

Eskişehir İli Kırka İlçesinde Bulunan Bor Madeni Çalışanlarından Alman Periferal Kan Örneklerinde Sitogenetik Değerlendirmeler

Cytogenetic Evaluations of Peripheral Blood Samples of Boron (Kırka-Eskişehir) Workers

S. T. Onrat, M. Konuk

Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ed. Fakültesi, Biyoloji Böl, Moleküler Biyoloji ve Genetik, 03200, Afyon

ÖZET: Bu çalışmada, bor madeni (Kırka-Eskişehir) çalışanlarından alınan kan örneklerinde sitogenetik değerlendirmeler yapıldı. Bor madenlerinde çalışan 30 erkek işçi çalışma grubunu, Kırka'da yaşamayan, sağlıklı insanlardan oluşan, yaş olarak benzer 30 erkek bireyde kontrol grubunu oluşturdu. Çalışma iki aşamada yapıldı. Birinci aşamada çalışma grubundaki bireylerde, borun genotoksik ve/veya karsinojenik etkileri incelendi. Çalışma grubundaki ve kontrol grubundaki bireylerden alınan kan örneklerindeki kromozomal anomali, MN sayıları ve SCE oranları karşılaştırıldığında, her iki gruptaki kromozomal anomali, MN sayıları ve SCE oranlarının benzer olduğu saptandı. Çalışmanın ikinci aşamasında fabrikadan alınan penta 5 (Bu bölümdeki borun saflık oranı en az % 55'tir.) formundaki bor, kontrol grubundan alınan kan örneklerine değişik ppm oranlarında uygulandı. Yüksek ppm oranlarındaki bor kan örneklerine uygulandığında, özellikle kromozom 1'de ring kromozom oluşumuna rastlandı. Kan örneklerine değişik (10-20-30-50-100-150 ve 200ppm) dozlarda bor uygulandığında, 50 ppm ve üzerindeki dozlardaki bor, SCE oranını değiştirmeyen, MN sayılarında anlamlı artışa neden olduğu saptandı, ($p < 0.05$). Sonuç olarak bor madeninin bor madeni işçilerinde genotoksik ve karsinojenik etkilerinin olmadığı, kromozomal anomaliyi artırmadığı saptandı. Daha önceden bora maruz kalmamış bireylerin kan örnekleriyle in vitro olarak yapılan deneylerde 50 ppm ve üzerindeki bor düzeylerinin MN oluşumunu artırabileceği düşünüldü.

ABSTRACT: In this study, cytogenetic evaluations were made on blood samples taken from boron (Kırka-Eskişehir) workers. While study group was formed by 30 men working in boron, control group was formed by age matched 30 men of healthy individuals. Study was carried out in two stages. In the first stage, genotoxic and/or carcinogenic effects of boron mine on the study group was examined. It was determined that chromosomal anomaly, total MN and SCE ratios were similar in study group compared with control group. In the second stage of study, different ppm ratio of boron samples in penta 5 form (Penta 5 form bor mine has at least 55% purity.) taken from the boron mine were applied to blood samples of control group. When high ppm ratio of boron was applied to blood samples, ring chromosome formation was determined especially in chromosome 1. Applying different doses (10-20-30-50-100-150 ve 200ppm) of boron to blood samples, it was found that 50 ppm and over doses of boron while not changing SCE ratio, increased MN numbers significantly, ($p < 0.05$). As a result, it was determined that boron mine did not have genotoxic and carcinogenic effects on boron miners and did not increase chromosomal anomaly. In experiments done in vitro using the blood samples of individuals which were not exposed to boron mine, it was thought that boron levels at 50 ppm and over could increase MN formation.

1. GİRİŞ

Bor doğada bulunan ve kimyasal bir madde olduğu için, insan kromozomlarına olan etkisinin rutin sitogenetik yöntemlerle araştırılması amaçlandı. Bu

amaç doğrultusunda normal kromozom elde etme yöntemine ilave olarak, herhangi bir kimyasal maddenin genotoksik ve/veya mutagenik etkisinin olup olmadığını araştırmak için kullanılan, Fenech ve ark.(1993) tarafından genotoksite çalışmaları

için uygun olduğu önerilen MN (Mikronükleus testi) ve kimyasal maddelerin kardeş kromatidlerdeki parça değişimi üzerine olan etkilerini incelemek için kullanılan SCE (Sister Chromosome Exchange (Kardeş Kromatid Değişimi) testleri yapıldı (1,3). CBMN (Cytokinesis-block micronucleus) testi DNA hasarını ölçmek için kullanılan standart bir metodur ve iyonize radyasyonun genotoksik etkilerini ölçmek için kullanılan bir biyomarker olarak kullanıldığı bildirilmiştir (5,6). BSH formunda B-10 verilerek yapılan bir çalışmada SCE frekansında önemli bir değişikliğin olmadığı bildirildi (2). Benzer olarak havyan deneylerinde de borik asit formunda uygulanan borun hayvanlarda kromozomal aberasyonları indüklediği ve SCE frekansını da artırmadığı rapor edilmiştir (4). Bor bileşiklerinin genotoksitesini araştırmak için yapılan in vivo hayvan ve bakteri deneylerinde sonuç negatif çıkmıştır.

