

# Trimethoprim Ve Sigara Kullanımının Mitotik Aktiviteye Bağımsız Ve Kombine Etkileri

Etem AKBAŞ<sup>1</sup>, Ayla ÇELİK<sup>1</sup>, Gökhan GÖRKEM<sup>1</sup>, Çiğdem Rabia UTKU<sup>1</sup>

## ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada sigara kullanımı ve trimethoprimin mitotik aktiviteye bağımsız ve kombine etkileri incelenmiştir. Sigara kullanımı ile akciğer kanseri başta olmak üzere, bir çok kanser türü ile ilişki vardır. Kanser; mitoz mekanizmasının vücutun kontrolü dışına çıkararak aşırı hücre çoğalması olarak tanımlanabileceğinden, sigaranın mitoz mekanizmasında aksamalara neden olması söz konusudur. Trimethoprim (TMP), folik asit antagonistisi olması nedeni ile DNA, RNA ve protein gibi biyomoleküllerin bazı monomerlerinin biosentezinde aksamalara neden olmaktadır.

**Gereç ve yöntem:** Birinci aşamada; Sigara içmeyen, radyasyon etkisinde kalmamış, herhangi bir mutajen ve kimyasal etkisinde kalmamış 5 sağlıklı erkek bireyden alınan kandan 72 saatlik Lenfosit kültürleri hazırlandı. ikinci aşamada ise; En az 5 yıl süre ile günde en az 1 paket sigara içen erkek bireylerden alınan kandan 72 saatlik Lenfosit kültürleri hazırlandı. Kültürlere; Kontrol grubu oluşturulduktan sonra terapötik dozdan başlamak üzere artan üç farklı doz (8, 35 ve 60 µg/ml) ve üç farklı süre (6, 24 ve 48 saat) kombinasyonunu sağlayacak şekilde in vitro olarak trimethoprim eklendi. Her bir doz-süre kombinasyonuna ait preparatlar taranarak mitoz aşamasında olan hücrelerin % oranları belirlendi.

**Bulgular:** İki aşama için bulgular üzerinde yapılan istatistiksel değerlendirmede; artan trimethoprim dozuna paralel olarak mitotik indeks oranı düşerken ( $P < 0,01$ ), uygulama süresi artışı mitotik indeks oranını etkilememiştir ( $P > 0,05$ ). Trimethoprim uygulama süresi sabit tutularak dozun artırılması mitotik indeks oranını düşürürken ( $P < 0,01$ ), Trimethoprim dozunun sabit tutularak uygulama süresinin artırılması mitotik indeks oranlarını etkilememiştir ( $P > 0,05$ ).

**Sonuç:** İki aşamanın aynı doz-süre kombinasyonuna ait bulgular karşılaştırıldığında; Sigara içen bireylerde trimethoprim etkisiyle oluşan mitotik indeks bulgularının, sigara içmeyenlerdekine oranla daha düşük olduğu belirlenmiştir ( $p < 0,01$ ).

**Anahtar Kelimeler:** Sigara kullanımı, mitotik aktivite, trimethoprim.

## SUMMARY

### INDEPENDENT AND COMBINED EFFECTS OF TRIMETHOPRIM AND SMOKING TO MITOTIC ACTIVITY

**Aim:** Independent and combined effects of trimethoprim and cigarette were investigated in this study. It is known that smoking has a direct relation with primarily lung cancer and many cancer types. Because of cancer can be defined as excess cell growing by uncontrol mitosis mechanism, it is discussed that smoking causes defects on mechanism of mitosis. Trimethoprim, because of being antagonist of folic acid cause to trouble in biosynthesis of some monomers which are necessary for synthesis of DNA, RNA and Protein.

**Material and method:** First step; Lymphocytes cultures for 72 hours were prepared from the blood which were taken from 5 healthy male individuals which are non-smokers, unexposed to radiation, unexposed to any mutagen and chemical agents. second step; lymphocytes cultures for 72 hours were prepared from the blood which are smokers at

<sup>1</sup> Mersin Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

least for five years and at least 1 pocket cigarette a day. After control group was formed by providing combination on the point of starting from the therapodic dose increasingly three different application doses (8, 35 and 60 µg/ml) and three different application times (6, 24 and 48 hours) trimethoprim is added to cultures as in vitro. The percentage of the cells which are on mitosis stage were identified by counting of cells, for each application doses-application times combination on prepares which were prepared.

