

Toxoplasmosis Tedavisi Esnasında Kullanılan Pyrimethamine'in (Daraprim) İnsan Lenfosit Kromozomları Üzerine Etkisi

Ünal EGELİ*
Gülten ERDOĞAN**

ÖZET

Bu çalışmada toxoplasmosis tedavisinde kullanılan ve bir folik asit antagonisti olan Pyrimethamine'in (Daraprim) insan kromozomları üzerine klastojenik etkisi araştırılmıştır.

Bu amaçla toxoplasmosis testleri müspet çıkmış 10 hastamızın Pyrimethamine ile tedavi edilmeden önce ve tedavi edildikten sonra lenfosit kültürlerinden sitogenetik inceleme yapılarak kromozomlardaki sayı ve yapı kusurları değerlendirilmiştir.

Sitogenetik değerlendirme sonucu tedaviden sonraki grupta sayısal bir anomaliye rastlanmamasına rağmen yapısal kusurlar bakımından gap ve kırk sayısının tedaviden önceki gruba nazaran anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Fakat bu anlamlılığın özellikle tedavi esnasında folbiol kullanmayan iki hastadan kaynaklandığı dikkati çekmiştir.

Özet olarak bu çalışmada Pyrimethamine'in insan kromozomları üzerine klastojenik etkisinin olduğu, kırk ve gap şeklinde yapısal kromozom kusurları oluşturduğu belirlenmiştir.

* Bio. Dr.; İ.Ü. İst. Tıp Fak. İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Bilim Dalı, Çapa-İstanbul.

** Prof. Dr.; İ.Ü. İst. Tıp Fak. İç Hastalıkları Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Bilim Dalı, Çapa-İstanbul.

SUMMARY

The Effect of Pyrimethamine on Human Lymphocyte Chromosomes Used During Toxoplasmosis Therapy

For this purpose lymphocyte cultures of ten patients positive for toxoplasmosis have been evaluated cytogenetically according to numerical anomalies, structural anomalies (gaps and breaks) on the chromosomes before and after therapy with Pyrimethamine.

According to our cytogenetical evaluations in the group after therapy, no numerical abnormalities could be seen, although the frequency of gaps and breaks has been found increased significantly compared to the cytogenetical evaluations of patients who have not received any therapy. This significance was due to two patients not having used folbiol during therapy.

Toxoplasmosis dünyanın her tarafında rastlanan bir protozoon olan toxoplasma gondii tarafından meydana getirilen bir hastalıktır^{2,8,26,27}.

Toxoplasmosisin tedavisi Pyrimethamine (Daraprim) ile birlikte sülfanamid kullanılarak yapılır. Değişik literatürlerde tedavide kullanılan Pyrimethamine dozu ve tedavi süresi farklı olmasına rağmen en uygun tedavi dozu vücut ağırlığının kilogramı başına 1 mg doz önerilmiştir ve tedavi süresi 2-8 hafta arasında değişmektedir^{4,6,15,18}.

Bu araştırmada bugüne kadar yapılan çalışmalarla sadece teratojenik özellikleri kanıtlanmış, fakat klastojenik etki yönünden incelenmemiş olan Pyrimethamine kullanıldı.

Pyrimethamine'in insan kromozomları üzerinde etkisini incelemek amacı ile Tıbbi Genetik Bilim Dalı Polikliniğine müracaat eden, toxoplasmosis testleri müsbet olarak saptanan hastalara günde 50 mg olmak üzere 14 günlük Pyrimethamine tedavisi uygulanmadan önce ve tedavi uygulandıktan sonra periferik kan lenfosit kültürleri ile sitogenetik değerlendirme yapılarak mitotik indeks, kromozomlardaki sayı ve yapı kusurları değerlendirildi. Ayrıca tedavi esnasında hastalara kan değerlerinin düşmesini önlemek için günde 5 mg folbiol (folik asit) verildi.

MATERYAL VE METOD

Araştırma Tıbbi-Genetik Bilim Dalı'na spontan düşük, ölü doğum, konjenital anomalili doğum, boyunda beze şikayetleri gibi nedenler ile müracaat eden ve Toxoplasmosis testleri müsbet olarak saptanan hastalar üzerinde yapılmıştır.

