

DENEY NO: 6

KROMOZOMAL HASARIN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN GENOTOKSİSİTE TESTLERİ

A) Genel Bilgi:

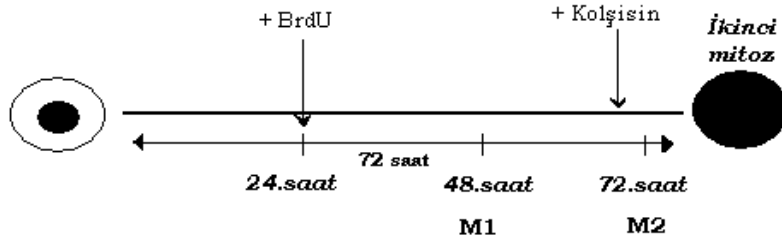
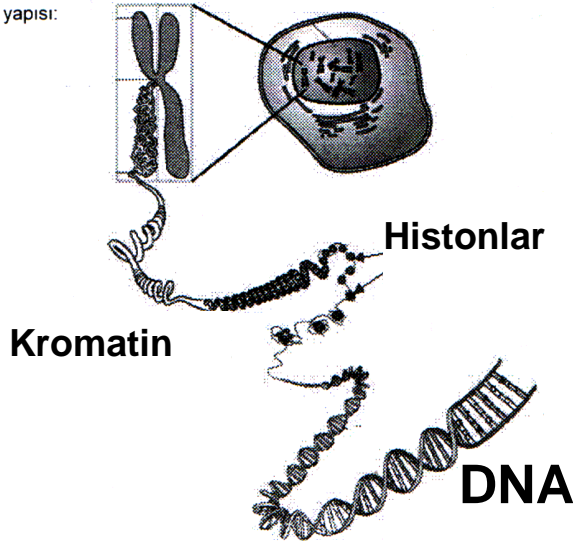
Günümüzde, hücre fonksiyonlarına etki edebilecek birçok kimyasal ve fiziksel ajanla karşılaşmaktadır. Bu ajanlara maruziyette uzun vadede en önemli problemlerden biri genotoksitedir.

Genotoksitesite tayini için, birçok test sistemi geliştirilmiştir. Ancak uygulanabilirliklerinin kolay olması nedeni ile "Kardeş Kromatid Değişimi" (SCE) ve "Mikroçekirdek" (MN) testleri, en yaygın olarak kullanılan testler arasındadır.

1) SCE (Sister Chromatid Exchange, Kardeş Kromatid Değişimi)

SCE, bir kromozomun 2 kardeş kromatidi arasında genetik materyalin değişiminin görülmesi esasına dayanan bir yöntemdir. Kırılan kardeş kromatidlerin yer değiştirmesi, günümüz bilgilerine göre özdeş "locus" lar arasında olması nedeniyle bu testin önemi tartışmalıdır. Ancak herşeye rağmen, genotoksik maddelere maruziyetin belirlenmesinde kullanılan en hassas yöntemlerdendir.

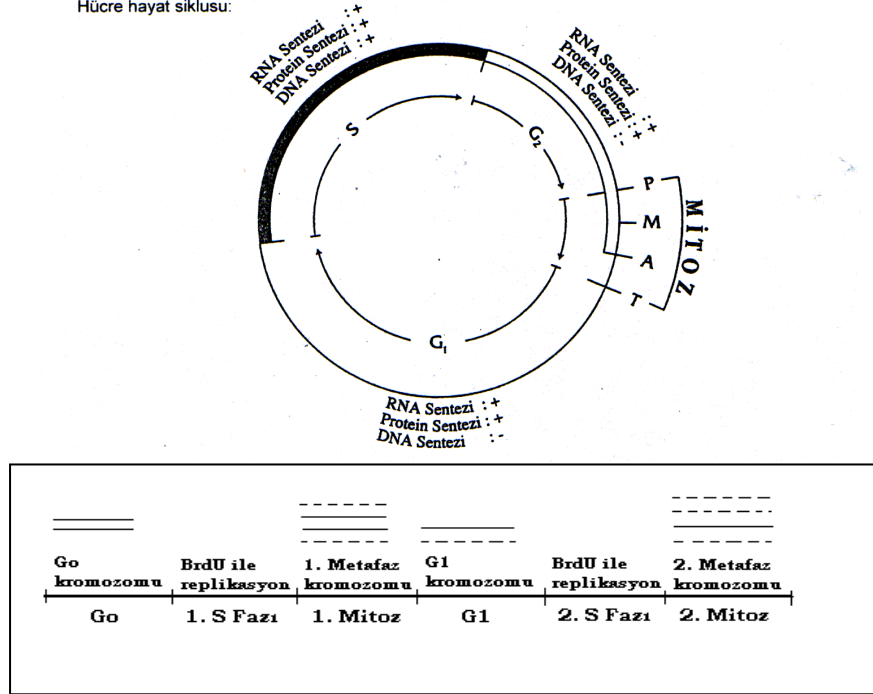
Kromozomun yapısı:



SCE testleri genellikle insan periferal kan lenfositleri ile yapılmaktadır. Periferal lenfositler, hücre siklusunun G₀ fazında iken bunları stimule etmek için aspesifik bir antijen olan *phytohemagglutinin* kullanılarak bölünmeleri sağlanır. Fiksasyondan hemen önce, hücre bölünmesini metafazın 2. mitozunda durdurmak için ise *kolşisin* ilave edilir.

