

Is Cytogenetic Damage a Biomarker for The Risk of Malignancy Development In Renal Transplantation Patients?

Sitogenetik Hasar Böbrek Nakli Hastalarında Malignite Gelişimi için Bir Biyobelirteç Midir ?

Emel MUTLU¹, Aydın ÜNAL², Ashıhan KİRAZ³, Arzu TAŞDEMİR⁴, Tuba Dilay Kökenek ÜNAL⁴, İsmail KOÇYİĞİT⁵, Murat Hayri SİPAHİOĞLU⁵, Bülent TOKGÖZ⁵

Department of Internal Medicine, Erciyes University Faculty of Medicine, Kayseri¹
Department of Nephrology, Istanbul Medipol University Faculty of Medicine, Istanbul²
Department of Medical Genetics, Kayseri Training and Research Hospital, Kayseri³
Department of Pathology, Kayseri Training and Research Hospital, Kayseri⁴
Department of Nephrology, Erciyes University Faculty of Medicine, Kayseri⁵



Yazışma Adresi / Correspondence:
Emel MUTLU

Department of Internal Medicine, Erciyes University Faculty of Medicine, Kayseri
T: +90 506 775 88 05 E-mail : emelmutlu@erciyes.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 19.03.2022 Kabul Tarihi / Accepted: 04.04.2022

 Emel MUTLU <https://orcid.org/0000-0002-1008-2527>

 Aydın ÜNAL <https://orcid.org/0000-0002-5493-9908>

 Ashıhan KİRAZ <https://orcid.org/0000-0001-7317-2717>

 Arzu TAŞDEMİR <https://orcid.org/0000-0002-5183-6663>

 Tuba Dilay Kökenek ÜNAL <https://orcid.org/0000-0003-3981-6026>

 İsmail KOÇYİĞİT <https://orcid.org/0000-0002-6654-4727>

 Murat Hayri SİPAHİOĞLU <https://orcid.org/0000-0003-3293-2104>

 Bülent TOKGÖZ <https://orcid.org/0000-0003-0880-3396>

Hippocrates Medical Journal / Hippocrates Med J 2022, 2(1): 6-13 DOI: <https://doi.org/10.29228/HMJ.8>

Abstract

Introduction The micronucleus (MN) formation in the peripheral blood lymphocytes can be usable as a biomarker for the risk of cancer development. In this study, we aimed to evaluate the relationship between the MN formation in peripheral lymphocytes and the development of malignancy in renal transplant patients.

Materials and Methods Ten renal transplant patients with post-transplant malignancy were included in the study. The control group with renal transplantation consisted of 15 age and sex matched renal transplant patients without post-transplant malignancy. The healthy control group consisted of 12 individuals who had similar age and sex ratios as the other two groups. The cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay was used for MN analysis.

Results The number of MN in mononuclear cells was significantly higher in renal transplant patients with or without malignancy than in healthy controls [7.5 (2.0-11.0), 5.0 (0-12.0), and 1.0 (0-9.0), respectively, $p<0.001$]. Similarly, the number of MN in binuclear cells was significantly higher in renal transplant patients with or without malignancy than in healthy controls [54.0 (8.0-199.0), 32.0 (0-182.0), and 10.0 (2.00-29.00), respectively, $p<0.001$]. Although the difference was not statistically significant, the number of MN both in mononuclear cells and in binuclear cells was higher in renal transplant patients with malignancy than renal transplant patients without malignancy.

Conclusion Increase in the number of MN in mononuclear and binuclear cells may be a promising biomarker for malignancy development after renal transplantation.

Keywords Renal Transplantation; Micronucleus; Malignancy; Cytogenetic Damage; Cytokinesis-Block Micronucleus Assay

Özet

Amaç Periferik kan lenfositlerinde mikronükleus (MN) oluşumu kanser gelişme riski için bir biyobelirteç olarak kullanılabilir. Bu çalışmada böbrek nakli hastalarında periferik lenfositlerde MN oluşumu ile malignite gelişimi arasındaki ilişkiyi değerlendirmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem Bu çalışmaya böbrek nakli sonrası malignite gelişen 10 böbrek nakli hastası alındı. Yaş ve cinsiyet uyumlu böbrek nakil sonrası malignite gelişmeyen 15 böbrek nakli hastasında sağlıklı gönüllülerden anlamlı olarak daha yüksekti [sırasıyla 54.0 (8.0-199.0), 32.0 (0-182.0) ve 10.0 (2.00-29.00)] de sağlıklı kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi. MN analizi sitokinez blok MN analizi ile yapıldı.

