

N-Nitrosopirolidin (NPYR)'in Farelerde Sitogenetik Etkileri

Mehmet KORKMAZ

Balıkesir Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu, 10100, Balıkesir-TÜRKİYE

Ahmet ÇOLAK

Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.B.D., Sivas-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 14.08.1997

Özet: N-Nitrosopirolidinin (Npyr) genotoksik aktivitesini değerlendirmek için, in vivo olarak fare kromozomlarına ve mikroçekirdek indüksiyonuna etkileri araştırılmıştır. Kromozom analizi için eşey ayrımı yapılmadan 10-12 haftalık 20, mikroçekirdek testi için ise 8-10 haftalık 40 erkek fare (*Mus musculus var. albinos*) kullanılmıştır. Npyr farelere serum fizyolojik ile seyrettilerek 3 doz düzeyinde (100, 200 ve 300 mg/kg) tekli enjeksiyonla, intraperitoneal yolla verilmiştir. Kemik iliği 24 ve 48 saatlik enjeksiyon sonrasında örneklenmiştir. Fare kemik iliği metafaz kromozomlarının (24 saat) incelenmesi sonucunda; 100, 200 ve 300 mg/kg'lık dozların uygulanması ile kırık ve gap yönünden kontrole karşı gruplararası farklılık önemli bulunmuştur ($p<0.05$). Ancak kontrol ile telomerden birleşme açısından 100 ve 200 mg/kg'lık dozlarda gruplararası farklılık önemsiz ($P>0.005$), 300 mg/kg'lık doz uygulama sonucunda ise önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Npyr 24 ve 48 saatlik örnekleme zamanlarının tüm dozlarında test edilerek, Mikroçekirdekli Polikromatik Eritrositler (MPCE)'in sayısında doza-bağımlı artış belirlenmiştir. Bütün dozlarda MPCE'lerin sayısındaki artışlar istatistiksel olarak da önemlidir ($P<0.05$). Bulgularımız Npyr'nin genotoksik aktivitesinin olduğunu göstermektedir. Diğer yandan sayısal artış yönünden kromozom kırıkları ile MPCE'lerin paralellik göstermesi, iki yöntem arasında belirli bir temel ilişkinin varlığına işaret etmektedir.

Anahtar Sözcükler: N-Nitrosopirolidin, Kromozom Anomalileri, Mikroçekirdek.

The Cytogenetic Effects of NPYR on Mice

Özet: The effects of N-nitrosopyrrolidine (NPYR) on mice chromosomes and micronucleus induction were investigated in order to evaluate its genotoxic effects. Twenty 10-12 week old mice and 40 8-10 week old male mice (*Mus musculus var. albinos*) were used for chromosome analysis without sex discrimination and micronucleus tests respectively. Mice were intraperitoneally treated in single injections with three dose levels (100, 200 and 300 mg/kg) of NPYR with isotonic saline as the solvent vehicle. Bone marrow was sampled at 24 and 48 h postinjection. Examination of the mice bone marrow chromosomes at the metaphase (24 h) showed that in terms of break and gap, there was an important difference ($P<0.05$) between groups of the drug doses 100, 200, 300 mg/kg when compared with the controls. In terms of joined telomers, the 100 and 200 mg/kg dosages were not significant ($P>0.005$), whereas, 300 mg/kg dosage was significant ($P<0.05$) when compared with the controls. NPYR resulted in a significant dose-related increase in the number of micronucleated

polychromatic erythrocytes (MPCE) at the 24 and 48 h sampling time for all doses tested. All dosages also induced statistically significant increases ($P<0.05$) in the number of MPCEs. Overall, our study showed that NPYR had genotoxic activity. On the other hand, the correlation between increased number of chromosomal breaks and MPCEs supported the presence of an important relationship between the two tests.

Key Words: N-nitrosopyrrolidine, Chromosomal aberrations, Micronuclei

Giriş

Npyr'nin kanserojenik bir madde olduğunu belgeleyen bir çok çalışma yapılmıştır. Günümüzde N-Nitrosoprolidin (Npyr) in çevrede ve tüketilen maddelerde, özellikle sigara dumanında ve önceden baharat katkılı pişirilmiş etlerde bulunabilmektedir. Kısaca insan çevresi kontaminantı (bulaştırıcısı) olarak bilinmektedir (1-4). Npyr rat karaciğerine fare ve hamster akciğerine karşı karsinojenik ve hepatotoksiktir (5, 6).

Nitrozaminlerin en önemli öncülleri nitrat ve nitrittir (7). Nitrat ve nitrit belirli bir peryotta nitrazinleri oluşturmak üzere ikincil aminlerle tepkimeye girer ve oluşan nitrozamin türevleri organizmada kanserojenik etki gösterebilmektedir (8, 9). Npyr'de siklik bir nitrozamindir (10).

Mutajenik genotoksik kimyasalları belirlemek amacıyla bir çok kısa süreli testler (Short-Term Test: STTs) geliştirilmiştir. Kansere neden olan ajanların bir çoğu mutajenik olduğundan ve mutasyonlar kanser oluşumunun başlamasıyla ilgili olabileceğinden, bir çok in vivo ve in vitro STTs'ler kanserojenik kimyasalları önceden haber verici olarak kullanılmaktadır (11-14). Ancak kanserojenleri belirleyici STTs'lerin sonuçları tartışmalıdır (15, 16).

Bilinen bazı kanserojenlerin, değişik laboratuvarlarda yapılan testlerden; birinde pozitif reaksiyon verdiği halde diğerinde negatif reaksiyon gözlenmiştir. Örneğin "4-Nitroquinolone-N-oxide" ile yapılan mikroçekirdek testi çalışmaları negatif sonuç vermiş ancak kromozom aberasyonu çalışmalarında, pozitif sonuç vermiştir (17-19). Bunun yanında "2-Acetylaminofluorene" de olduğu gibi her iki teste de pozitif reaksiyon veren kanserojenler de belirlenebilmiştir (20).

