajenik etkilerinin önceden gözlenebilmesini hem de ilaç kullanan kişilerdeki genotoksik etkilerin belirlenmesini sağlamasından dolayı ilaç şirketleri ve farmakolojik çalışmalar için giderek değeri artan bir test haline gelmiştir. Ayrıca ilaçların genotoksik bakımdan güvenilirliğini gösterdiğinden insan sağlığı için de önemi büyüktür (65, 66).

SONUÇ

Yapılan araştırmalar, çevremizde sayıları her geçen gün artan çeşitli kimyasal maddelerin küçük miktarlarının bile genotoksik, mutajenik veya karsinojenik olabileceği gerçeğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle, bu etkilere sahip olma potansiyeli taşıyan fiziksel ve kimyasal ajanların başlıca insan genomu için mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilere sahip olup olmadıklarının ortaya çıkarılması son derece önemlidir. Çünkü genetik toksisite testlerinde alınan pozitif sonuçlar mutajenik olan birçok maddenin aynı zamanda karsinojenik de olduğunu göstermektedir. Çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilen ve kolay uygulanabilen *in vivo* ve *in vitro* MN testi, organizmayı etkileyen ajanların sitogenetik etkilerini belirlemek için yapılabilecek her türlü tarama çalışmasında güvenle kullanılabilir bir genotoksisite testidir.

KAYNAKLAR

1. Vanparys P, Vermeiren F, Sysmans M, Temmerman R. The micronucleus assay as a test for the detection of aneuploid activity. *Mutat Res*, 1990; 244: 95-103.
2. Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Cundari E, Van Hummelen P. The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat Res*, 1997; 392(1-2): 19-30.
3. Stopper H, Müller OS. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A Minireview. *Toxicol In Vitro*, 1997; 11: 661-7.
4. Choy WN. 2001. Genetic toxicology and cancer risk assessment. New York: Marcel Dekker, 2001: 163-86.
5. Demirel S, Zamani A. MN tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi*, 2002; 12(3): 123-7.
6. Yırtıcı Ü. Tartrazin'in *Cyprinus carpio*'daki genotoksik etkisinin MN yöntemi ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.
7. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res*, 1975; 31: 9-15.
8. Garewal HS, Ramsey L, Kaugars G, Boyle J. Clinical experience with the micronucleus assay. *Cellular Biochem*, 1993; 17: 206-12.
9. Cheng TJ, Christiani DC, Xu X, Wain JC, Wiencke JK, Kelsey KT. Increased micronucleus frequency in lymphocytes from smokers with lung cancer. *Mutat Res*, 1996; 349: 43-50.
10. Duffaud F, Orsiere T, Villani P, Pelissier AL, Volot F, Favre R et al. Comparison between micronucleated lymphocytes rates observed in healthy subject and cancer patients. *Mutagenesis*, 1997; 12: 227-31.