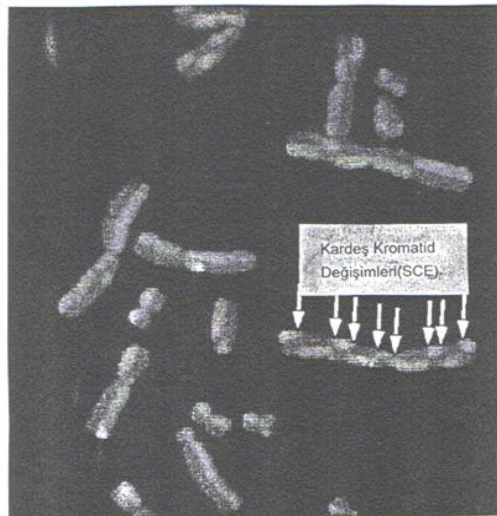
Kromozomlardaki iki kromatidi ayırt edebilmek için, bu kardeş kromatidlerin farklı boyanmaları mümkündür. Bu amaçla, hücre kültürüne, bölünmenin 24. saatinde BrdU (Bromo-deoksi Uridin) katılır. BrdU, bir timin analogudur ve DNA ile birleşebilme özelliği vardır.

Hücre hayat siklusu:



BrdU, kromatidlerin tek bir DNA sarmalının yapısına girmiş ise mikroskopta görülen renk, daha koyu görülecektir. Ancak her 2 DNA sarmalı da BrdU içeriyor ise, renk daha açık olacaktır. Kardeş kromatidlerde bir değişim olmuş ise, yani genotoksik bir maddeye maruz kalınmışsa, koyu koldan bir parça, açık tonda görülen koldaki parça ile yer değiştirecektir.

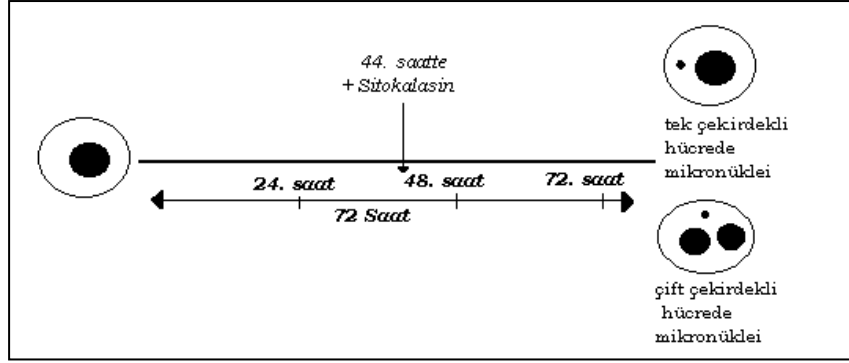
harlequin kromozomlar



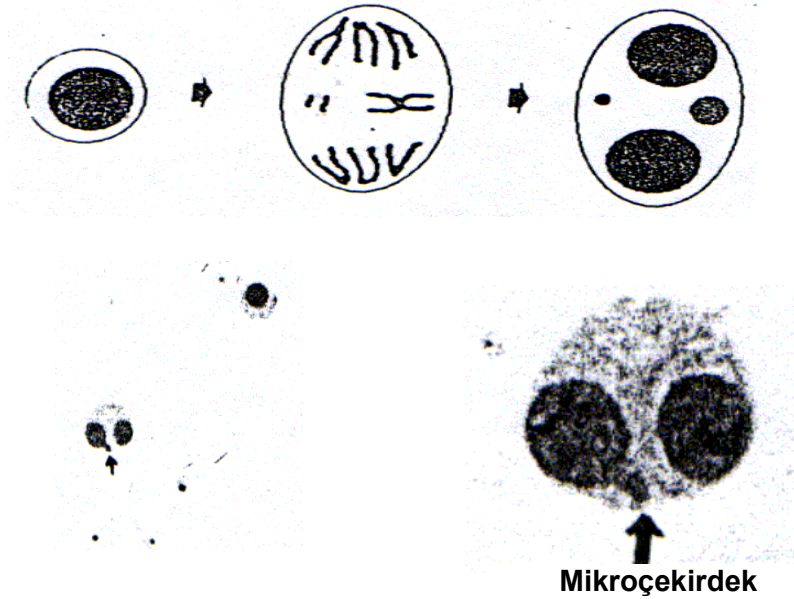
SCE, genotoksik bir maddeye maruz kalınıp kalınmadığını belirlemeye yarayan bir yöntemdir. Çok duyarlı bir testtir, çok küçük oranlardaki maruziyeti bile tespit edebilmesi büyük bir avantajdır, fakat mutajenite hakkında belirleyici bir sonuç vermemektedir. Bir numunede "SCE/hücre"nin yüksek çıkması, o bireyin kanser olacağını göstermeye yetmemekle birlikte her kanser vakasında "SCE/hücre" yüksek çıkmaktadır. Bu da, DNA'nın kendini onarma yeteneği ile açıklanabilir.