Yapılan kaynak taramasında; Npyr'nin STTs'lerden in vivo kromozom düzensizlikleri ve mikroçekirdek testi ile etkilerinin incelenmesiyle ilgili yayınların bulunmaması dikkat çekiciydi. Çalışma Npyr'nin hem fare metafaz kromozomları hem de mikroçekirdek testi ile genotoksik etkilerinin olup olmadığı ve her iki test arasında ki bağlantının incelenmesi amacıyla düzenlenmiştir.

Gereç ve Yöntem

Çalışmada Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarından sağlanan 60 adet İsviçre beyaz fareleri (*Mus musculus var. albinos*) kullanılmıştır. Mikroçekirdek testinde kullanılan 40 adet erkek farenin 8-10 haftalık olmasına dikkat edilmiştir. Kromozom çalışmalarda 10,12 haftalık 25-30 gr ağırlığında 20 adet fare kullanılmıştır (21).

Pratik olarak seçilebilen doz yöntemi temel alınmıştır (22). Bu amaçla, Çetinkaya'nın asıl çalışmasına ek olarak ön çalışmayla belirlediği LD₅₀ dozuna bağlı olarak 360 mg/kg'lık LD₃₀ dozu göz önünde tutulmuştur (23). Örnekleme doz aralıkları 100 mg/kg, 200 mg/kg ve 300 mg/kg olarak düzenlenmiştir. Kromozom çalışmalarında 24 saatlik örnekleme zamanı kullanılmıştır (24). Mikroçekerdek testinde ise 24 ve 48 saatlik örnekleme aralıkları düzenlenmiştir (21, 22).

Npyr serum fizyolojik fare ağırlıklarına göre, 0.1 ml'te 100 mg/kg olacak şekilde seyreltilerek 0.1-0.3 ml arasında intraperitoneal yolla enjekte edildi. Kromozom çalışmalarında kontrol grubu 5 olmak üzere her doz grubu için 5'er fare kullanıldı. Yine peritoneal yolla 23. saatte kolşisin 4 mg/g dozunda 0.1 ml hacimde uygulandı. Mikroçekerdek testi çalışmalarında da 24 ve 48 saatlik örnekleme zamanları için ayrı ayrı 5 kontrol faresi ve doz seviyelerine göre de 5'er fare kullanılmıştır. Çalışmada yer alan bütün kontrol gruplarına intraperitoneal yolla sadece serum fizyolojik enjekte edilmiştir. Kemik iliğinden kromozom preparatı hazırlama yöntemi, Preston ve arkadaşlarından modifiye edilerek hazırlandı (24). Aynı materyalden mikroçekerdek testi için, Schmid yöntemi temel alındı (25).

Mikroskopta orta büyütmede (40X10), preparatların uygun kalitedeki bölgeleri belirlendi ve rastgele kodlandı. Npyr uygulanan fareler ile kontrol grubu farelerden sağlanan metafaz örneklerinden, her fare için 100 metafaz değerlendirildi. Kromozom yapı anomalileri belirlendi. Her hayvan için çökelti durumuna göre hazırlanan 3-5'er adet preparatlardan 100X10 büyütme ile 1000 polikromatik eritrosit sayılarak, mikroçekerdekli hücrelerin sayısı belirlenmiştir. Ayrıca buna bağlı olarak sitotoksite kontrolü ve doz-yanıt etkisini belirlemek için normokromatik eritrositlerde sayılmıştır. Mikroçekerdeklerin tanısı, Schmid'e göre yapılmıştır (25).

Elde edilen veriler "Yüzde Arasındaki Farkın Önemlilik Testi" (*t* testi) ile değerlendirildi. Mikroçekerdek testi için Kruskal-Wallis analizine göre değerlendirilmesi yapıldı ve grup ortamları ikişerli olarak Tukey yöntemine göre karşılaştırıldı (26).

Bulgular

Serum fizyolojiktan 0.1 ml verilen kontrol grubu farelerin kromozomları 2n=40 olarak belirlenmiş ve hepsinin da akrosentrik oldukları saptanmıştır (Şekil 1).

Npyr uygulanan farelerin kromozomlarında kırık, gap ve telomerden birleşme gibi yapısal düzensizlikler görülmüştür (Tablo 1). Kontrol grubu ile 100, 200, 300 mg/kg'lık dozların; toplam anomalili hücre sayısı yönünden karşılaştırılmasında, gruplar arası farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($t=2.75$, $t=3.92$, $t=5.45$, $P<0.05$). Deney grubu farelerden elde edilen metafaz kromozomlarındaki kırık yapı Şekil 2'de gap yapı Şekil 3'te ve telomerden birleşme ise Şekil 4'te gösterilmektedir. Kırık ve gap yapısı yönünden dozlarla kontrol grubu arasındaki fark önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Telomerden birleşmede 100 ve 200 mg/kg'lık dozlarda önemsiz ($t=0.58$, $t=1.92$, $P<0.005$), 300 mg/kg'lık dozda ise fark önemli bulunmuştur ($t=2.29$, $P<0.05$).

Fare kemik iliğinde Npyr'nin indüklediği mikroçekerdek sayıları ve grup ortamlarını gösteren istatistiksel değerlendirmeler Tablo 2'de gösterilmiştir. 24. saatte 1000 polikromatik eritrositteki

Tablo 1. Npyr Uygulamasından 24 saat sonra fare kemik iliğindeki kromozom anomalilerinin frekansı.

NPYR Dozlar (mg/kg)	Toplam Anomalili Hücre						Ortalama± Standart H.	A	B	C	Toplam Yapısal Anomali S.
		1	2	3	4	5					
0	3	0	1	0	1	1	0.6±0.24	2	0**	1	3
100	14*	2	2	4	3	3	2.8±0.37	10*	4**	2**	16*
200	22*	5	5	3	5	4	4.4±0.4	18*	5**	6**	29*
300	33*	5	7	8	7	6	6.6±0.51	31*	8**	11*	50*

1,2,3,4,5: bireysel hayvan verileri

A: KIRIK

* : P<0.05, kontrole aradaki fark önemli.