Bu çalışmada, Eskişehir ili Kırka İlçesinde bulunan Bor madeni çalışanlarından alınan periferik kan örneklerinde sitogenetik değerlendirmeler yapıldı

2. DENEYSEL ÇALIŞMALAR³

2.1 Örnek

Gönüllü olarak ve yetkililerin izniyle Eskişehir ili Kırka İlçesinde bulunan or madeni çalışanlarından alınan periferik kan örnekleri sitogenetik değerlendirmeler için kullanılmıştır. Bor madeni çalışanlarından 30 erkek işçi çalışma grubunu oluşturmuştur.

Kontrol grubu olması açısından Kırka'da yaşamayan, sağlıklı ve yaş olarak benzer 30 erkek bireyden alınan kan örnekleri kullanılmıştır.

2.2 Kullanılan metodlar

Metod 1: Periferik Kandan Kromozom Analizi

Besiyeri olarak; RPMI1640, %15 FBS, %2.5 L-Glutamin, %1.5 Penisilin/streptomisin standart olarak hazırlanmış, fabrika işçilerinden alınan periferik kan örnekleri bu besiyerine ekilerek, 72 saatlik kültüre bırakıldı. Kültürün son 71. saatinde nritotik iplikçikleri koparıp kromozomların metafaz

aşamasında incelenmesine olanak veren kolsişin maddesi ilave edildi, 15 dak. KCl ile muamele edildikten sonra 3:1 metanol : asetik asit ile yıkama işleminden geçirildi. Bu aşamadan sonra preparat üzerine yayma işlemi yapılarak ve Tripsin-Giems boyama ile kromozomlar bantlandıktan sonra, mikroskopik inceleme yapıldı. Bu yöntemin ikinci aşamasında Kırka'da yaşamayan ve sağlıklı kişilerden alınan periferik kan örneklerine (10-20-30-50-100-150-200 ppm) oramnda Kırka Bor Madeni'nden alınan penta5 formundaki Bor oranları uygulanarak inceleme yapıldı.

Metod 2: SCE (Sister Chromosome Exchange (Kardeş Kromatid Değişimi)) Kromozom Analizi

Besiyeri olarak; RPMI1640, %15 FBS, %2.5 L-Glutamin, %1.5 Penisilin/streptomisin, standard BrdU ilavesi yapılarak hazırlanmış olan besiyerine, fabrika işçilerinden alınan periferik kan örnekleri ekilerek kromozom elde etme yöntemi aynen uygulandı. Farklı bir boyama yöntemi olduğu için, kromozomların sabitlemiş olduğu preparatlar Hoechst boyası ile muamele edilerek, 1 saat UV ışığı altında bekletildi, boyandıktan sonra kapatılıp mikroskopik incelemeye alındı. Bu yöntemin ikinci aşamasında Kırka'da yaşamayan sağlıklı kişilerden alınan periferik kan örneklerine (10-20-30-50-100-150-200 ppm) oramnda Kırka Bor Madeni'nden alınan penta5 formundaki Bor oranları uygulanarak inceleme yapıldı.

Metod 3: MN (Mikronükleus) Testi

Besiyeri olarak; RPMI1640, %15 FBS, %2.5 L-Glutamin, %1.5 Penisilin/streptomisin standart olarak hazırlanmış, fabrika işçilerinden alınan periferik kan örnekleri bu besiyerine ekilerek, 72 saatlik kültüre bırakıldı. Kültürün 44. saatinde Cytocalashin-B ile muamele edilerek, kültür sonunda yıkama işlemleri yapıldıktan sonra, Giemsa boyası ile boyanan preparatlar kapatılıp mikroskopik inceleme yapıldı. Bu yöntemin ikinci aşamasında Kırka'da yaşamayan ve sağlıklı kişilerden alınan periferik kan örneklerine (10-20-30-50-100-150-200 ppm) oramnda Kırka Bor Madeni'nden alınan penta5 formundaki Bor oranları uygulanarak MN sayımı yapıldı.

3. SONUÇLAR

Metod 1: Periferik Kandan Kromozom Analizi Sonuçları

Fabrika işçilerinden periferik kan alınarak hazırlanan örnekler incelenmesi sonucunda sitogenetik açıdan herhangi bir anomali gözlenmedi.