Vakalar seçilirken en az iki, üç ay öncesine kadar röntgen filmi çekir-memiş olmalarına, ilaç kullanmamalarına ve virütik bir infeksiyon geçirmemiş olmalarına dikkat edilmiştir. Çünkü bu tip etmenlerin kromozom kırıklarına yol açtıkları bilinmektedir.

Araştırmada toxoplasmosis testleri müsbet olarak saptanan hastalardan Pyrimethamine tedavisinden önce ve tedaviden sonra lenfosit kültürleri yapılarak mitotik indeks ve kromozomlardaki sayı ve yapı kusurları değerlendirildi.

Kromozom Kültürlerinin Yapılması:

Deneylerde kültür ortamı olarak hazır kromozom kit'ler (GIBCO) ve kit yöntemi kullanıldı. Her vakanın parmak ucundan 4 hematokrit tüpü kan alınarak 5 cc'lik hazır kültür ortamına ilave edildi. Kültürlere standart kromozom harvest yöntemi uygulandı.

Preparatların Değerlendirilmesi:

Her vakadan üç kromozom preparatı hazırlandı ve incelemeye elverişli 50 metafaz figürü incelenerek kromozomlardaki sayı ve yapı (kırık ve gap) kusurları değerlendirildi. Ayrıca her kültürden 1000 hücre sayılarak Pyrimethamine tedavi-sinden önce ve sonraki mitotik indeks değerleri karşılaştırıldı.

BULGULAR

Araştırma sonuçları Tablo I ve II'de verilerek bulgular aşağıdaki şekilde özetlendi. Bulgulara ait örnek resimler 1 ve 2'de gösterildi.

Tedaviden önceki grupta (Tablo: I) her vakadan 1000 hücre sayılarak toplam 10.000 hücrede 1043 metafaza rastlandı ve mitotik indeks % 10.4 olarak saptandı. Aynı zamanda 10 vakada incelemeye elverişli 500 metafaz figüründe 15 kırık ve 18 gap saptandı. Genel kırık oranı da % 3, gap oranı da % 3.6 olarak belirlendi.

Tedaviden sonraki grup: 14 günlük Pyrimethamine tedavisinden sonra (Tablo: II) her vakadan 1000 hücre sayılarak toplam 10.000 hücrede 894 metafaza rastlandı ve mitotik indeks % 8.4 olarak saptandı.

Aynı zamanda 10 vakada incelemeye elverişli toplam 500 metafaz figüründe 34 kırık ve 30 gap saptandı. Genel kırık oranı % 6.8 ve gap oranı da % 6 olarak belirlendi.

Bulguların İstatistik Değerlendirmesi:

Araştırmada mitotik indeks kırık ve gap oranlarını karşılaştırmak için χ^2 test yöntemi kullanıldı ve anlamlılık derecesi $p \leq 0.05$ olarak alındı. Bulguların

istatistik değerlendirmesi aşağıdaki şekilde özetlendi. Mitotik indeks bakımından tedaviden önce - tedaviden sonraki grup karşılaştırıldığında ϵ değeri 5 ve sonuç anlamlı olarak saptandı.

Tablo: I - Toxoplasmosis Testleri Müsbet ıkmış Hastaların Tedaviden nce Mitotik İndeks, Kromozom Kırıkları ve Gap Sayıları ve Yüzde Oranları

| Vaka No. | Adı Soyadı | Yaş Yıl | Cins | Karyotip | İncelenen Metafaz Sayısı | Mitotik İndeks % | Kırık Sayısı | Kırık Oranı % | Gap Sayısı | Gap Oranı % |
|----------|------------|---------|------|----------|--------------------------|------------------|--------------|---------------|------------|-------------|
| 1 | E.E. | 35 | K | 46XX | 50 | 5.9 | 2 | 4 | 0 | 0 |
| 2 | A.G. | 36 | K | 46XX | 50 | 12.8 | 4 | 8 | 0 | 0 |
| 3 | M.Y. | 30 | K | 46XX | 50 | 15.8 | 0 | 0 | 4 | 8 |
| 4 | K.K. | 23 | K | 46XX | 50 | 14.2 | 0 | 0 | 2 | 4 |
| 5 | M.G. | 15 | E | 46XY | 50 | 13.0 | 0 | 0 | 2 | 4 |
| 6 | G.T. | 24 | E | 46XY | 50 | 9.4 | 2 | 4 | 2 | 4 |
| 7 | Z.C. | 28 | K | 46XX | 50 | 13.4 | 1 | 2 | 2 | 4 |
| 8 | M.A. | 29 | E | 46XY | 50 | 10.0 | 0 | 0 | 2 | 4 |
| 9 | F.. | 34 | K | 46XX | 50 | 4.1 | 4 | 8 | 4 | 8 |
| 10 | C.G. | 41 | E | 46XY | 50 | 5.7 | 2 | 4 | 0 | 0 |