B: GAP

** : P>0.05, kontrole aradaki fark önemsiz

C: TELOMERDEN BİRLEŞME

MPCE (Mikroçekirdekli polikromatik eritrosit) sayısı karşılaştırıldığında; Gruplar arası farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. (KW=16.1, P<0.05). Daha sonra Tukey yöntemine göre grup ortamları ikiyeşerli olarak karşılaştırıldığında; kontrol ile 100 mg/kg'lık doz, kontrol ile 200 mg/kg'lık doz, kontrol ile 300 mg/kg'lık doz arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. 48. saat de aynı karşılaştırma yapıldığında gruplar arası farklılık önemli bulunmuştur (KW= 16.9, P<0.05). Ardından grup ortamları Tukey yöntemine göre ikiyeşerli olarak karşılaştırıldığında; kontrol ile 100 mg/kg'lık doz arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz (P>0.005), kontrol ile 200 mg/kg ve 300 mg/kg'lık doz arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0.05). 24 ve 48.nci saatlerde hücrelerden elde edilen tekli ya da ikili MPCE'leri Şekil 5 de görebilmek olanaklıdır. Kemik iliğinde doz-yanıt ilişkisi ve sitotoksite kontrolü için, kontrol grubu ve tüm doz gruplarının PCE/NCE oranları Tablo 2'de gösterilmiştir. Bu değerlerin incelenmesi sonucu, kontrol gruplarına göre doz gruplarında NCE'ler yönünde artış olduğu fark edilmiştir. Özellikle 24 saatlik uygulama sonrası 300 mg/kg'lık dozda PCE/NCE oranı 0.754 olarak belirlenerek, en yüksek sitotoksite bu grup da ortaya çıkmıştır.

Npyr'nin indüklediği yapısal kromozom anomalilerinin sayıları ile mikroçekirdek sayılarının karşılaştırılması amacıyla Tablo 1 ve Tablo 2'deki verileri doğrultusunda grafik (Şekil 6) oluşturulmuştur. Bu şekilde dozlara bağımlı olarak değişkenlik gösteren MPCE ile metafaz kırıkları arasında oldukça paralellik görülmüştür. Buna karşın, gap ve telomerden birleşme ile MPCE sayıları arasında aynı düzeyde benzerlik bulunamamıştır.

Tartışma ve Sonuç

Npyr sitogenetik yönden yapısal kromozom anomalileri ve mikroçekirdek indüksiyonu açısından incelenmiştir. Kromozom anomalileri yönünden kırık ve gap frekansı kontrole göre anlamlı çıkmıştır (P<0.05). Ek bir bulgu olarak değerlendirilen telomerden birleşme, yalnızca 300 mg/kg'lık doz uygulaması sonucu kontrole göre önemli çıkmıştır (P<0.05). Şekil 6 Tablo 1 incelenecek olursa kırık insidansına bağlı olarak telomerden birleşmenin arttığı görülebilir.

Tablo 2. 24 ve 48.nci Saatlerde Sağlanan 1000PCE deki MPCE Sayısı ve PCE/NCE Oranları ile İstatistiksel Tablosu.

ZAMAN	DOZ (mg/kg)	N*	M	P	C	E	Ortalama					PCE/NCE					Ortalama S.H.±	GRUPLAR	N	24.SAAT X±SX	48.SAAT X±SX
							S.H.±					S.H.±									
							1**	2	3	4	5	1**	2	3	4	5					
24 SAAT	0	5	2	0	3	1	1	1.4±0.51	0.90	0.97	1.02	1.05	0.93	0.974±0.027	Kontrol	5	1.4±0.51	1.2±0.37			
	100	5	3	5	8	6	3	5.0±0.95	0.82	0.94	0.88	1.01	0.99	0.928±0.035	100	5	5.0±0.95	3.4±0.75			
	200	5	7	5	14	12	8	9.2±1.65	0.95	0.97	0.84	0.91	0.98	0.930±0.025	200	5	9.2±1.65	8.2±1.24			
	300	5	21	16	13	18	14	16.4±1.44	0.72	0.71	0.79	0.85	0.70	0.754±0.028	300	5	16.4±1.44	17.2±1.39			
	0	5	1	2	0	1	2	1.2±0.37	0.98	1.02	1.00	0.91	1.05	0.992±0.052							
48 SAAT	100	5	6	2	2	3	4	3.4±0.75	0.97	0.94	1.01	0.90	0.95	0.954±0.018	KARAR		KW=16.105	KW=16.89			
	200	5	5	9	6	12	9	8.2±1.24	0.99	1.00	0.92	0.97	0.93	0.962±0.015			P<0.05	P<0.05			
	300	5	13	20	20	15	18	17.2±1.39	0.91	0.87	0.93	0.96	0.95	0.924±0.016							

