

Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları

Sennur Demirel, Ayşe Gül Zamani

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Konya

Amaç: Bu derlemenin amacı sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak kabul edilen mikronükleus (MN) tekniği hakkında bilgi vermektir. **Ana bulgular:** Uzun zamandan beri kullanılan ve geliştirilmiş olan MN testi, mitoz geçiren tüm bitki, hayvan ve insan hücrelerinde, fiziksel ve kimyasal ajanların oluşturduğu genotoksik etkinin belirlenmesinde kullanılabilir. **Sonuç:** MN oluşum sıklığındaki artış, genetik materyalde oluşan hasarın bir göstergesi olarak değerlendirilmektedir.

Anahtar kelimeler: Mikronükleus, kromozom hasarı

Micronucleus technique and its implementation areas

Objective: The aim of this article is to inform about the micronucleus (MN) technique which is considered to be an indirect indication for numerical and structural aberrations of chromosomes. **Main findings:** MN test can be used to determine the genotoxic effects caused by the physical and chemical agents on all types of plant and animal cells reproducing by mitosis, for a long time. **Conclusion:** The evaluation of the MN frequency elevation can be interpreted as an indicator of the damage which occurred on the genetic material.

Key words: Micronucleus, chromosome damage

Genel Tıp Derg 2002;12(3):123-127

Mikronükleuslar (MN) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. 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 bulunmaktadır (1-4). Günümüzde, hızlı endüstrileşmeye bağlı olarak çevresel kirliliğin giderek artmasıyla, canlılar daha fazla fiziksel ve kimyasal ajana maruz kalmakta dolayısıyla güçlü toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik faktörlerin olumsuz etkilerini tespit etme ve önlemler alma ihtiyacı kaçınılmaz olmaktadır. Bu nedenle,

MN testi sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi avantajı sağlanmasıyla yaygın kullanım alanı bulan bir teknik olmuştur (5-14).

Mikronükleus tekniğinin gelişimi

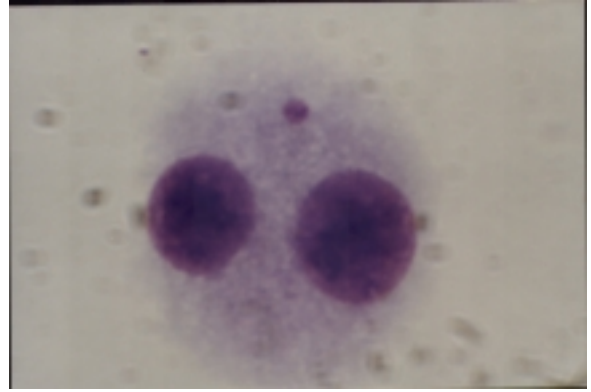
MN testi 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde (15,16) ve daha sonra Haddle ve arkadaşları tarafından kültüre edilmiş (17) insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bazı araştırmacılar (18-20) geliştirdikleri modifiye metotlarla anöploidiye yol açan ajanlar ile klastojenleri birbirinden ayırmada MN büyüklük farkından yararlanmışlar; klastojenlerce uyarılan MN'lerin asentrik kromozomal fragmanlar içeren küçük, anojenlerce uyarılan MN'lerin tam kromozomlar içeren daha büyük ebatlı olduğunu göstermişlerdir. Eastmond ve Tucker (21) aynı amaçla antikinotokor antikorları kullanarak

Yazışma adresi: Doç.Dr.Sennur Demirel, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 42080, Meram, Konya.