| | | |
|-----------------------------|---|--------|
| Sayılan toplam mitoz sayısı | : | 10.000 |
| Bulunan metafaz sayısı | : | 1043 |
| Mitotik indeks (%) | : | 10.4 |
| İncelenen metafaz sayısı | : | 500 |
| Kırık sayısı | : | 15 |
| Genel kırık oranı (%) | : | 3 |
| Gap sayısı | : | 18 |
| Genel gap oranı (%) | : | 3.6 |

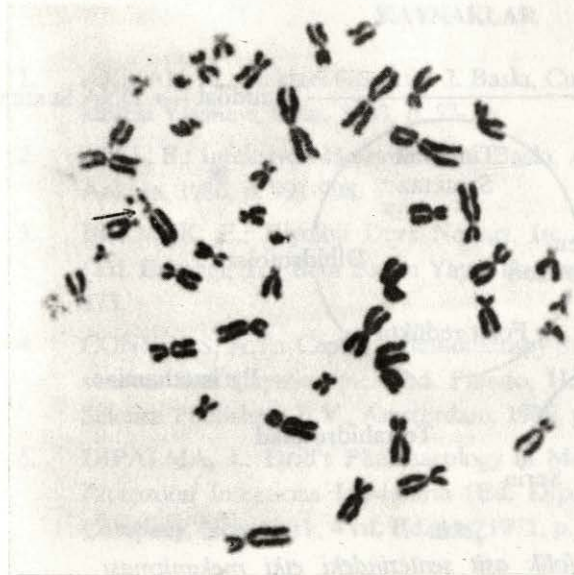
Kırık bakımından tedaviden önce - tedaviden sonraki grup karşılaştırıldığında ϵ değeri 3.8 ve sonuç anlamlı olarak bulundu.

Gap bakımından tedaviden önce - tedaviden sonraki grup karşılaştırıldığında ϵ değeri 2 ve sonuç anlamlı olarak bulundu.

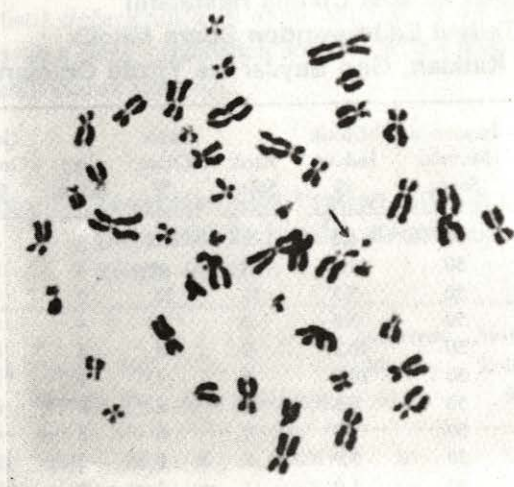
**Tablo: II - Toxoplasmosis Testleri Müsbet Çıkışmış Hastaların
Pyrimethamine İle Tedavi Edilmesinden Sonra Mitotik
İndeks, Kromozom Kırıkları, Gap Sayıları ve Yüzde Oranları**