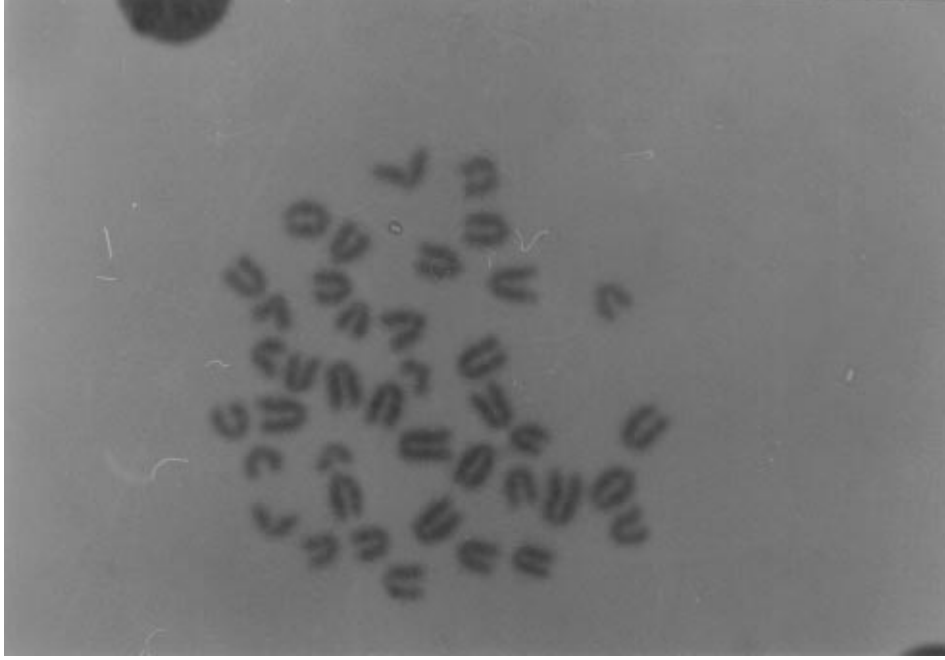
(*) : Hayvan sayısı

(**) : Bireysel hayvan verileri

Npyr ile yapılan deneylere, rat ve hamsterlerde hedef organ olarak karaciğer belirlenmiş, diğer organ ve dokularda da belli ölçülerde bulunduğu saptanmıştır (27, 28). Ancak kemik iliğine ne derecede bağlandığı ya da etki ettiği konusunda her hangi bir çalışma bulunmamaktadır. Dolayısıyla genotoksik etkinin de buna bağlı olarak artıp azalabileceği düşünülebilir.

Kromozomlardaki en küçük bir değişikliğin bile oldukça büyük riskler ortaya çıkarabileceği bir gerçektir. Npyr ile oluşan kırıkların, genelde sentromere yakın hatta bitişik bölgelerde olduğu gözlenmiştir. Hunt ve Shank, Npyr'nin DNA etkileşimi üzerine yaptığı araştırmada, Guanin bazına eklenti yaparak (2-amino-6, 7, 8, 9-tetra-hydro-9-hidroxyprido 2.1-f purine-4 (3H)-1) oluşturduğunu bulmuşlardır (28). Bu DNA ürünü ya da oluşumu (DNA adduct) Npyr'nin doz yüksekliğine bağlı olarak nükleik asitlerde 7, 8 pridoguanini stabilize ettiğini ve DNA onarımını engellediğini bildirmektedir. DNA'nın yanı sıra RNA'larda aynı oluşumun, DNA'lara oranla daha yüksek bulunması, protein sentezi işlergesini azalttığı ya da durdurduğunu tespit etmişlerdir (28). Bilindiği üzere kromozomlar nükleik asit ve protein bileşiminden oluşmaktadır. Gerek DNA onarımının engellenmesi, gerekse protein sentezinde azalma veya duraklama, kromozomlarda oluşan kırık ve gap yapınının temeli olabilir.

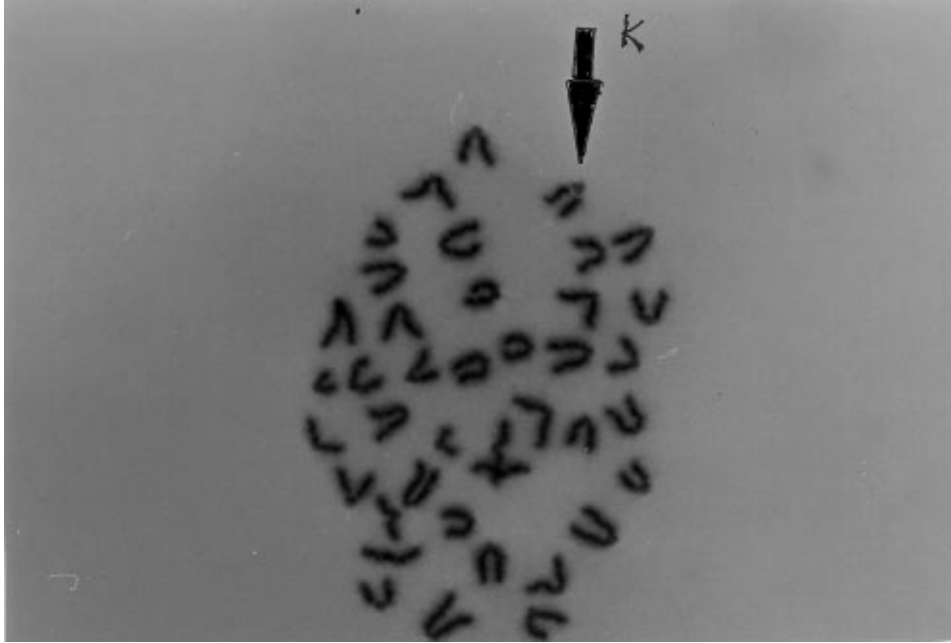
Npyr sonucu DNA ve RNA da oluşan guanin bazına bağlı ürünün mutajenik potansiyele sahip olduğu sonucuna varılmıştır (28, 29). Bu durum Npyr'nin karsinojenitesi için bir aksiyon mekanizması olarak kabul edilmektedir. Mutasyon'nun temelinde metilasyon mekanizmasının olabileceği ileri sürülmekte ve şu öneri yapılmaktadır: Npyr'ye bağlı olarak DNA da oluşan ürünün, replikasyonu izleyen metilasyonu devamını değiştirebilecektir (28).



Şekil 1. Kontrol grubu farelerden elde edilen metafaz örneği (2n=40).