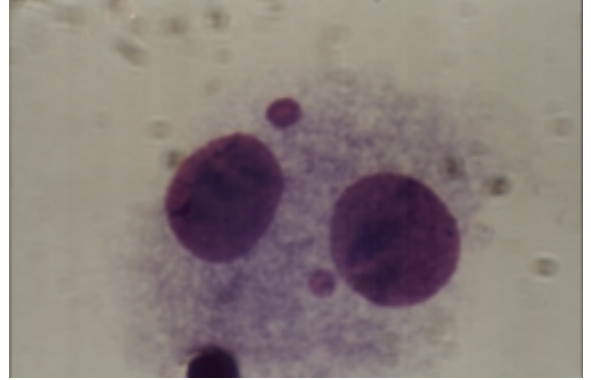
kinetokor pozitif MN'lerin tam bir kromozom, kinetokor negatif MN'lerin ise asentrik kromozom fragmanı içerdiğini ve bu yöntemin anöploidi uyaran ajanları klastojenlerden ayırmada daha kesin bir yol olduğunu vurgulamışlardır. Daha sonraları Fenech ve Morley (22,23) tarafından geliştirilen Sitokinezi-Blok (Cytokinesis-Blocked) Metodu, bazı kinetik problemlerin ortadan kalkmasını ve tekniğin uygulanmasındaki güvenilirliğin artmasını sağlamıştır. Bu metot, küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan Cytochalasin-B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanmaktadır. Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B ilavesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir. İncelenen alanda, kültür süresi içinde ikinci bölünmesini tamamlamış 4 çekirdekli hücelere de rastlanmaktadır; ancak MN sayımında Heddle ve Countryman'ın (19) kriterleri kullanıldığından bu hücrelerde görülen MN'ler değerlendirme dışı bırakılmaktadır. Heddle ve Countryman'ın (19) kriterlerine göre:

1. MN çapının esas çekirdeğin 1/3'ünden küçük olması;
2. Boya alma yoğunluğunun esas çekirdek ile aynı olması;
3. Sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MN'lerin sayılması esas alınmaktadır (Şekil 1, 2 ve 3).

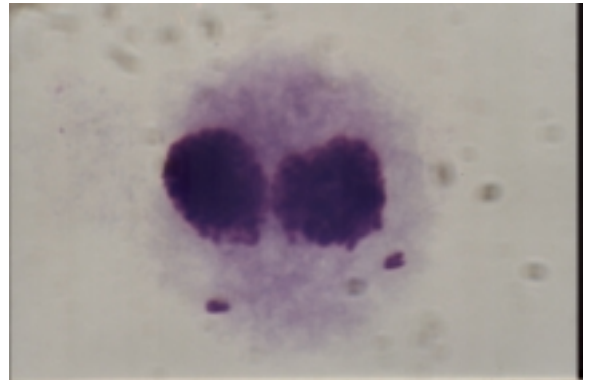
Lenfosit kültürlerindeki çalışmalara paralel olarak MN tekniği, eksfoliyatif hücelere 1982 yılında ilk defa Stich ve arkadaşları (24) tarafından uygulanmıştır. Bu teknik sayesinde ağız, burun, bronş ve ürotelyal eksfoliyatif hücelerde kimyasalların ve enfeksiyonların etkilerini değerlendirmek mümkün olmuştur (25,26). Hızla çoğalan bu epitelyal dokular çevreleriyle sürekli temas halindedir ve epitelin yüzeyel tabakasını oluşturan eksfoliyatif hücreler kolaylıkla elde edilebilmekte, dolayısıyla uğradıkları genotoksik hasar da kolaylıkla gösterilebilmektedir. Böylece bu hücreler ait oldukları dokularda meydana gelen morfoloji bozukluğunu, kromozom kırıklarını,



Şekil 1. Sitokinezi bloke edilmiş bir mikronükleus bulunan hücre



Şekil 2. Sitokinezi bloke edilmiş iki mikronükleus bulunan hücre.



Şekil 3. Mitoz bölünmede nükleusların dışında kalan ve mikronükleus oluşturmaya aday iki kromozom görülen hücre.

pre malign değişiklikleri ve kanseri gösterebildiklerinden bir biyomarker olarak değerlendirilebilmekte ve karsinojenlere maruz kalmış bireylerde artmış kanser riskini göstermek amacıyla kullanılabilir (26-28). Eksfoliyatif

hücrelerde uygulanan MN tekniğinde Fuelgen-Fast Green boyama yöntemi kullanılmakta, hücrenin çekirdeği parlak pembe, sitoplazması ise açık yeşil boyanmaktadır. MN testi sigara, pestisid ve parazitik enfeksiyonlar gibi çevresel ve mesleki etkileri değerlendirebilmek için kolaylıkla kullanılmaktadır (27,29-31). Bölümümüzde yapılan bir araştırmada (32) periferel kan, bukkal mukoza ve üriner sistem eksfoliyatif hücrelerinde sigaranın genotoksik etkisi gösterilmiştir.