| Vaka No. | Adı Soyadı | Yaş Yılı | Cins | Karyotip | İncelenen Metafaz Sayısı | Mitotik İndeks % | Kırık Sayısı | Kırık Oranı % | Gap Sayısı | Gap Oranı % |
|----------|------------|----------|------|----------|--------------------------|------------------|--------------|---------------|------------|-------------|
| 1 | E.E. | 35 | K | 46XX | 50 | 4.1 | 10 | 20 | 2 | 4 |
| 2 | A.G. | 36 | K | 46XX | 50 | 21.5 | 4 | 8 | 4 | 8 |
| 3 | M.Y. | 30 | K | 46XX | 50 | 5.3 | 11 | 22 | 3 | 6 |
| 4 | K.K. | 23 | K | 46XX | 50 | 5.6 | 2 | 4 | 4 | 8 |
| 5 | M.G. | 15 | E | 46XY | 50 | 10.3 | 0 | 0 | 4 | 8 |
| 6 | G.T. | 24 | E | 46XY | 50 | 10.9 | 2 | 4 | 2 | 4 |
| 7 | Z.C. | 28 | K | 46XX | 50 | 5.6 | 4 | 8 | 3 | 6 |
| 8 | M.A. | 29 | E | 46XY | 50 | 6.7 | 0 | 0 | 2 | 4 |
| 9 | F.Ç. | 34 | K | 46XX | 50 | 9.9 | 0 | 0 | 6 | 12 |
| 10 | C.G. | 41 | E | 46XY | 50 | 5.0 | 1 | 2 | 0 | 0 |

| | | |
|-----------------------------|---|--------|
| Sayılan toplam mitoz sayısı | : | 10.000 |
| Bulunan metafaz sayısı | : | 849 |
| Mitotik indeks (%) | : | 8.4 |
| İncelenen metafaz sayısı | : | 500 |
| Kırık sayısı | : | 34 |
| Genel kırık oranı (%) | : | 6.8 |
| Gap sayısı | : | 30 |
| Genel gap oranı (%) | : | 6 |



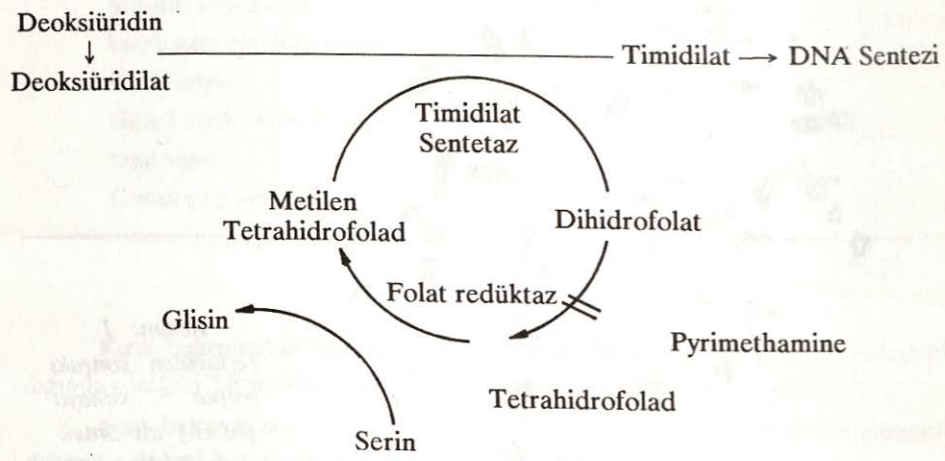
*Resim: 1
Tedaviden sonraki grupta 5. vakaya (M.G.) ait örnek resimde kromatid tipi kırık*



Resim: 2
Tedaviden sonraki
grupta 10. vakaya (C.G.)
ait örnek resimde
kromatid tipi kırk

TARTIŞMA

Toxoplasmosis ve malaria tedavisinde kullanılan Pyrimethamine bir folik asit antagonistidir^{11.17}. Folat redüktaz enzimini inhibe ederek dehidrofolattan tetrahidrofolat oluşumunu engeller, tetrahidrofolat yeterli miktarda sentez edilemediği için methilentetrahidrofolat oluşamaz ve dolayısıyla methilentetrahidrofolat'ın dehidrofolat'a çevrilmesi sırasında oluşacak timidilat'ın sentez edilememesi sonucunda DNA oluşumu bozulur^{13.17.19.22.28.29}. Bunun sonucu aynı zamanda folik asit sentezi de engellenir¹⁴.