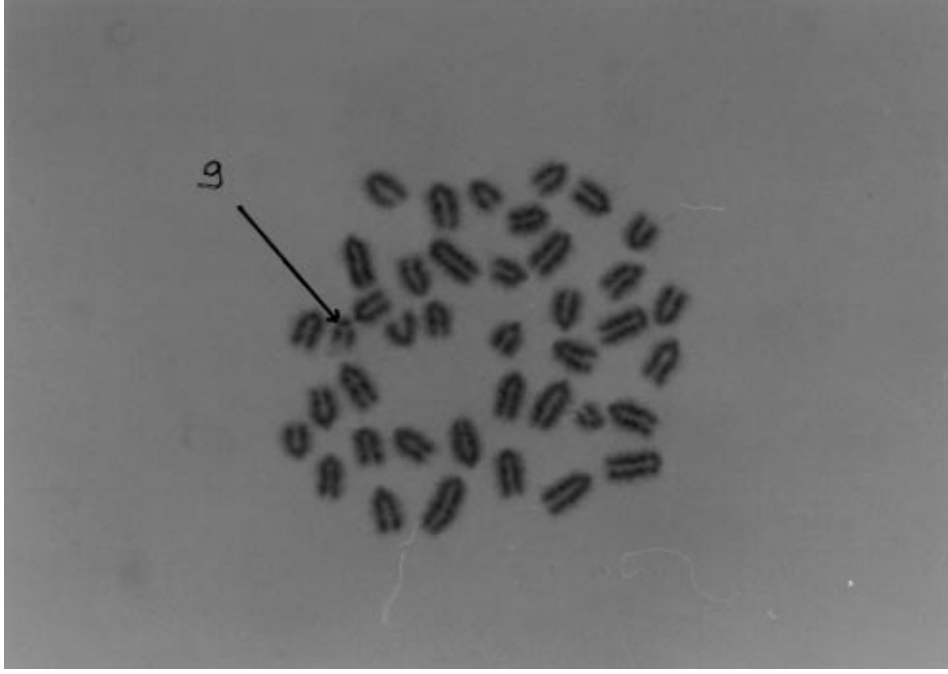
24 saatlik örnekleme sonunda 1000 PCE'ye karşılık gelen ortalama MPCE sayısı önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Daha sonra Tukey yöntemine göre kontrol grubu ile gruplar ikişerli karşılaştırıldığında da fark önemli çıkmıştır ($P<0.05$), (26).

48 saatlik uygulama, yine aynı dozlarla gerçekleştirilmiştir. 1000 PCE'ye karşılık gelen ortalama MPCE değerleri önemli çıkmıştır ($P<0.05$). Daha sonra Tukey yöntemine göre grup ortamları kontrol değeri ile ikişerli karşılaştırıldığında da sadece 100 mg/kg'lık uygulama sonrası elde edilen 3.4'lük MPCE değeri kontrole göre önemsiz ($P>0.05$), diğer grupların karşılaştırılması sonucu ise önemli çıkmıştır ($P<0.05$). Şekil 6 ortak grafikte dozlardaki artışa paralel olarak MPCE sayısının da arttığı rahatça gözlenebilir. Ancak 24. saatteki 100 mg/kg ve 200 mg/kg'lık doz uygulamasıyla elde edilen MPCE miktarına göre, 48. saatte 100 ve 200 mg/kg'lık dozlarda elde edilen MPCE miktarı göreceli olarak azalmıştır. Diğer taraftan 300 mg/kg'lık dozda ise 48. saatte elde edilen MPCE sayısı da 24. saatte aynı dozda elde edilen MPCE sayısına göre daha fazla olduğu grafikte görülebilmektedir. Mikroçekirdek testlerin de kontrol ve deney gruplarından elde edilebilecek MPCE sayısı açısından çeşitli araştırmacılar tarafından ölçütleri sürülmüştür. Schmid'e göre, MPCE sayısı kontrol grupların da %0.5 altında, deney gruplarında ise %8 aşmaması gerektiği yönündedir (25). Mac Gregor ve arkadaşları 1000 PCE'deki MPCE sayısının en fazla 1-2 arasında olabileceğini ileri sürmüşlerdir (22). Bizim bulgularımız iki ölçüte görede uygunluk göstermektedir.



Şekil 2. Deney grubu farelerden elde edilen kırık yapı gösteren metafaz sahası ($2n=40$, $k=kırık$).

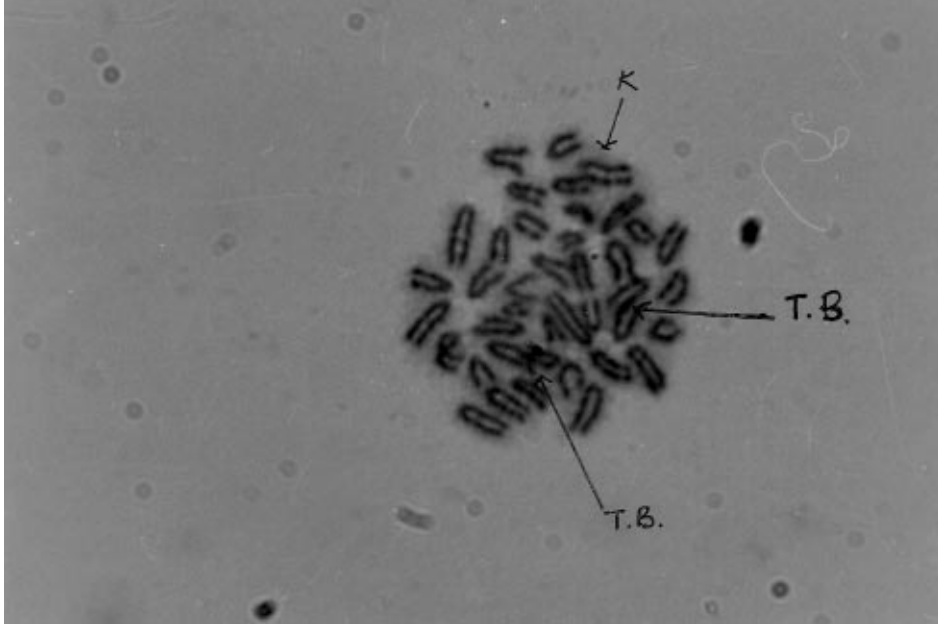
Tablo 2 değerlerimizde doz-yanıt ilişkisi ve sitotoksite kontrolü için PCE'lerin yanısıra NCE'ler de sayılarak PCE/NCE oranlarına yer verilmiştir. Normal olarak PCE/NCE oranı 1:1 dir. Kontrol grubu PCE/NCE oranlarımız 1:1 değerine yakın değerlerdir. Ancak deney grubunda kontrol grubu da dikkate alındığında bir değerinden düşük değerler bulunmuştur. Anlaşılacağı gibi NCE'ler yönünde bir artış söz konusudur. Özellikle 24 saatlik örnekleme sonucunda 300 mg/kg'lık dozda PCE/NCE oranı 0.754 çıkmıştır. Olayın temelinde mitotik bölünme sırasında S fazına etki bulunmaktadır (21). Eğer PCE'ler yönünde bir artış görülmüş olsaydı S fazını indükleyici bir durum söz konusu olacaktı, fakat bizim bulgularımız NCE'lerin artışı yönünde ve S fazında inhibisyonu belirlemektedir. Ancak Npyr'nin 48 saatlik 300 mg/kg'lık doz uygulaması sonucu PCE/NCE oranı 0.924 olarak belirlenmiştir. Bu 48.nci saat 0.992'lik PCE/NCE kontrol grubu değerimize daha yakındır. Farkedileceği üzere Npyr'nin uygulama süresi arttıkça etkinliğinin azaldığı görülebilmektedir. Npyr ile yapılan çalışmalarda; Npyr'nin DNA da guanin bazına bağımlı olarak oluşturduğu ürünün (adduct) fare, hamster ve ratlarda 12 ve 36. saatler arasında özellikle 24. saatte maksimum düzeyde olduğu görülmüştür. 96. saatin sonunda ise azalarak normal düzeyine indiği tespit edilmiştir (28). Diğer taraftan Çetinkaya karaciğer Na^+/K^+ -ATPase enzimine Npyr'nin etkilerini incelediği çalışmasında; başlangıçta %22 inhibisyon gözlemesine karşın 96. saatin sonunda enzimin normal çalışma düzeyini yakaladığını bildirmektedir (23). Her iki çalışmadan da elde edilen sonuçlar, bizim verilemize uyarlandığında tek doz verilmesi koşuluyla genotoksik etkinin süre uzamasına paralel olarak azaldığını söyleyebiliriz. Ancak bütün bu yaklaşımların ve bulguların yeni çalışmalarla, özellikle kemik iliği