11. Fenech M. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutat Res*, 2000; 455: 81-95.
12. Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res*, 2000; 455: 155-66.
13. Widel M, Kolosza Z, Jedrus S, Lukaszczyk B, Raczek-Zwierzycza K, Swierniak A. Micronucleus assay *in vivo* provides significant prognostic information in human cervical carcinoma: The updated analysis. *Int J Radiat Biol*, 2001; 77: 631-6.
14. Von Ledebur MM, Schmid W. The micronucleus test: Methodological aspects. *Mutat Res*, 1973; 19: 109-17.
15. Heddle JA, Countryman RI. The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res*, 1976; 41: 321-32.
16. Högstedt B, Karlsson A. The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. *Mutat Res*, 1985; 156: 229-32.
17. Eastmond DA, Tucker JD. Identification aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen*, 1989; 13: 34-43.
18. Fenech M, Morley AA. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of *in vivo* ageing and dose X-irradiation. *Mutat Res*, 1986; 161: 193-8.
19. Aardema JM, Kirsch-Volders M. The *in vitro* micronucleus assay. In Choy WN, eds. *Genetic toxicology and cancer risk assesment*. New York. Marcel Dekker, 2001; 163-86.
20. Titenko-Holland N, Windham G, Kolachana P, Reinisch F, Parvatham S, Osorio AM et al. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay *in vitro* and *in vivo*: a study of malathion-exposed workers. *Mutat Res*, 1997; 388(1): 85-95.
21. Lorge E, Lambert C, Gervais V, Becourt-Lhote N, Delongea L, Claude N. Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation. Part II: Performances of the *in vitro* micronucleus test compared to the mouse lymphoma assay and the *in vitro* chromosome aberration assay. *Toxicol Sci*, 2007; 96(2): 214-7.
22. Surralles J, Xamena N, Creus A, Catalan J, Norppa H, Marcos R. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res*, 1995; 341: 169-84.
23. Al-Sabti K. Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals. *Cytobios*, 1986; 47: 147-54.
24. Cotelle S, Masfaraud J, Ferard J. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the Allium/Vicia-micronucleus and the Tradescantia micronucleus assays. *Mutat Res*, 1999; 426: 167-71.
25. Djomo JE, Ferrier V, Bekaert C. Amphibian micronucleus test *in vivo* (Jaylet Test) to evaluate the genotoxicity of petrochemical waste waters. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2000; 65: 168-74.
26. Stich HF, Stich W, Parida BB. Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer: Betel quid chewers. *Cancer Lett*, 1982; 17: 125-34.
27. Stich HF, Rosin MP. Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and intervention. *Cancer Lett*, 1984; 22: 241-53.
28. Rosin MP, Gilbert AM. *Modulation of genotoxic effects in humans: Mutation and the environment*. NewYork. Wiley-Liss, 1990; 51-9.
29. Rothfuss A, Schutz P, Bochum S, Volm T, Eberhardt E, Kreienberg R et al. Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. *Cancer Res*, 2000; 60: 390-4.
30. Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M et al. Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutat Res*, 2003; 540: 153-63.
31. Rojas E, Herrera LA, Sordo M, Gonsebatt ME, Montero R, Rodriguez R et al. Mitotic index and cell proliferation kinetics for the identification of antineoplastic activity. *Anti-Cancer Drug*, 1993; 4: 637-40.
32. Anderson D, Jenkinson PC, Dewdney RS, Franis AJ, Godbert P, Butterworth KR. Chromosome aberrations, mitogen-induced blastogenesis and proliferative rate index in peripheral lymphocytes from 106 control individuals of U.K. population. *Mutat Res*, 1988; 204: 407-20.
33. Lopez Nigro MM, Palermo AM, Mudry MD, Carballo MA. Cytogenetic evaluation of two nitroimidazole derivatives. *Toxicol In Vitro*, 2003; 17: 35-40.
34. Seligmann IC, Lima PD, Cardoso PC, Khayat AS, Bahia MO, Buchi DF et al. The anticancer homeopathic composite "Canova Method" is not genotoxic for human lymphocytes *in vitro*. *Genet Mol Res*, 2003; 2(2): 223-8.