Şekil: 1
Pyrimethamine'in folik asit sentezindeki etki mekanizması

10 toxoplazmalı vaka üzerinden gerçekleştirilen araştırmada Pyrimethamine tedavisinden önce ve tedaviden sonra sayısal ve yapısal kusurları değerlendirildik. Tedaviden önce ve sonraki grupta vakaların hiçbirinde herhangi bir sayısal anomaliye rastlanmadı. Tedaviden önce ve sonraki gruplar kromozom yapı kusuru yönünden değerlendirildiğinde, tedaviden sonraki grupta kırık ve gap sayısının tedaviden önceki gruba nazaran anlamlı bir şekilde arttığı gözlemlendi. Fakat bu anlamlı artıştaki en önemli rolün tedavi esnasında folbiol (folik asit) kullanılmayan iki hastadan kaynaklandığı dikkatimizi çekti. Buradan da folik asitin kromozomlardaki gap ve kırıkları maskeleyiği literatürlerde belirtildiği gibi^{20.21.24.25} bir kez daha gösterildi.

Pyrimethamine bakteri ve parazitlerde folik asit sentezini inhibe ederek etkili olur¹⁰. Pyrimethamine insanda da özellikle tedavi esnasında folik asitin kullanılmadığı durumlarda folik asit sentezini inhibe ederek kromozomlarda kırık ve gap şeklinde yapısal kusurların meydana gelmesine sebep olur. 1988 yılında Glover ve Stein tarafından yapılan bir araştırmada Aphidocilin'in FRDU ile aynı etkiye sahip olduğunun gösterilmesi ve insan kromozomlarında kırık ve gap şeklinde yapısal kusurlar meydana getirmesi düşüncemizi desteklemektedir¹⁰.

Ayrıca tedaviden önce ve sonraki gruplar mitotik indeks bakımından karşılaştırıldığında mitotik indeksin tedaviden sonraki grupta anlamlı bir şekilde düştüğü belirlendi.

Sonuç olarak araştırmamızda Pyrimethamine'in insan kromozomları üzerinde klastojenik etkisinin olduğu, kırık ve gap şeklinde yapısal kromozom kusurları oluşturduğu gösterildi.

KAYNAKLAR

1. AKMAN, M.: Bakteri Genetiği. 2. Baskı, Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınevi, Sivas, 1983, p. 57-77.
2. ANIL, B.: İnfeksiyon Hastalıkları. 6. Baskı, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1980, p. 991-998.
3. BERMEK, E.: Biyoloji Ders Notları. In: Moleküler Düzeyde Kalıtım (Ed. Erbeni, T.), Beta Basım Yayın Dağıtım A.Ş., İstanbul, 1986, p. 259-273.
4. CONNORS, A.T.: Cancer Chemotherapy 8. In: Alkylating Agents, Nitrosoureas and alkytriazemes (ed. Pinedo, H.M., Chabner, B.A.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1986, p. 28-51.
5. DIPALMA, J.: Drill's Pharmacology in Medicine. In: Chemotherapy of Protozoon Infections I: Malaria (Ed. Dipalma, J.) McGraw-Hill Book Company, New York, 4 rd. Edition, 1971, p. 1770-1789.