Bulgular Mononükleer hücrelerde MN sayısı malignitesi olan veya olmayan böbrek nakli hastalarında sağlıklı gönüllülerden anlamlı olarak daha yüksekti [sırasıyla 7.5 (2.0-11.0), 5.0 (0-12.0) ve 1.0 (0-9.0), $p<0.001$]. Benzer olarak binükleer hücrelerdeki MN sayısı malignitesi olan veya olmayan böbrek nakli hastalarında sağlıklı gönüllülerden anlamlı olarak daha yüksekti [sırasıyla 54.0 (8.0-199.0), 32.0 (0-182.0) ve 10.0 (2.00-29.00)]. Aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen, hem mononükleer hücrelerde hem de binükleer hücrelerdeki MN sayısı malignitesi olan böbrek nakli hastalarında malignitesi olmayan böbrek nakli hastalarından daha yüksek saptandı.

Sonuç Binükleer ve mononükleer hücrelerdeki artmış MN sayısı böbrek naklinden sonra malignite gelişimi için umut vaat eden bir biyobelirteç olabilir.

Anahtar Kelimeler Böbrek Nakli; Mikronükleus; Malignite; Sitogenetik Hasar; Sitokinez Blok Mikronükleus Analizi

GİRİŞ

Böbrek nakli yapılan hastalarda malign tümör insidansının genel popülasyona kıyasla belirgin şekilde arttığı iyi bilinmektedir (1). Hasta popülasyonunda artan malignite sıklığının altında yatan ana neden olarak immüno-supresif ajanların etkileri görünmektedir (2). Böbrek nakli sonrası gelişen ikincil malignitelerin biyobelirteçlerle erken teşhisi prognoz açısından çok önemlidir.

Mikronükleuslar (MN); nükleer bölünme sırasında ana-fazda geride kalan kromozom parçalarından kaynaklanır (3). Bölünen hücrelerde mikronükleus oluşumu, onarılmamış veya yanlış onarılmış DNA lezyonlarına bağlı kromozomların kırılması veya mitotik fonksiyon bozukluğu nedeniyle kromozomun yanlış bölünmesinin sonucudur (4). Yüksek MN frekansı; hücrelerde çeşitli ajanların neden olduğu sayısal-yapısal kromozom bozukluklarının ve somatik hücrelerde genomik kararsızlığın dolaylı bir göstergesi olarak kabul edilir (5). MN tahlili, çeşitli fiziksel-kimyasal ajanların genotoksik ve mutajenik potansiyellerini belirlemek için kullanılmıştır (6-9).

MN sıklıklarının, hemodiyaliz (HD) programına kayıtlı olmayan son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) olan has-

talarda ve uzun süreli HD programında olan SDBY hastalarında sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir (10). Benzer şekilde, böbrek nakli alıcıları, MN testi ile değerlendirilen sağlıklı deneklerden daha fazla DNA hasarına sahipti (11). Ancak bildiğimiz kadarıyla, malignitesi olan böbrek nakli hastalarında sitogenetik hasarı araştıran bir çalışma yoktur. Bu çalışmada böbrek nakli yapılan hastalarda periferik lenfositlerde MN oluşumu ile malignite gelişimi arasındaki ilişkiyi değerlendirmeyi amaçladık.

MATERYAL VE METOD

Hastalar

Nakil sonrası malignitesi olan 10 böbrek nakli yapılan hasta kesitsel çalışmaya dahil edildi. Çalışmanın hasta olan kontrol grubu; nakil öncesi diyaliz süresi ve nakil sonrası periyodu benzer olan, nakil sonrası malignitesi olmayan, yaş ve cinsiyet uyumlu 15 böbrek böbrek nakli yapılmış hastadan oluşturuldu. Sağlıklı kontrol grubu ise, diğer iki gruba benzer yaş ve cinsiyet oranlarına sahip 12 kişiden oluşturuldu.