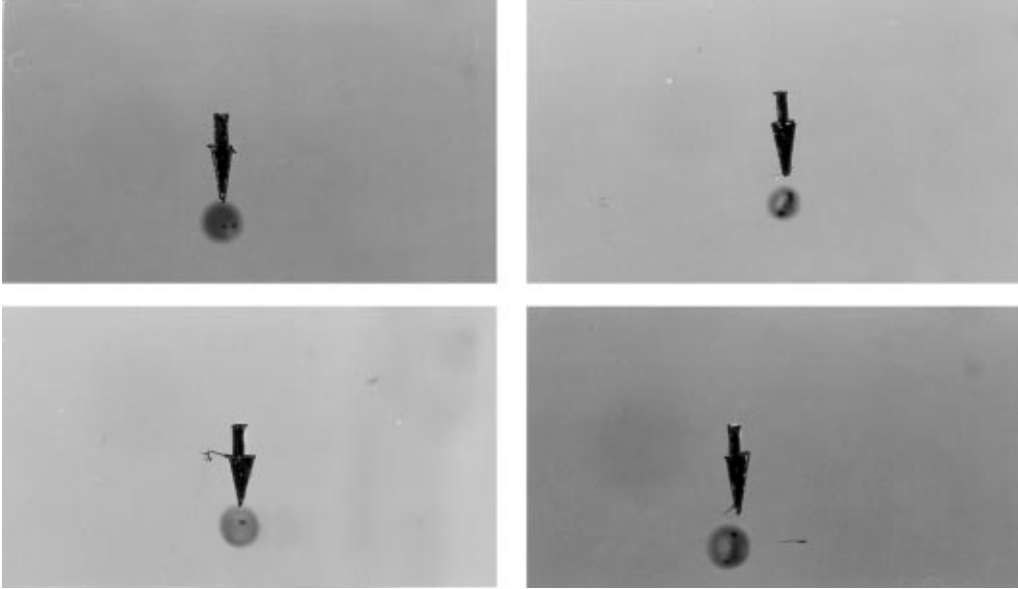
Şekil 3. Deney grubu farelerden elde edilen Gap yapı gösteren metafaz sahası ($2n=40$, $g=gap$).

Npyr bağlanma düzeyinin belirlenmesine gereksinim duymakta ve desteklenmesi gereğini ortaya çıkarmaktadır. Npyr ile ilgili çalışmaların daha çok deney hayvanlarında iç organlara (akciğer, karaciğer, böbrek v.b.) bağımlı olarak gerçekleştirilmiştir. İç organlarda bile Npyr'nin etki düzeyleri çok farklı görülmüş, hedef organ olarak karaciğer ileri sürülmüştür (27, 28). Aslında bütün bu bilgiler ışığı altında, bu maddenin sekonder kanserojenler (prokanserojenler) grubunda bulunduğunu rahatlıkla söyleyebiliriz. Çünkü prokanserojenik özellik gösteren maddelerin etkisi; metabolik aktivasyonu yürüten enzimlerde organizma, organ ve dokulara göre nitelik ve nicelik farklılıkları gösterdiklerinden, enzim aktivitelerine paralel olarak farklı organizmalarda veya aynı organizmanın farklı organlarında farklı etkiler gösterecektir (30). Npyr bu açıdan da irdelendiğinde kemik iliği ile bağlantılı biyokimyasal, histokimyasal ve diğer disiplinlerin çalışmalarına gereksinim duymaktadır.