Çalışmanın ikinci aşamasında; fabrikada çalışmayan sağlıklı kişilerden alınan periferik kan örneklerine (10-20-30-50-100-150-200 ppm) oranlarında, fabrikadan alınan penta 5 formundaki Bor uygulandı. 50-100-150 ve 200 ppm oranlan verildiğinde, özellikle 1 numaralı kromozomun yapısında morfolojik değişiklik gözlemlendi. Bu değişiklik genetik olarak ring (halka) kromozom yapısı oluşturma eğilimi olarak değerlendirildi. Sadece morfolojik bir değişim olarak kabul edilebilir.

Metodl: SCE (Sister Chromosom Exchange (Kardeş Kromatid Değişimi)) Kromozom Analizi Sonuçları

Fabrika işçilerinden periferik kan alınarak hazırlanan örneklerin incelenmesi sonucunda Kardeş Kromatid Değişimi açısından herhangi bir anomali gözlenmedi.

Çalışmanın ikinci aşamasında; fabrikada çalışmayan sağlıklı kişilerden alınan periferik kan örneklerine (10-20-30-50-100-150-200 ppm) oranlarında, fabrikadan alınan penta 5 formundaki Bor uygulandı. SCE oranlarında yine de anlamlı bir artış veya anomali gözlenmedi.

Metod3: MN (Mikronükleus) Testi Sonuçları

Fabrika işçilerinden periferik kan alınarak hazırlanan örnekler ile sağlıklı ve Kırka'da yaşamayan kişilerden alınan kanların spontan olarak incelenmesi sonucunda; mikronükleus açısından istatistiksel olarak her iki gruba T-Testi uygulandı. İki bağımsız değişken arasında % 95 doğruluk payı ve %5'lik hata payı ile iki grup arasında fark olmadığı gözlemlendi. Fabrika işçilerinden alınan kanlardaki MN oranı ile sağlıklı ve Kırka'da yaşamayan kişilerden alınan kanlardaki MN oranı arasında anlamlı bir fark yoktur.

Çalışmanın ikinci aşamasında; fabrikada çalışmayan sağlıklı kişilerden alınan periferik kan örneklerine (10-20-30-50-100-150-200 ppm) oranlarında, fabrikadan alınan penta 5 formundaki Bor uygulandı. 50-100-150 ve 200 ppm oranlan verildiğinde, MN sayısında anlamlı bir artış olduğu saptandı. Doz artışına bağlı olarak, MN sayısı arasındaki ilişki; ANOVA testi ile varyans analizi yapılarak karşılaştırıldı. $p < 0.05$ olduğu için %95 doğruluk payı ve %5'lik hata payı ile doz artışına bağlı olarak MN sayılarında anlamlı bir artış olduğu saptandı. Varyanslar arasındaki homojen dağılım açısından bakıldığında 20 ve 30 ppm oranlan sonuçlarının birbirine yakın, 50 ppm ve daha yüksek dozların homojen dağılım sonuçlarının ise farklı olduğu sonucuna varıldı. Laboratuvar şartlarında in vitro olarak gerçekleştirilen araştırmanın bu kısmında 50 ppm ve daha yüksek dozların mikronükleus oluşumunu artırdığı ve 50 ppm" ve daha yüksek dozların genotoksik etki oluşturabileceği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

Fenech, M., The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. Environmental Health Perspective Supplements. Vol.101 (Supl.3); 101-107,1993.

Antonia Cebulka-Wsilewska, Wojciech Niedzwiedz, Dorota Ftorjan, Anna Wierzewska, rystyna Schneider, Mariusz Kopec, Andrzej Kreft. Efficiency of a 252Cf source in normal or B-10 enriched lymphocytes evaluated by SCGE assay, classical cytogenetics and FISH technique. NUKLEONIKA 2001;46(2);41-49.

Rosin, M.P., The use of the micronucleus test on exfoliated cells to identify anticlastogenic action in humans: a biological marker for the efficacy of chemopreventive agents. Mutation Research, 267:246-276, 1992.

NTP (National Toxicology Program). Toxicology and Carcinogenesis Studies of Boric Acid (CAS No.10043-35-3) in B6C3F1 Mice (feed studies). NTP Tech. Rep. Ser. No. 324. U.S. DHHS, PHS, NIH, Research Triangle Park, NC, 1987.

S T Onrat, M. Konuk

Brooks, A.L., Newton,G.J., Shyr,L.-J., Seiler.F.A.,
and Scott,B.R.,The combined effects of a-
particles and X-rays on cell killing and
micronuclei induction in lung epithelial cells.
Int.J.Radiat.Biol.,58,799-811,1990.

Fenech,M., DenhamJF.,Francis,W., and Morley,A.,
Micronuclei in the cytokinesis-block lymphocytes
of cancer patients following fractionated partial-
body radiotherapy. *Int.J.radiat.Biol.*,57,373-383-
811,1990.