Üniversitenin yerel etik kurulu çalışma protokolünü onayladı (onay numarası: 2014/123). Tüm katılımcılar, yazar (E.M) tarafından çalışmanın açıklanmasından

Tablo 1: Çalışma grupları arasında demografik verilerin ve sitogenetik hasar belirteçlerinin karşılaştırılması

	Böbrek nakilli maligniteli hastalar n:10	Böbrek nakilli malignitesiz hastalar n:15	Sağlıklı kişiler n: 12	P
Yaş (Yıl)	44.1 + 11.5	40.6 + 13.1	49.8 + 8.6	0.131
Cinsiyet (Kadın/Erkek %)	4 (%40)/6 (%60)	10 (%66.7)/5 (%33.3)	6 (%50)/6 (%50)	0.399
Mononükleer hücrelerdeki mikronükleus sayısı	7.5 (2.0-11.0)	5.0 (0-12.0)	1.0 (0-9.0)	<0.001
Binükleer hücrelerdeki mikronükleus sayısı	54.0 (8.0-199.0)	32.0 (0-182.0)	10.0 (2.00-29.00)	<0.001
Nükleer bölünme indeksi	1.12 (1.06-1.21)	1.12 (1.01-1.27)	1.07 (1.03-1.21)	0.294

	Böbrek nakilli maligniteli hastalar n:10	Böbrek nakilli malignitesiz hastalar n:15	P
Yaş (Yıl)	44.1 + 11.5	40.6 + 13.1	0.131
Cinsiyet (Kadın/Erkek %)	4 (%40)/6 (%60)	10 (%66.7)/5 (%33.3)	0.399
Nakil öncesi diyaliz süresi (Ay)	12.5 (0-118.0)	17.0 (0-111.0)	0.605
Nakil öncesi diyaliz tipi			0.870
Hemodiyaliz (%)	6 (%60)	9 (%60)	
Periton diyalizi (%)	2 (%20)	4 (%26.7)	
Diyaliz tedavisi almadan nakil (%)	2 (%20)	2 (%13.3)	
Donör tipi (%)			0.261
Canlı (%)	6 (%60)	12 (%80)	
Kadvra (%)	4 (%40)	3 (%20)	
Nakil sonrası geçen süre (Ay)	103 (17-250)	71 (1-167)	0.285
Vücut kitle indeksi (kg/m ²)	25.2 + 4.3	25.2 + 3.7	0.992
Sistolik kan basıncı (mmHg)	128 + 7	130 + 15	0.652
Diastolik kan basıncı (mmHg)	81 + 8	82 + 11	0.804
Diabetes Mellitus varlığı (%)	1 (%10)	2 (%13.3)	0.654
Akut rejeksiyon varlığı (%)	2 (%20)	2 (%13.3)	0.532
Sigara öyküsü			0.455
Hiç kullanmayan (%)	5 (%50)	8 (%53.3)	
Bırakmış (%)	4 (%40)	7 (%46.7)	
Aktif olarak kullanıyor (%)	1 (%10)	-	

Tablo 2: Böbrek nakli yapılmış gruplar arasında demografik ve klinik parametrelerin karşılaştırılması

sonra yazılı bilgilendirilmiş onamlarını vermişti. Hastaların son kontrolünde tam kan sayımı, glukoz, serum lipidleri, kan üre nitrojeni (BUN), serum kreatinin, ürik asit, kalsiyum, fosfor, albümin ve proteinüri düzeyleri kaydedildi. Ayrıca böbrek nakli yapılmış hastalarda kilo ve boy, demografik veriler, böbrek hastalığının nedeni, immünosupresif protokol, diyaliz süresi, sistolik- diastolik kan basınçları ve böbrek donör tipi gibi vücut ölçüleri kaydedildi. Tahmini glomerüler filtrasyon hızı (eGFR), Kronik Böbrek Hastalığı Epidemiyoloji (CKD-EPI) formülasyonu temelinde bir çevrimiçi hesaplayıcı ile hesaplandı (12). Kan örnekleri alındığında hastaların hiçbiri diyalize bağımlı değildi. Vücut kitle indeksi (VKİ); ağırlığın (kg), boyun metrekaresine (m²) bölünmesiyle hesaplandı.

Mikronükleus Tahlili

Tüm deneklerden MN analizi için beş mililitre heparinize venöz kan örneği alındı ve toplanan kan örnekleri en geç 4 saat içinde MN analizi için kültür ortamına alındı. MN

hazırlanmasında Fenech yöntemi kullanıldı. MN analizi için sitokinez blok mikronükleus (CBMN) tahlili kullanıldı (3).