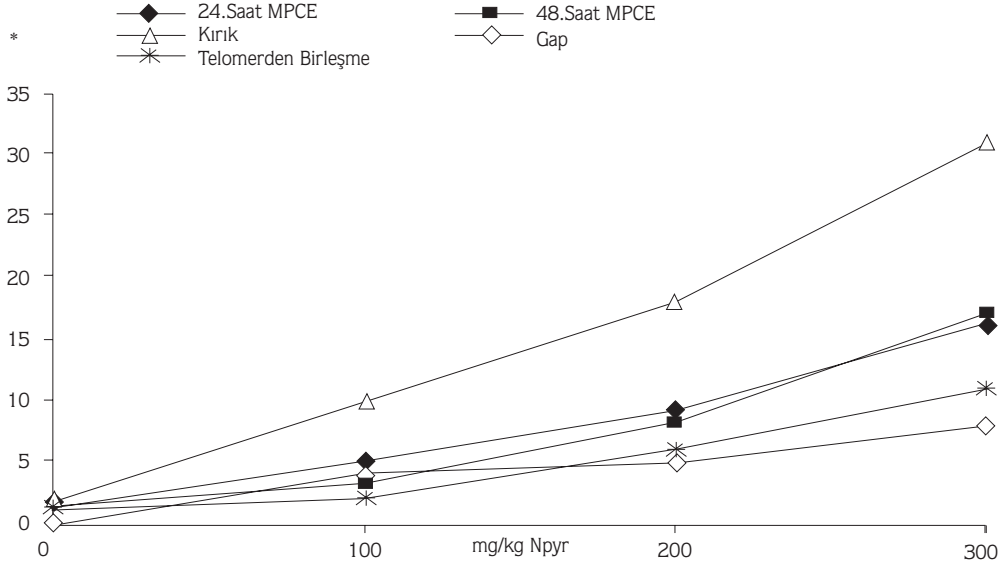
Mikroçekirdek oluşu temelinin anafazda geri kalan kromozomlar ya da asentrik kromozomlardan kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda hep bu yönde bulgular edinilmesine karşın konu tartışılmalıdır (22, 25, 31, 32). Eğer mutajenik ve kanserojenik olduğu düşünülen maddelerin asentrik kromozom fragmentlerine ve anafazda kromozomların geri kalmasına yol açmıyorsa, mikroçekirdek indüksiyonu gerçekleşmeyecektir. Buna karşın bu madde kromozomlar üzerinde gap, disentrik ve dengeli translokasyonlar gibi yapısal düzensizliklere neden olabilir. Bu açıdan mikroçekirdek testinin sonucu negatif



Şekil 4. Deney grubu farelerde görülen "Telomerden Birleşme" ($2n=40$, T.B.=Telomerden Birleşme) (K=Kıvrık).



Şekil 5. Deney grubu tekli ve ikili MPCE'lerden görünüm. May-Greunwald-Giemsma 1000X.



Şekil 6. Dozlara göre Kırık, Gap, Telomerden Birleşme sayıları ile 24 ve 48. saatlerin sonunda meydana gelen ortalama MPCE sayılarının karşılaştırılması.
*Kırık, Gap, Telomerden Birleşme sayıları her doz grubundan incelenen 500 metafazdan, MPCE sayıları her doz grubuna karşılık gelen ortalama sayıdan oluşmaktadır.

olduğunda, mutlak surette metafaz analizine gerek duyulmaktadır. Görüldüğü gibi tek başına mikroçekirdek testi yeterli olmayabilmektedir. Bu çalışmada da kromozom analizinde kırık yapıların (asenterik kromozom fragmentleri) yanısıra gap ve telomerden birleşme yapıları dikkate alınmıştır.

Tablo değerlerimizle birlikte Şekil 6 incelenecek olursa 24 ve 48. nci saatlerde Npyr'nin metafaz kırık sayıları ile MPCE sayılarının paralel bir artış gösterdiği görülebilir. Ancak aynı paralellik gap ve telomerden birleşme yapıları ile 24 ve 48. nci saat MPCE sayıları arasında görülememektedir. Npyr ile çalışmamız sonucu görülen MPCE'in dozlara bağlı sayısal artışın büyük bir kısmının kromozom kırıklarının oluşumu sonucu gerçekleştiği yönünde bilgiler vermektedir. Bütün bu çalışmaların sonucu mutajenitesinden ve kanserojenik etkilerinden şüphelenilen maddelerin her iki test sisteminden de geçirilmesi gereğini ortaya koymaktadır. Diğer taraftan testler arasında tutarsızlık durumlarında, bunların nedenlerinin sistematik bir kural çerçevesinde açıklanması, çok daha sağlıklı çalışmalara yol açacağı düşünülebilir. Benzer gerekçeler nedeniyle Misonidazol ve Aflatoxin B1 maddeleri ile yapılan çalışmalarda da her iki yöntem kullanılmıştır (33, 34).

Sonuç olarak bizim bulgularımız; Npyr'nin fare kemik iliği kromozomların da kırık, gap ve telomerden birleşme yapısal düzensizliklerine neden olduğu belirlenmiştir. MPCE'lerin oluşmasında kırık ya da asentrik kromozomal materyalin önemli rol oynadığı, dolayısıyla her iki yöntem arasında çalışılan maddeyle bağımlı olarak belirli bir ilişki olduğunu göstermiştir.