6. DYKE, V.K.: Modern Pharmacology. In: Antimalarial Drugs (ed. Craig, C.R., Stitsel, R.E.), Little Brown and Company, Boston, 1982, p. 703-714.
7. ERDOĞAN, G.: Pediatride Genetik 8. Pediatri Günleri. In: Teratojenik Etmenler (ed. Günöz, H., Darendeliler, F.), Kervan Kitapçılık Basım Sanayi ve Tic. A.Ş., İstanbul, 1987, p. 48-50.
8. FELDMAN, A.H.: Toxoplasmosis. Pediatrics., 1: 559-571, 1958.
9. GLOVER, W.T., STEIN, K.C.: Chromosome breakage and recombination at fragile sites. Am. J. Hum. Genet., 47: 265-273, 1988.
10. GOUT, A.: Medical Pharmacology. 9 rd. edition, The C.V. Mosby Company, Saint Louis, 1978, p. 650.
11. HAMILTON, I., PHILIPS, P.S., CLARKE, D.A., STERNBERG, S.S., HITCHINS, G.H.: Hematological effects of folic acid. Fed. Proc., 11: 225, 1952.
12. KNUDSON, G.A.: Advances in Human Genetics. In: Genetics and Etiology of Human Cancer (Ed. Harris, H., Kirschorn, K.), Plenum Press., New York, 1977, p. 11-12.
13. KRISHASWAMY, K., TEOH, P.C.: Drug Treatment Principles and Practice of Clinical Pharmacology. 2 rd. Edition, Australia Pty Limited, London, 1980, p. 1204.
14. LAURANCE, D.R., BENETT.: Clinical Pharmacology. 5 rd. edition, Churchill Livingstone Medical Division of Longman Group UK Ltd., London, 1980, p. 892.
15. MEYERS, H.F., JAWETZ, E., GOLDFIEN, A.: Rewiev of Medical Pharmacology. 4 rd. Edition, Los Altos, California, 1974, p. 616.
16. MILET, R.G., ABT, W., GALLAGOS, D.: Chromosome Abnormalities in Toxoplasmosis. Lancet., 1: 1305-1306, 1976.
17. MÜFTÜOĞLU, A., PAKER, Ş., ARIOĞLU, S.: Gebelik esnasında Pyrimethamine (Daraprim) kullanılmasına bağlı bir megaloblastik anemi vakası. Hacettepe Tıp Cerr. Bült., 4: 334-339, 1977.
18. OSOL, A., PRATT, R.: The United States Dispensory. 27 rd. Edition, J.B. Lipincott Company., Philadelphia, 1973, p. 987.
19. PETTER, C., BOURBON, J.: Foetal red cell macrocytosis induced by pyrimethamine, its teratogenic role. Experientia., 31: 369-370, 1974.
20. REIDY, A.J., CHEN, L.T.A.: Folic acid and chromosome breakage. II. A methionine effect similar to that in fragile X expression. Hum. Genet., 68: 189-190, 1984.
21. SIXMITH, G.D., WATKINS, M.W., CHULAY, D.J., SPENCER, C.H.:

- In vitro antimalarial activity of tetrahydrofolade dehydrogenase inhibitors. Am. J. Trop. Med. Hyg., 33: 772-776, 1984.
22. SUTHERLAND, G.R.: Heritable fragile sites in human chromosome breakage. I Factors affecting expression in lymphocyte culture. Am. J. Hum. Genet., 31: 125-135, 1979.
 23. SUTHERLAND, G.R.: The fragile x chromosome. Int. Rev. Cytol., 81: 107-143, 1983.
 24. TAYŞI, K., SAY, B.: Tıbbi-Genetik. Hacettepe Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1975, p. 27-87.
 25. TÖRECİ, K.: İnfeksiyon Hastalıkları. In: Toxoplasmos (Ed. Çetin, E.T.) Çeliker Matbaacılık Koll. Şti., İstanbul, 3. Baskı, 1979, p. 2545-2549.
 26. UNAT, K.E.: Tıp Parazitolojisi. 3. Baskı, Fatih Gençlik Vakfı Matbaası, İstanbul, 1982.
 27. VAXMAN, S., HERBERT, V.: Mechanism of Pyrimethamine induced megaloblastosis in human bone marrow. N. Eng. J. Med., 280: 1316-1319, 1969.
 28. WEBSTER, T.L.: The Pharmacological Basic of Therapeutics. In: Drug Used in the Chemotherapy of Protozoal Infections (ed. Gilman, A.G., Goodman, L.S., Rall, T.W., Murad, F.), Macmillan Publishing Company, New York, 7 rd. Edition, 1985, p. 1035-1037.
 29. WEKEMANS, M., POPOVICH, B., RESENBLATT, O., MONROE, P.: Chromosomal breakage in normal and fragile x subjects using folate culture conditions. J. Med. Genet., 20: 404-407, 1983.

Yard. Doç. Dr. Ünal EGELİ
U.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi
Genel Biyoloji Anabilim Dalı
BURSA

SUMMARY

Accuracy Data of The Frozen Section Biopsies

We have reviewed 74 frozen section slides in our laboratory between 1980-1990 period. The results compared with permanent sections

Dr. Ünal EGELİ, Genel Biyoloji Anabilim Dalı

Ünvan: Doç. Ü.Ü. Tıp Fak. Genel Biyoloji Anabilim Dalı

Arş. Gör. Dr. Ü.Ü. Tıp Fak. Genel Biyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Ü.Ü. Tıp Fak. Genel Biyoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Ü.Ü. Tıp Fak. Genel Biyoloji Anabilim Dalı