Heparinize tam kan örnekleri; %20 buzağı serumu, %2 fitohemaglutinin, L-glutamin ve penisilin/streptomisin içeren 5 mL Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 ortamında kültüre alındı. MN analizi için örnekler kültür ortamına alındıktan 44 saat sonra iki çekirdekli hücreler elde etmek üzere her kültüre sitokalasin B (3 mg/mL) ilave edildi ve hücrelerin 28 saat daha büyümesine izin verildi. Hücre kültürleri 72 saat sonra santrifüjleme ile toplandı. Tüpler 1400 devirde 6 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı ve hücreler daha sonra 3 dakika boyunca 37 °C'de 5 ml'lik bir hipotonik potasyum klorür çözeltisine maruz bırakıldı.

Karışım yeniden süspansiyon edildikten sonra soğuk meta-nol-buzlu asetik asit (3:1) karışımı içinde sabitlendi ve iki kez taze sabitleyici içinde iyice yıkandı. MN oluşumunu

	Böbrek nakilli maligniteli hastalar n:10	Böbrek nakilli malignitesiz hastalar n:15	P
Kan beyaz küre sayısı (/mm ³)	8210 + 1890	7470 + 2440	0.428
Hemoglobin (g/dL)	12.5 + 1.8	12.8 + 1.8	0.627
Glukoz (mg/dL)	87 (53-112)	89 (71-219)	0.261
Total kolesterol (mg/dL)	176 + 44	180 + 35	0.792
Trigliseride (mg/dL)	130 (67-400)	150 (44-343)	0.643
Düşük dansiteli lipoprotein (mg/dL)	90 + 33	92 + 22	0.855
Yüksek dansiteli lipoprotein (mg/dL)	46 + 26	54 + 17	0.352
Urik asid (mg/dL)	6.9 + 2.2	5.7 + 1.8	0.182
Düzeltilmiş kalsiyum (mg/dL)	9.0 (8.0-9.9)	9.3 (6.7-9.8)	0.495
Fosfor (mg/dL)	3.0 + 1.2	3.1 + 0.6	0.700
Serum albumin (g/dL)	4.3 (3.0-4.6)	4.4 (3.7-4.7)	0.144
Glomerular filtration hızı (mL/dk)	56.3 + 34.1	75.9 + 29.8	0.141
Proteinüri (mg/gün)	480 (93-5400)	188 (64-1875)	0.144

Tablo 3: Böbrek nakli yapılmış gruplar arasında biyokimyasal parametrelerin karşılaştırılması

ve nükleer bölünme indeksini (NBI) incelemek için lam- lar hazırlandı. Sabitlenen hücreler, 37 °C'de kurutulan, %5 Giemsa boyası ile 8 dakika boyunca boyanan ve ardından ardından ışık mikroskopunda 40x ve 10x büyütmede in- celenen lamlara damlatıldı. Tüm lamlar kodlandı ve kör- lemesine okundu. Hazırlanan numunelerdeki 1000 hücre, her lam için skorlandı. MN'lu binükleer ve mononükleer hücre sayısı belirlendi. MN tanımlaması Fenech kriterle- rine göre yapıldı (3). Ayrıca NBI, Eastmond ve Tucker'ın yöntemine göre hesaplandı (13).

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analiz için SPSS 15.0 istatistik yazı- lımı kullanıldı. Değişkenler görsel (histogramlar, olasılık grafikleri) ve analitik yöntemler (Kolmogorov-Smirnov/ Shapiro-Wilk testi) kullanılarak normal dağılıma sahip olup olmadıklarını belirlemek için analiz edildi. Nicel de- ğişkenler uygun olduğunda ortalama \pm SD (standart sap- ma) ve medyan (minimum/maksimum) olarak, nitel de- ğişkenler ise sayı (yüzde) olarak ifade edilmiştir. Normal dağılım gösteren nicel değişkenleri karşılaştırmak için Stu- dent-T testi, anormal dağılım gösteren nicel değişkenlerde ise iki grup arasındaki karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi kullanıldı. Kategorik (nitel) değişkenler arasındaki ilişki Ki-kare testi kullanılarak değerlendirildi. İki'den fazla

grupta normal dağılım gösteren nicel değişkenleri karşı- laştırmak için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kulla- nıldı. Farklılığa neden olan grupları belirlemek için Scheff- fe testi yapıldı. Üç grup arasındaki parametrik olmayan değişkenler Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı. Farka neden olan grupları belirlemek için Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi yapıldı. Bir p-değeri, 0,05'ten kü- çük olduğunda anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Gruplar arası demografik değişkenler ve sitoge- netik hasar göstergelerinin karşılaştırılması Tablo 1'de verilmiştir. Yaş, cinsiyet ve NBI açısından 3 grup arasında anlamlı fark yoktu. Hem mononükleer hücrelerde hem de binükleer hücrelerde MN sayısı açısından gruplar arasın- da anlamlı fark vardı. Bu sayılar, malignitesi olan veya ol-mayan böbrek nakli hastalarında sağlıklı kontrollere göre daha yüksekti. Fark istatistiksel olarak anlamlı olmasa da, hem mononükleer hücrelerde hem de binükleer hücreler- de MN sayısı, malignitesi olan böbrek nakli hastalarında, malignitesi olmayan böbrek nakli hastalarına göre daha yüksekti.