MN araştırmalarında in situ hibridizasyon (ISH) tekniği, ilk defa kromozomların sentromerini tanımlamak için Norppa ve arkadaşları (33) tarafından uygulanmıştır; bu çalışmada kullanılan proplar, 1989 yılında Meyne ve arkadaşları (34) tarafından hazırlanmış insan kromozomlarının her biriyle hibridize olabilen sentromere spesifik oligonükleotidlerdir (SO α AllCen). Daha sonra, floresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniği ile MN oluşturan kromozomların her birinin kimliğini belirleyebilecek teknolojik gelişmeler sağlanmıştır (35). Biz de bir araştırmamızda (36) akut lenfoblastik lösemili (ALL) hastalarda kullanılan ilaçların tedavi öncesi ve sonrası MN insidansını ve MN oluşumuna katılan kromozomların kimliğini FISH tekniği ile saptamayı amaçladık. Tüm kromozoma spesifik ve α satelit sentromerik problemlerin kullanıldığı bu çalışmada, tedavi sonrasında MN frekansında önemli bir artış olduğu, ancak kullanılan ilaçların herhangi bir spesifik kromozomun insidansında farklılık oluşturmadığı ve ayrıca sentromer pozitif ve sentromer negatif MN'ler arasında da farklılık bulunmadığı gösterildi.

Mikronükleus tekniğinin kullanım alanları

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 arttı.

Mavournin ve arkadaşları (37) 1990 yılına kadar kimyasalların canlılar üzerindeki etkilerini belirleyebilmek için yapılan tüm MN test sonuçlarını toplayarak, ABD Çevre Koruma Grubunun Gen-toks Programı dahilinde değerlendirmeye aldılar. Memelilerin kan ve kemik iliğinde in vivo çalışılmış olan 414 bileşiğin sadece 220'sinin kriterlere uygun

test edilebildiği ortaya çıktı. Uygun test edilen kimyasallar arasında karsinojenlerin oranı % 91 olarak saptandı; ancak negatif testlerin azlığı ciddi bir eksiklik olarak bildirildi. Ayrıca bu çalışmalarda esas alınan ve yıllar önce Schmid (38) tarafından tanımlanan MN test protokolünün modifikasyonuna ihtiyaç duyulduğu ve daha fazla çalışmanın gerekli olduğu vurgulandı.

Fiziksel ajanların etkileri deneysel MN çalışmaları yanında, 13 Eylül 1987'de Goiânia'da (Brezilya) meydana gelen radyolojik kazanın genetik materyalde oluşturduğu hasarı belirlemek için kullanıldı. MN sıklığında iyonizan radyasyonun dozuna bağlı çok anlamlı bir artış gözlemlendi ve MN testinin biyolojik dozimetre olarak kullanılması önerildi. Ayrıca Goiânia kazasına maruz kalan insanlardaki sitogenetik değişiklikler iyonizan radyasyon ile yaş ve hayat tarzı (alkol tüketimi, sigara kullanımı) gibi faktörlerin etkisi birlikte ele alınarak değerlendirildi (39). Daha sonra bu konuda yapılan çeşitli araştırmalar iyonizan radyasyonun ve mikro dalga ışınların klastojenik etkisini açıkça ortaya koydu ve ayrıca mikro dalga ışınların, anöploidi uyaran bazı kimyasalların, karakteristik mutajen özelliklerine de sahip olduğu gösterildi (16,40-43). Biz de bir araştırmamızda (44) yenidoğan sarılıklarında tedavi amacıyla kullanılan fototerapinin organizma üzerindeki etkilerini MN testi ve DNA hasarının en hassas göstergesi olan kardeş kromotid değişim (KKD) yöntemiyle araştırdık. Floresan ışığın KKD oranını etkilemediğini; ancak MN sıklığının istatistiksel anlamda arttırıldığını saptadık.