35. Albert RE, Magee PS. The tumorigenicity of mutagenic contact sensitizing chemicals. *Risk Anal*, 2000; 20(3): 317-25.
36. Fenech M. The Advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res*, 1997; 392: 11-18.
37. Yavuz Kocaman A, Topaktaş M. In vitro evaluation of the genotoxicity of acetamiprid in human peripheral blood lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*, 2007; 48: 483-90.
38. Heddle J. A rapid *in vivo* test for chromosome damage. *Mutat Res*, 1973; 18: 187-90.
39. Hayashi M, Mac Gregor JT, Gatehouse DG, Adler ID, Blakey DH, Dertinger S et al. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay: Aspects of protocol desing including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. A report from the international work shop on genotoxicity test procedures (IWGTP). *Environ Mol Mutagen*, 2000; 35: 234-52.
40. Üstün F. Albendazol'ün olası genotoksitesitesi üzerine askorbik asitin etkisi. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007.
41. Lambert IB, Singer TM, Boucher SE, Douglas GR. Detailed review of transgenic rodent mutation assays. *Mutat Res*, 2005; 590: 1-280.
42. MacGregor TJ, Heddle AJ, Hite M, Margolin HB, Ramel C, Salamone MF et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat Res*, 1987; 189: 103-12.
43. Paulsson B, Kotova N, Grawé J, Henderson A, Granath F, Golding B et al. Induction of micronuclei in mouse and rat by glycidamide, genotoxic metabolite of acrylamide. *Mutat Res*, 2003; 535: 15-24.
44. Yener Y, Dikmenli M. Increased micronucleus frequency in rat bone marrow after acrylamide treatment. *Food Chem Toxicol*, 2009; 47 (8): 2120-3.
45. Cicchetti R, Bari M, Argentin G. Induction of micronuclei in bone marrow by two pesticides and their differentiation with CREST staining: an *in vivo* study in mice. *Mutat Res*, 1999; 439: 239-48.
46. Uma Devi P, Satish Rao BS, Kamath R. A method to score micronuclei *in vivo* using cytochalasin B-induced cytokinesis block. *Mutat Res*, 1998; 401: 33-7.
47. Şekeroğlu V. Thiocloprid ve deltamethrin insektisitlerinin tek başlarına ve karışım halinde kullanıldıkları zaman sıçan kemik iliği hücrelerinde *in vivo* genotoksik etkileri. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2010.
48. Lehucker-Michel MP, Di-Giorgio C, Amara YA, Laget M, Botta A. The micronucleus assay in human exfoliated urothelial cells: Effects of smoking. *Mutagenesis*, 1995; 10: 329-32.
49. Moore LE, Warner ML, Smith AH, Kalman D, Smith MT. Use of fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effects of radiation and arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells. *Environ Mol Mutagen*, 1996; 27: 176-84.
50. Jagetia GC, Jayakrishnan A, Fernandes D, Vidyasagar MS. Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. *Mutat Res*, 2001; 491: 9-16.
51. Guzman P, Sotelo-Regil RC, Mohar A, Gonsebatt ME. Positive correlation between the frequency of micronucleated cells and dysplasia in papanicolaou smears. *Environ Mol Mutagen*, 2003; 41: 339-43.
52. Olaharski A, Sotelo R, Solorza-Luna G, Gonsebatt ME, Guzman P, Mohar A et al. Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2006; 27: 3317-43.
53. Wang Y, Hopwood VL, Hu P, Lennon A, Osterberger J, Glassman A. Determination of secondary chromosomal aberrations of chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 2004; 153: 53-6.
54. Oliveira NG, Castro M, Rodrigues AS, Gonçalves IC, Cassapo R, Fernandes AP et al. Evaluation of the genotoxic effects of the boron neutron capture reaction in human melanoma cells using the cytokinesis block micronucleus assay. *Mutagenesis*, 2001; 16: 369-75.
55. Koyama S, Nakahara T, Wake K, Taki M, Isozumi Y, Miyakoshi J. Effects of high frequency electromagnetic fields on micronucleus formation in CHO-K1 cells. *Mutat Res*, 2003; 541: 81-9.
56. Simi S, Ballardini M, Casella M, De Marchi D, Hartwig V, Giovannetti G et al. Is the genotoxic effect of magnetic resonance negligible? Low persistence of micronucleus frequency in lymphocytes of individuals after cardiac scan. *Mutat Res*, 2008; 645: 39-43.

57. Hayashi M, Kishi M, Sofuni T, Ishidate MJr. Micronucleus tests in mice on 39 food additives and eight miscellaneous chemicals. *Food Chem Toxicol*, 1988; 26(6): 487-500.
58. Rosin MP, Anwar W. Chromosomal damage in urothelial cells from Egyptians with chronic *Schistosoma haematobium* infections. *Int J Cancer*, 1992; 50: 539-43.
59. Cruz AD, McArthur AG, Silva CC, Curado MP, Glickman BW. Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiania (Brazil) radiological accident. *Mutat Res*, 1994; 313: 57-68.
60. Özkul Y, Dönmez H, Erenmemişoğlu A, Demirtaş H, İmamoğlu N. Introduction of micronuclei by smokeless tobacco on buccal smears of habitual users. *Mutagen*, 1997; 12: 470-9.
61. Çelik A, Mazmancı B, Çamlıca Y, Aşkın A, Çömelekoğlu Ü. Induction of micronuclei by lambda-cyhalothrin in Wistar rat bone marrow and gut epithelial cells. *Mutagenesis*, 2005; 20: 125-9.
62. Demsia G, Vlastos D, Goumenou M, Matthopoulos DP. Assessment of the genotoxicity of Imidacloprid and Metalaxyl in cultured human lymphocytes and rat bone-marrow. *Mutat Res*, 2007; 634(1-2): 32-9.
63. Huang Y, Gao H, Gou M, Ye H, Liu Y, Gao Y, et al. Acute toxicity and genotoxicity studies on poly (ϵ -caprolactone)-poly (ethyleneglycol)-poly (ϵ -caprolactone) nanomaterials. *Mutat Res*, 2010; 696: 101-6.
64. Al-Sabti K. Chlorotriazine reactive azo red 120 textile dye induces micronuclei in fish, *Ecotox Environ Safe*, 2000; 47: 149-55.