Tablo 2, böbrek nakli yapılmış malignitesi olan ve olma- yan gruplar arasındaki demografik verilerin ve klinik özel- liklerin istatistiksel analizini göstermektedir. Nakil öncesi

Hastalar	Mononükleer hücrelerdeki MN sayısı	Binükleer hücrelerdeki MN sayısı	Malignite tipi	Nakil sonrası süre (Ay)	Malignite tanısı sonrası geçen süre (Ay)	Malignite tedavisi	Malignite durumu
H1	6	133	DBBHL	18	6	R-CHOP*	Aktif hastalık
H2	8	113	Servikal epidermoid karsinom	204	96	Radikal histerektomi ve pelvik lenf nodu diseksiyonu	Remisyon
H3	8	133	Cilt bazal hücreli karsinom	110	34	Cerrahi eksizyon + mTOR inhibitör	Remisyon
H4	2	199	DBBHL	190	104	R-CHOP + immünsupresif tedavi doz azaltım**	Remisyon
H5	6	41	Yüksek dereceli mesane karsinomu	132	85	TUR + mTOR inhibitör	Remisyon
H6	11	58	Cilt skuamöz hücreli karsinom	250	99	Cerrahi eksizyon + immünsupresif doz azaltım***	Remisyon
H7	5	8	Cilt adenoid bazal hücreli karsinom	45	39	Cerrahi eksizyon + immünsupresif doz azaltım***	Remisyon
H8	11	18	Böbrek hücreli karsinom	17	10	Radikal nefrektomi	Remisyon
H9	7	50	Paratiroid karsinomu	96	5	Total paratiroidektomi	Remisyon
H10	8	16	Rektum nöroendokrin karsinom	93	11	Polipectomi + mTOR inhibitör + immünsupresif tedavi doz azaltım**	Remisyon

Tablo 4: Mononükleer hücrelerdeki ve binükleer hücrelerdeki mikronükleus sayısı ve malignitesi olan böbrek nakli yapılmış hastaların malignitesine ilişkin veriler

*R-CHOP kemoterapisi devam etmekteydi ve immünsupresif tedavi kesilmişti** Akut rejeksiyonu önlemek için verilen immünsupresif tedavi kemoterapi verildiği süre boyunca kesilmişti.*** Hastaya mTOR inhibitörü başlandı ancak yan etki nedeniyle ilaç kesildi. **DBBHL:** Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma **R-CHOP:** Rituksimab-siklofosfamid, doksorubisin, vinkristin, prednizolon **TUR:** Transüretal rezeksiyon mTOR: Rapamisin hedefi

diyaliz süresi de dahil olmak üzere demografik ve klinik parametreler açısından iki grup arasında anlamlı bir fark yoktu ($p > 0.05$).

Tablo 3, böbrek nakli yapılmış malignitesi olan ve olmayan gruplar arasındaki biyokimyasal parametrelerin karşılaştırmasını göstermektedir. İki grup arasında biyokimyasal parametreler açısından anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$).

Tablo 4, mononükleer hücreler ve binükleer hücrelerdeki MN sayısını ve maligniteye sahip her böbrek nakli yapılmış hastanın malignitesi hakkındaki verileri göstermektedir. Nakil sonrası malignite tipi olarak; 3 hastada (%30) deri kanseri, 2 hastada (%20) Hodgkin dışı lenfoma (NHL), 1 hastada (%10) serviks kanseri, 1 hastada (%10) mesane kanseri, 1 hastada paratiroid kanseri (%10), 1 hastada böbrek hücreli karsinom ve 1 hastada (%10) nöroendokrin tümör vardı. Maligniteli 9 hasta remisyondayken, NHL tanısı olan 1 hastada aktif malignite vardı.