**Findings:** In statistical appraisal with findings, while mitotic index rate decrease as parallel to increased trimethoprim application dose ( $p<0.01$ ). Mitotic index rate had not been effected by increasing of application time ( $p>0.05$ ). While increasing the application dose and fixing application time cause the mitotic index rate decrease ( $p<0.01$ ), fixing the application dose and increasing application time of trimethoprim dose not effect the mitotic index rate ( $p>0.05$ ).

**Conclusion:** When findings of same dose-time combination of the both of steps were compared it was seen that mitotic index findings which were formed by trimethoprim effect on smoker individuals were less than non-smokers.

**Keywords:** Cigarette smoking, mitotic activity, mitotic index, trimethoprim.

Yurdumuzda ve dünyada enfeksiyon hastalıklarının sağaltımında en yaygın kullanılan kemoterapötiklerden olan Trimethoprim, dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek dihidrofolik asit - tetrahidrofolik asite dönüşümünü engellemektedir. Tetrahidrofolik asit hücrede; adenin, guanin ve timin nukleotidleri ile serin, glisin ve metionin amino asitlerinin biyosentezinde bir öncü moleküldür. Bu nedenle trimethoprim, hücre için yaşamsal öneme sahip DNA, RNA ve protein gibi biyomoleküllerin biyo sentezini olumsuz yönde etkilemektedir(1-4). Bu bilgilere dayanılarak DNA, RNA ve protein sentezindeki aksamaların hücrelerin mitoza giriş hızlarını düşürmesi şeklinde kendini göstermesi beklenmektedir. Bakteri hücre membranı tetrahidrofolik asite karşı geçirgen olmamasına karşın, memeli hücre membranı tetrahidrofolik asiti geçirmeye yeteneğine sahiptir. Trimethoprim kullanımı ile bakteri hücrelerinde tetrahidrofolik sentezinin inhibisyonu bakteriostatik veya bakterisid etki göstermesine karşın - memeli hücreleri günlük besinlerle alınan tetrahidrofolik asitten yararlanıldığı için olumsuz etkisi fazla değildir(5, 6).

Sigara kullanımı ile insan bünyesine yaklaşık 4000 çeşit kimyasal ajan karışmaktadır. Bunlardan; 2-naphthylamine, 4-aminobiophenyl, benzene, arsenic ve chromium'un insanlarda kanserojen olduğu kesin olarak saptanmıştır. Hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde de sigara katranı içeriğindeki 30 kadar kimyasal ajanın daha kanserojen olduğu kanıtlanmıştır(7). Sigara kullanımı ile başta akciğer kanseri olmak üzere bazı kanser türleri arasındaki direkt yada dolaylı ilişkiler bilinmektedir(8). Kanser; mitoz mekanizmasının vücutun kontrolü dışına çıkararak aşırı hücre çoğalması olarak tanımlanabileceğinden, sigaranın mitoz mekanizmasında aksaklıklara neden olması söz konusudur.

Lenfositler; vücutumuzun hastalık etmenlerine karşı korunmasında, özgül bağışıklığı oluşturan en önemli elemanlardır. Bu çalışmada insanların kullandığı zararlı alışkanlıklardan en yayını olan sigara kullanımı ve enfeksiyon hastalıklarının sağaltımında en yaygın kullanılan kemoterapötiklerden olan trimethoprinin mitotik aktiviteye tek başına ve kombine etkileri araştırılmıştır.