Kaynaklar

1. Sen N.P., Donaldson B., Iyengar B.J.R. and Panalaks T: Nitrosopyrrolidine and dimethylnitrosamine in bacon. *Nature*, 241; 473-474, 1973.
2. Sen N.P., Miles W.F., Donaldson B., Panalaks T. and Iyengar J.R.: Formation of nitrosamines in a meat curing mixture. *Nature* 245; 104-105, 1973.
3. Panalaks T., Iyengar J.R., Donaldson B.A., Miles W.F. and Sen N.P.: Further survey of cured meat products of volatile N-Nitrosamines. *J. Assoc. off Anal. Chem.* 57; 806-812, 1974.
4. Brunnemann K.D., Yu L. and Hoffman D.: Assessment of carcinogenic volatile N-nitrosamines in tobacco and in mainstream and sidestream smoke from cigarettes. *Cancer. Res.*, 37; 3218-3222, 1977.
5. Greenblatt M. and Lijinsky W.I.: Failure to induce tumors in Swiss mice after concurrent administration of amino acids and sodium nitrite. *J. Natl. Cancer Inst.* 48; 1389-1392, 1972.
6. Dotenwill W.: Experimental studies on the organotropic effect of nitrosamines in the respiratory tract. *Food. Cosmet. Toxicol.* 6; 571, 1968.
7. Phizackerley P.J.R. and Dabbagh A.I.: The estimation of nitrate and nitrite in saliva and urine. *Anal. Biochem.* 131; 242-245, 1983.
8. Hoos A., Habs M., Schmahl D.: Comparison of liver tumor frequencies after intermittent oral administration of different doses of N-Nitrosopyrrolidine in Sprague Dawley rats. *Cancer. Lett.* 26; 77-82, 1985.
9. Greten J.B.: Biochemical aspects of chemical carcinogenesis. *Bull. Cancer.* 65; 249-254, 1978.
10. IARC Monograph: On the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to humans. 17; 313-326, 1978.
11. Purchase I., Longstaff E., Ashby J.A.: Evaluation of six short term tests for detecting organic chemical carcinogen and recommendations for their use. *Nature* 264; 624-627, 1976.
12. McCann J., Ames B.N.: Detection of carcinogen as mutagens in the salmonella microsome test. *Assay of chemicals: Discussion. Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A)* 73(3); 950-954, 1976.
13. de Serres F.J., Ashby J.: "Evaluation of short-term tests for carcinogens. Report of the International Collaborative Program" New York: Elsevier/North Holland, 1981.
14. Adler I.D., Ashby J., Würzler F.E.: Screening for possible human carcinogens and mutagens: a symposium report. *Mutat. Res.* 213; 27-39, 1989.
15. Brockman H.E., De Marini D.M.: Utility of short-term test for genetic toxicology in the aftermath of the NTP's analysis of 73 chemicals. *Environ. Mol. Muta.* 11; 421-435, 1988.
16. Tennant R.W., Morgolin B.H., Shelby M.B., Zeiger E., Haseman J.K.: Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assay. *Sci.* 236; 933-941, 1987.
17. Salamone M.F., Heddle J.A., Katz M.: Mutagenic activity of 41 compounds in the in vivo micronucleus assay. In de Serres F.J. Ashby J (eds): "Evaluation of Short-term Tests for carcinogens." *Progress in Mutat. Res. Vol I.* New York: Elsevier/North Holland, pp 686-697, 1981.
18. Tsuchimoto T., Matter B.E.: Activity of coded compounds in the micronucleus test. In de Serres F.J. Ashby J. (eds): "Evaluation of Short-term Tests for Carcinogens." *Progress in Mutat. Res. Vol I* New York: Elsevier/North Holland, pp 705-711, 1981.
19. Kirkhart B: Micronucleus test on 21 compounds. In de Serres F.J. Ashby J. (eds): "Evaluation of Short-term Tests for Carcinogens." *Progress in Mutat. Res. Vol I.* New York: Elsevier/North Holland, pp. 698-704, 1981.
20. McFee A.F., Jauhar P.P., Lowe K.W., et al.: Assays of three carcinogen/Non-carcinogen chemical pairs for in vivo induction of chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei. *Environ. and Mol. Muta.* 14; 207-220, 1989.

N-Nitrosopirrolidin (NPYR)'in Farelerde Sitogenetik Etkileri

21. Adler I.D.: Mutagenicity testing-a practical approach-; Venitt S., Parry J.M., (Eds), IX Cytogenetic Test in Mammals. IRL Press Oxford, Washington DC. 1984.
22. MacGregor J.T., Heddle A.J., Hite M., Margolin H.B., Ramel C., Salomone F.M., et al.: Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutat. Res.* 189; 103-112, 1987.
23. Çetinkaya Ö., Çetinkaya S., Atalay A.: Effect of intraperitoneal administration of some nitrosamines on mouse liver Na/K ATPase activities. *Tr. J. of Medical Sciences.* 22; 81-83. 1994.
24. Preston R.J.: Au W., Bender M.A., Bremen J.G., Carano A.V., Heople J.A., Mcfee A.F., et al.: Mamalian in vivo and in vitro cytogenetic assays: A report of the U.S. EPA's Gene-Tox. Program. *Mutat. Res.* 87; 143-188. 1981.
25. Schmid W.: The micronucleus test. *Mutat. Res.* 31; 9-15. 1975.
26. Sümbüloğlu K., Sümbüloğlu V.: *Biyoistatistik*, Çağ Matbaası, Ankara, 1987.
27. McCoy G.D., DeMarco G.J., Haxhiu L., et al.: Effect of acute administration of N-nitrosopyrrolidine to male Syrian golden hamsters. *Cancer Lett.* 79; 161-165, 1994.
28. Hunt E.J. and Shank R.: Formation and persistence of a DNA adduct in rodents treated with N-nitrosopyrrolidine. *Carcinogenesis.* Vol. 12(4); 571-575, 1991.
29. Guttenplan J.B.: Mutagenesis by N-nitroso compounds; relationships to DNA adducts, DNA repair and mutational efficiencies. *Mutat. Res.* 233; 177-187, 1990.
30. Bağcı H.: Mutajenik ve karsinojenik maddeler. *Moleküler Biyoloji ve Gen Mühendisliği Lisansüstü Yaz Okulu Ders Notları TÜBİTAK*, 1985.
31. Heddle J.A. and Carrano A.V.: The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by a-irradiation; Evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. *Mutat. Res.* 80; 321-332, 1981.
32. Matter B.E., Grauwiler J.: Micronuclei in bone marrow cells. A simple in vivo model for the evaluation of drug-induced chromosomal aberrations. *Mutat. Res.* 23; 239-249, 1974.
33. Bisht S.K., Devi U.P.: Dose-dependent increase in the frequency of micronuclei and chromosomal aberrations by misonidazole in mouse bone marrow. *Mutat. Res.* 325; 57-63, 1994.
34. Anwar A.A., Khalil M.M., Wild C.P.: Micronuclei chromosomal aberrations and aflatoxin-albumin adducts in experimental animals after exposure to aflatoxin B1. *Mutat. Res.* 322; 61-67. 1994.