2) MN (Mikronucleus, Mikroçekirdek)

MN, bölünmekte olan hücrenin çekirdeğinden kopan kromozom parçalarının veya tam kromozomların görülmesine dayanan bir yöntemdir.



MN testleri, genellikle insan periferik kan lenfositleri ile yapılmaktadır. Hücrelerin bölünmesini stimüle etmek amacıyla *phytohemagglutinin* kullanılır. Normal şartlarda hücre bölünürken, önce çekirdek bölünmesi gerçekleşir; daha sonra sitoplazma bölünerek iki hücre oluşur. Sitokalsin, sitoplazma bölünmesi aşamasında bu bölünmeyi engelleyerek tek bir sitoplazma içinde 2 çekirdek görülmesini sağlar, çekirdekten kopma var ise bu mikroçekirdeğin görülmesine olanak verir.



MN, SCE'ye oranla daha belirleyici sonuç vermektedir, ancak SCE kadar duyarlı bir yöntem değildir.

B) Deneyin Yapılışı:

1)SCE:

İnkübasyon:

Deney tüplerine kan numunesi, FCS içeren bir kültür ortamı ve phytohemaglutinin konur. 37°C'lik etüvde inkübe edilir. 24. saatte BrdU ilave edilir. 68. saatte kolşisin ilave edilir. 72. saatte hücre ve kültür ortamı santrifüj edilir. Süpernatant atılır. Bu aşamaya kadar olan işlemlerin tamamı, steril koşullarda yapılır.

Fiksasyon:

1. Hücreler hipotonik KCl ile muamele edilir.
2. Tüpler santrifüj edilir, süpernatant atılır.
3. Tüpler çalkalanırken, Carnoy's çözeltisi (glasiyal asetik asit : metanol, 1:3) ilavesi ile fiksasyon yapılır.
4. Tüpler santrifüj edilir, süpernatant atılır.
5. Carnoy's çözeltisi ile fiksasyon yapılır.
6. Tüpler santrifüj edilir, süpernatant atılır.
7. Temiz lamlar üzerine hücre süspansiyonu yüksek bir mesafeden damlatılarak slaytlar hazırlanır.

Boyama: Hoechst ve Giemsa yardımı ile lamlar boyanır ve mikroskopta incelenmek üzere kurutulur. Mikroskopta kırılmalar sayılır.

Değerlendirme: Her bir birey için "ortalama SCE/ hücre" değeri hesaplanır. Bu değer, kontrol grubu değerinden yüksek ise bu durum; kişinin genetik materyali (DNA) etkileyebilen bir kimyasal maddeye maruz kaldığını gösterir.

2)MN:

İnkübasyon:

Deney tüplerine kan numunesi, FCS içeren bir kültür ortamı ve phytohemaglutinin konur. 37°C'lik etüvde inkübe edilir. 44. saatte her bir tüpe sitokalsin-B ilave edilir. 72. saatte tüpler etüvden alınır, hücre ve kültür ortamı santrifüj edilir. Süpernatant atılır. Bu aşamaya kadar olan işlemlerin tamamı, steril koşullarda yapılır.

Fiksasyon:

1. Hücreler hipotonik KCl ile muamele edilir.
2. Tüpler santrifüj edilir, süpernatant atılır.
3. Tüpler çalkalanırken, Carnoy's çözeltisi (glasiyal asetik asit:metanol, 1:3) ilavesi ile fiksasyon yapılır.
4. Tüpler santrifüj edilir, süpernatant atılır.
5. Carnoy's çözeltisi ile fiksasyon yapılır.
6. Tüpler santrifüj edilir, süpernatant atılır.
7. Temiz lamlar üzerine 3-5 damla supernatant damlatılır ve yayılarak slaytlar hazırlanır.

Boyama: May-Grünvald Giemsa çözeltisi yardımı ile lamlar boyanır ve mikroskopta incelenmek üzere kurutulur. Mikroskopta mikroçekirdekler sayılır.

Değerlendirme: Her bir birey için 1000 adet çift çekirdekli hücrelerdeki mikroçekirdek sayısı belirlenir. Elde edilen sayı, kontrol grubu değerinden yüksek ise; genetik materyali (DNA) etkileyebilen bir kimyasal maddeye maruz kaldığı sonucuna varılır.