TARTIŞMA

Kendiliğinden veya genotoksik maruziyete yanıt olarak ortaya çıkan MN, mitoz sırasında iki yavru çekirdeğe dahil edilemeyen periferik parçalardan veya bölünmemiş kromozomlardan oluşur. MN testi sitogenetik hasar göstergesi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (14). Daha önce yapılmış olan çalışmalarda T-lenfositlerin yarılma ömürleri ve ortalama ömürleri sırasıyla 3 yıl ve 4 yıl olarak bildirilmiştir (15-17). Kültürlenmiş insan lenfositlerindeki spontan veya temel MN frekansları, dolaşımdaki lenfositlerin ömrü boyunca gelişen kümülatif genetik hasarın bir indeksini gösterir. Genetik kararsızlık, olgun lenfositlerin kaynaklandığı kök hücrelerde biriken mutasyonları da yansıtabilir (15). CBMN testinin kanser risk değerlendirmesi için umut verici bir yöntem olduğu bildirilmiştir (18,19). MN testi başlıca kromozomları etkileyebilecek fiziksel etkenlerin (ultraviyole ışınları ve radyasyon gibi) ve her türlü kimyasal maddenin genotoksik ve kar-

sinojenik potansiyellerinin tespitinde, ilaçların piyasaya sürülmeden önce toksik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada, kanserden korunmada ve kanserin izlenmesinde bir biyobelirteç testi olarak yaygın kullanılmaktadır (19). Kanser gelişimi için bu tür yüksek risk gruplarından biri de, akut allogreft reddinin önlenmesi için immünosupresif ajan alan böbrek nakli alıcılarıdır. Daha önce yapılmış çalışmalarda akciğer, endometrium, serviks, tiroid gibi çeşitli kanserleri olan hastaların mononükleer ve/veya binükleer lenfositlerdeki MN sayısının sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir (18,20-23). MN tahlili, radyasyona maruz kalmanın sitogenetik etkilerinin araştırılması için de kullanılmıştır. Mikhalevich ve ark. Çernobil felaketinden dolayı kronik olarak radyasyona maruz kalan çocukların lenfositlerindeki sitogenetik ve mutasyonel etkileri araştırmışlar ve mononükleer hücrelerde MN frekansının, radyasyona maruz kalan çocuklarda, maruz kalmayan çocuklara göre anlamlı derecede daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (24). Benzer şekilde MN tetkiki baş ve boyun kanserli hastalarda radyoterapinin sitogenetik hasarını değerlendirmek için de kullanılmıştır. Mononükleer ve binükleer lenfositlerdeki MN sayısının, baş ve boyun kanserli hastalarda sağlıklı gruba göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu bulunmuştur (25). Böbrek nakil sonrası akut rejeksiyonu önlemek için takrolimus, siklosporin A, mikofenolat mofetil ve sirolimus gibi immünosupresif ilaçlar kullanılmaktadır. Oliveira ve ark. CBMN testini kullanarak insan lenfosit kültürlerinde bu ajanların mutajenik etkilerini araştırmış ve mikofenolat mofetil veya takrolimus ile desteklenmiş kültürlerin solvent kontrollerine kıyasla daha yüksek miktarlarda MN gösterdiğini bulmuştur. Kültürlere siklosporin A eklenmesi de MN sayısında artışa neden olmuştur. Öte yandan, sirolimusun klinik olarak gerekli kan düzeylerinin üzerindeki yüksek konsantrasyonlarda MN'yi indükleyebileceği gözlemlenmiştir. Sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında, böbrek nakli yapılan hastalarda immünosupresif ajanların MN sıklığında önemli bir artışa yol açtığı gösterilmiştir (26). MN frekanslarının, hem diyaliz öncesi böbrek yetmezliği hastalarında hem de uzun süreli HD programında olan

hastalarda sağlıklı bireylere göre anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir (10). Ayrıca diyalizde geçirilen süre ile MN sayısı arasında lineer bir ilişki vardır. Ayrıca, böbrek nakli yapılmış hastalarda immünosupresif tedavi önceki kronik böbrek hastalığının genotoksik hasarını artırır. Bu durum hasta popülasyonundaki yüksek kanser riskinden sorumlu olabilir (27).