Yenidoğan bebeklerde ve 18-25 yaş grubu bireylerde yapılan iki ayrı çalışmada (45,46) MN frekansının erkek ve dişi cinsiyete bağlı bir farklılık göstermediği saptanmıştır. Ancak yaşlılarda yapılan bir diğer çalışmada (35) kadınlarda MN sıklığının yaşlanma ile artış gösterdiği anlaşılmış; ayrıca FISH tekniği ile MN oluşturan kromozomların kimliği belirlenerek; yaşlı kadınlarda X kromozomlarının otozomal kromozomlardan daha sık olarak MN oluşumuna katıldığı gösterilmiştir. X kromozom kaybı, aynı zamanda monozomik hücrelerde karyotip analizleriyle de doğrulanmıştır. Bu çalışma, MN oluşumu ile karyotip analizlerinde saptanabilen kromozom düzensizlikleri arasındaki paralelliği açıkça ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak; sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilen MN testi, organizmayı etkileyen çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların sitogenetik etkilerini belirlemek için yapılabilecek büyük çaplı tarama çalışmalarında güvenle kullanılabilir.

Kaynaklar

1. Zijno A, Marcon F, Leopardi P, Salvatore G, Carere A, Crebelli R. An assessment of the in vivo clastogenicity of erythrosine. *Fd Chem Toxic* 1994;32:159-63.
2. Ford JH, Schultz CJ, Correll AT. Chromosome elimination in micronuclei: A common of hypoploidy. *Am J Hum Genet* 1988;43:733-40.
3. Vanderkerken K, Vanparys P, Verschaeve M, Volders K. The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneuploids from clastogens. *Mutagenesis* 1989;4:6-11.
4. 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.
5. Labay K, Ould-Elhkim M, Kles V, Guffroy M, Poul JM, Sanders P. Effects of griseofulvin in medium-term liver carcinogenesis assay and peripheral blood micronucleus test in rat. *Teratog Carcinog Mutagen* 2001;21:441-51.
6. Majer BJ, Laky B, Knasmuller S, Kassie F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutat Res* 2001;489:147-72.
7. Pastor S, Gutierrez S, Creus A, Xamena N, Piperakis S, Marcos R. Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis* 2001;16:539-45.
8. Schweikl H, Schmalz G, Spruss T. The induction of micronuclei in vitro by unpolymerized resin monomers. *J Dent Res* 2001;80:1615-20.
9. Hessel H, Radon K, Pethran A, Maisch B, Grobmair S, Sautter I, et al. The genotoxic risk of hospital, pharmacy and medical personnel occupationally exposed to cytostatic drugs-evaluation by the micronucleus assay. *Mutat Res* 2001;497:101-9.
10. Garewal HS, Ramsey L, Kaugars G, Boyle J. Clinical experience with the micronucleus assay. *Cellular Biochem* 1993;17:206-12.
11. Maluf SW, Erdtmann B. Genomic instability in Down syndrome and Fanconi anemia assessed by micronucleus analysis and single-cell gel electrophoresis. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;124-5.
12. Schneider M, Diemer K, Engelhart K, Zankl H, Trommer WE, Biesalski HK. Protective effects of vitamins C and E on the number of micronuclei in lymphocytes in smokers and their role in ascorbate free radical formation in plasma. *Free Radic Res* 2001;34:209-19.
13. Rozgaj R, Kasuba V. Chromosome aberrations and micronucleus frequency in anaesthesiology personnel. *Arh Hig Rada Toksikol* 2000;51:361-8.
14. Naccarati A, Molinu S, Mancuso M, Siciliano G, Migliore L. Cytogenetic damage in peripheral lymphocytes of mitochondrial disease patients. *Neurol Sci* 2000;21:963-5.
15. Widel M, Kolosza Z, Jedrus S, Lukaszczyk B, Raczek-Zwierzycka 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.
16. 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.
17. Schmid W. The micronucleus test. *Mutat Res* 1975;31:9-15.
18. Von Ledebur MM, Schmid W. The micronucleus test: Methodological aspects. *Mutat Res* 1973;19:109-17.
19. Heddle JA, Countryman RI. The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* 1976;41:321-32.
20. Högstedt B, Karlsson A. The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used. *Mutat Res* 1985;156:229-32.
21. Eastmond DA, Tucker JD. Identification aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody. *Environ Mol Mutagen* 1989;13:34-43.
22. Fenech M, Morley AA. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios* 1985;43:233-46.
23. 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.
24. 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.
25. Rosin MP, Gilbert AM. Modulation of genotoxic effects in humans: Mutation and the environment. Part E. New York: Wiley-Liss 1990; 51-9.
26. 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.
27. Lehucker-Michel MP, DiGiorgio C, Amara Lehucke -Michel MP, DiGiorgio C, Amara YA, Laget M, et al. The micronucleus assay in human exfoliated urothelial cells: Effects of smoking. *Mutagenesis* 1995;10:329-32.
28. 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. *Envir Mol Mutagen* 1996;27:176-84.
29. Moore LE, Smith AH, Hopenhayn-Rich C, Biggs ML, Kalman D, Smith MT. Micronuclei in exfoliated bladder cells among individuals chronically exposed to arsenic in drinking water. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997; 6:31-6.
30. 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.