Bizim çalışmamızın sonuçları da literatürle uyumluydu. Hem mononükleer hücrelerdeki hem de binükleer hücrelerdeki MN sayısı, immünosupresyon altındaki böbrek nakli hastalarında sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Ancak hem mononükleer hücrelerdeki hem de binükleer hücrelerdeki MN sayısı açısından malignitesi olan ve malignitesi olmayan böbrek nakli hastaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Öte yandan, hem mononükleer hücrelerdeki hem de binükleer hücrelerdeki MN sayısı, malignitesi olan böbrek nakli hastalarında malignitesi olmayanlara göre sayısal olarak daha yüksekti. Bu tip 2 istatistiksel hatadan kaynaklanıyor gibi görünmektedir. Yani hasta sayısı artırılırsa fark istatistiksel anlamlılığa ulaşabilir.

Daha önce yapılmış çalışmalarda radyoterapinin kanser hastalarında MN sıklığını arttırdığı gösterilmiştir (6,28). Ancak bizim çalışmamızda malignitesi olan böbrek nakli yapılmış hastaların hiçbiri radyoterapi almamıştı. Bu nedenle maligniteli hastalarımızda radyoterapinin MN oluşumuna etkisi yoktu. Benzer şekilde kemoterapinin de MN oluşumunu indüklediği daha önce gösterilmiştir (28,29). Ayrıca siklofosamid, doksorubisin, vinkristin ve prednizon (CHOP) protokolüne göre tedavi alan NHL hastalarında MN sıklığının net olarak arttığı gösterilmiştir (30). Bizim çalışmamızda malignitesi olan 2 böbrek nakli hastası CHOP protokolünü aldı. Bu hastalarda MN sıklığının artmasının nedenleri malignitenin yanı sıra kemoterapi almaları da olabilir. Bununla birlikte, diğer hastaların hiçbiri malignitelerinin tedavisi için kemoterapi almamıştı. Bu nedenle malignitesi olan bu hastalarda kemoterapinin MN oluşumuna etkisi yoktu. Ancak böbrek nakli yapılan hastaların tamamı immünosupresif tedavi almıştı. Biyobelirteçlerle nakil sonrası ikincil malignitelerin erken

tanımlanması, hastalığın prognozu için çok önemlidir. MN tahlili gibi sitogenetik hasarı gösteren yöntemler erken tanı için kullanılabilir. MN skorlanması zaman alıcı bir süreç olduğundan, testi rutin uygulamada bir tarama yöntemi olarak kullanmak zordur. Ancak bu puanlamanın optik okuyucular gibi otomatik sistemlerle yapılması durumunda sorun gelecekte çözülebilir. Bu çalışmanın türü ve hasta sayısı açısından bazı sınırlamaları vardır. Mevcut çalışma kesitseldi. Bu nedenle immünosupresif tedavi ile sitogenetik hasar arasında neden-sonuç ilişkisi kurmak mümkün değildi. Ayrıca MN sayısı ile sitogenetik hasar arasındaki ilişkinin belirlenmesi, yeterli sayıda maligniteli böbrek nakli yapılmış hastamız olmadığı için zordu.

SONUÇ

Sağlıklı bireylere kıyasla böbrek nakli hastalarında periferik mononükleer ve binükleer hücrelerde MN sayısında artış vardır. Malignitesi olan böbrek nakli hastalarında sayı, malignitesi olmayan böbrek nakli hastalarına göre daha yüksektir. Böbrek nakli alıcılarında periferik mononükleer ve binükleer hücrelerin MN sıklığı, malignite gelişiminin değerlendirilmesinde önemli olabilir. Bu konuyu aydınlatmak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Teşekkür ve çıkar çatışması : Çalışmamız için herhangi bir hibe veya başka bir destek kaynağı almadık.

Çalışmamızda çıkar çatışması yoktur.