31. Rosin MP, Anwar W. Chromosomal damage in urothelial cells from Egyptians with chronic Schistosoma Haematobium infections. *Int J Cancer* 1992;50:539-43.
32. Zamani AG, Durakbaşı HG. Sigaranın bukkal mukoza hücrelerinde, ürotelyal hücrelerde ve periferik kan lenfositlerindeki genotoksik etkileri. Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu Proje Çalışması. Konya 2002.
33. Norppa H, Renzi L, Lindholm C. Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis- blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization. *Mutagenesis* 1993;8:519-25.
34. Meyne J, Littlefield LG, Moyzis RK. Labelling of human centromeres using an alphoid DNA consensus sequence: Application to the scoring of chromosome aberrations. *Mutat Res* 1989;226:75-9.
35. Richard F, Muleris M, Dutrillaux B. The frequency of micronuclei with X chromosome increases with age in human females. *Mutat Res* 1994;316:1-7.
36. Acar H, Çalışkan Ü, Demirel S, Largaespada DA. Micronucleus incidence and their chromosomal origin related to therapy in acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients: Detection by micronucleus and FISH techniques. *Teratog Carcinog Mutagen* 2001;2:341-7.
37. Mavourin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1990;239:29-80.
38. Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: Hollaender A, ed. *Chemical Mutagens, principles and methods for their detection*. Vol.4, New York: Plenum; 1976; pp. 31-53.
39. 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.
40. Yoshida K, Yamazaki H, Ozeki S, Inoue T, Yoshioka Y, Yoneda M, et al. Mitochondrial genotype and radiation-induced micronucleus formation in human osteosarcoma cells in vitro. *Oncol Rep* 2001;3:615-9.
41. Oliveira NG, Castro M, Rodrigues AS, Goncalves 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.
42. Fucic A, Garaj-Vrhovac V, Skara M, Dimitrovic B. X-Rays, microwaves and vinyl chloride monomer: Their clastogenic and aneugenic activity, using the micronucleus assay on human lymphocytes. *Mutat Res* 1992;282:265-71.
43. Jagetia GC, Jacob PS. The influence of vinblastine treatment on the formation of radiation-induced micronuclei in mouse bone marrow. *Hereditas* 1994;120:51-9.
44. Demirel S, Çora T, Acar A, Acar H, Çalışkan Ü, Öner AF, et al. Evaluation of the effects of photo therapy on chromosomes with sister chromatid exchange and micronucleus method. *Tr J Medical Sci* 1993;17:109-16.
45. Çora T, Demirel S, Acar A, Erkul İ. Yenidoğan periferik kan lenfosit kültürlerinde fototerapinin uyardığı mikronükleuslar. *S Ü Tıp Fak Derg* 1992;8:345-51.
46. Acar A, Durakbaşı HG, Paydak F. Alüminyum sülfatın insan periferik kan lenfosit kültürlerinde mikronükleus uyarımı üzerine etkileri. *S Ü Tıp Fak Derg* 1995;11:139-44.