References

1. Yang TC, Shu KH, Cheng CH, Wu MJ, Lian JD. Malignancy following renal transplantation. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 1998; 61: 281-8.
2. Morath C, Mueller M, Goldschmidt H, Schwenger V, Opelz G, Zeier M. Malignancy in renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 1582-8.
3. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2007; 2: 1084-104.
4. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP, Holland N, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 2007; 28: 625-31.
5. Sekeroglu V, Sekeroglu ZA. [Micronucleus test for determining genotoxic damage]. *Turk Hij Den Biyol Derg* 2011; 68: 241-52. [Article in Turkish]
6. 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.
7. Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW, et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1983; 123: 61-118.
8. Farrow MG, McCarroll NE, Auletta AE. 1984 survey of genetic toxicology testing in industry, government and academic laboratories. *J Appl Toxicol* 1986; 6: 211-23.
9. Yager JW, Sorsa M, Selvin S. Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes as an index of occupational exposure to alkylating cytostatic drugs. *IARC Sci Publ* 1988; 89: 213-6.
10. Stopper H, Meysen T, Böckenförde A, Bahner U, Heidland A, Vamvakas S. Increased genomic damage in lymphocytes of patients before and after long-term maintenance hemodialysis therapy. *Am J Kidney Dis* 1999; 34: 433-7.
11. Lizotti Cilião H, Batista de Oliveira Camargo-Godoy R, Mazzaron Barcelos GR, Zanuto A, Daher Alvares Delfino V, de Syllos Cólus IM. Long-term genotoxic effects of immunosuppressive drugs on lymphocytes of kidney transplant recipients. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2016; 806: 47-52.
12. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009; 150: 604-12.
13. Eastmond DA, Tucker JD. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environ. Mol. Mutagen* 1989; 13: 34-43.
14. Schuler M, Rupa DS, Eastmond DA. A critical evaluation of centromeric labeling to distinguish micronuclei induced by chromosomal loss and breakage in vitro. *Mutat Res* 1997; 392: 81-95.
15. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ Health Perspect* 1993; 101: 101-7.
16. Natarajan AT, Obe G. *Mutagenicity*. New York: Academic Press; 1982, 172-204 p.
17. Buckton KE, Court-Brown WM, Smith PG. Lymphocyte survival in men treated with X-rays for ankylosing spondylitis. *Nature* 1967; 214: 470-3.
18. El-Zein RA, Schabath MB, Etzel CJ, Lopez MS, Franklin JD, Spitz MR. Cytokinesis-blocked micronucleus assay as a novel biomarker for lung cancer risk. *Cancer Res* 2006; 66: 6449-56.
19. El-Zein R, Vral A, Etzel CJ. Cytokinesis-blocked micronucleus assay and cancer risk assessment. *Mutagenesis* 2011; 26: 101-6.
20. Shi YH, Wang BW, Tuokan T, Li QZ, Zhang YJ. Association between micronucleus frequency and cervical intraepithelial neoplasia grade in Thinprep cytological test and its significance. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 8426-32.
21. Fucic A, Gamulin M, Katic J, Milic M, Druzinin V, Grgić M. Genome damage in testicular seminoma patients seven years after radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 2013; 89: 928-33.
22. AlFaisal AH, Al-Ramahi IJ, Abdul-Hassan IA. Micronucleus frequency among Iraqi thyroid disorder patients. *Comp Clin Path* 2012; 23: 683-8.
23. Kiraz A, Açmaz G, Uysal G, Unal D, Dönmez-Aluntas H. Micronucleus testing as a cancer detector: endometrial hyperplasia to carcinoma. *Arch Gynecol Obstet* 2016; 293: 1065-71.
24. Mikhalevich LS, De Zwart FA, Perepetskaya GA, Chebotareva NV, Mikhalevich EA, Tates AD. Radiation effects in lymphocytes of children living in a Chernobyl contaminated region of Belarus. *Int J Radiat Biol* 2000; 76: 1377-85.
25. Unal D, Kiraz A, Avci D, Tasdemir A, Unal TD, Cagli S, et al. Cytogenetic damage of radiotherapy in long-term head and neck cancer survivors. *Int J Radiat Biol* 2016; 92: 364-70.
26. Oliveira VD, Zankl H, Rath T. Mutagenic and cytotoxic effects of immunosuppressive drugs on human lymphocyte cultures. *Exp Clin Transplant* 2004; 2: 273-9.
27. Rath T, Oliveira-Frick V. Mutagenicity of immunosuppressive medications among renal transplant recipients. *Am J Nephrol* 2009; 30: 514-20.
28. Driessens G, Harsan L, Robaye B, Waroquier D, Browaeys P, Giannakopoulos X, et al. Micronuclei to detect in vivo chemotherapy damage in a p53 mutated solid tumour. *Br J Cancer* 2003; 89: 727-9.
29. Schlegel R, MacGregor JT, Everson RB. Assessment of cytogenetic damage by quantitation of micronuclei in human peripheral blood erythrocytes. *Cancer Res* 1986; 46: 3717-21.
30. Arsoy NS, Neuss S, Wessendorf S, Bommer M, Viardot A, Schütz P, et al. Micronuclei in peripheral blood from patients after cytostatic therapy mainly arise ex vivo from persistent damage. *Mutagenesis* 2009; 24: 351-7.