#### GEREÇ ve YÖNTEM

Birinci aşamada; sigara içmeyen, son zamanlarda kemoterapi görmemiş, radyasyon etkisinde kalmamış ve mitozu etkileyebilecek herhangi bir kimyasal etkisinde kalmamış, yaşı 25±5 arasında değişen, tamamen sağlıklı 5 erkek bireylerden alınan kanla mikrokültür yöntemi ile lenfosit kültürleri hazırlandı. Trimethoprim uygulanması: ilgili dozları sağlayacak şekilde ana stok çözeltilerden 0.5 ml alınarak; 6 saatlik kültürlerde 66. saatte, 24 saatlik kültürlerde 48. saatte ve 48 saatlik kültürlerde 24 saatte eklendi. Kontrol grubu için ayrılan kültürlerde ise aynı süreler için kültür çözeltisi eklendi. Preperasyon saatinden 1 saat önce kültürlerde kolçısın eklenerek mitoz aşamasına gelen hücrelerin tutulması sağlandı. İkinci aşamada ise aynı prosedür; Birinci aşamadaki özelliklerden farklı olarak en az 5 yıldan beri günde en az bir paket sigara içen bireylerden alınan kan örneklerinden hazırlanan kültürlerde uygulandı.

Preparasyon işlemlerinde sırası ile; 15 dakikalık hipotonik % 0,055 KCl) uygulamasından sonra ve 10'ar dakikalık santrifüj işlemleri şeklinde ve 5 kez fiksatif (1 hacim asetik asit + 3 hacim metanol) uygulandı. En son fiksatif işleminden sonra periferik yayma işlemi ile preparatlar hazırlandı ve preparatlar % 5 giemsa boyası ile 10 dakika boyanıp aseton ve ksilolden geçirildikten sonra kapatıldı.

**Mitotik indeks:** Toplam hücre içinde mitoz aşamasında bulunan hücrelerin % oranı olarak tanımlanmakla beraber - rakamların daha sağlıklı

olabilmesi için, her bir doz süre kombinasyonu için 1000 adet hücre sayıdı ve içeriğindeki mitozun aşamalarına ait hücreler değerlendirmeye alındı.

**Istatistiksel değerlendirmeler:** Her aşama için farklı doz-süre kombinasyonlarına ait bulgular sayımla elde edilen değerler olduğu için, önce yüzde oranlara dönüştürüldü. Yüzde oranlar *arc-sin*

transformasyonu ile açı değerlerine dönüştürüldü ve bu değerler üzerinden varyans analizi yöntemlerinden faktöryel düzen ile test edildi. İki aşamadaki birbirlerine paralellik gösteren doz-süre kombinasyonlarına ait değerler ise *t testi* ile test edilerek karşılaştırıldı.

**Tablo-1:** Trimethoprimin sigara içmeyen bireylerde mitotik aktiviteye etkilerine ait genel sonuçlar.

| Doz<br>Süre       | Kontrol      | 8 $\mu$ g/ml | 35 $\mu$ g/ml | 60 $\mu$ g/ml | $\Sigma x$<br>$X$ |
|-------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|-------------------|
| 6 saat            | 2,4          | 2,0          | 2,4           | 0,8           |                   |
|                   | 2,5          | 2,0          | 0,9           | 0,8           |                   |
|                   | 2,4          | 2,4          | 2,0           | 1,2           |                   |
|                   | 3,2          | 2,4          | 2,4           | 2,4           |                   |
|                   | 3,1          | 1,2          | 0,9           | 1,2           |                   |
| $\Sigma x$<br>$X$ | 12,6<br>2,52 | 10,0<br>2,0  | 8,5<br>1,7    | 6,4<br>1,28   | 37,5<br>1,87      |
| 24 saat           | 1,6          | 1,2          | 1,6           | 1,2           |                   |
|                   | 1,6          | 2,8          | 3,2           | 1,2           |                   |
|                   | 1,6          | 2,0          | 1,6           | 0,6           |                   |
|                   | 2,0          | 2,0          | 2,4           | 1,6           |                   |
|                   | 3,3          | 1,5          | 1,5           | 2,1           |                   |
| $\Sigma x$<br>$X$ | 10,1<br>2,02 | 9,5<br>1,9   | 10,3<br>2,06  | 6,7<br>1,34   | 36,6<br>1,83      |
| 48 saat           | 2,8          | 3,2          | 2,4           | 1,6           |                   |
|                   | 3,2          | 2,4          | 3,2           | 1,6           |                   |
|                   | 1,6          | 1,2          | 1,2           | 0,6           |                   |
|                   | 3,6          | 2,8          | 3,2           | 2,0           |                   |
|                   | 2,4          | 2,7          | 2,4           | 1,5           |                   |
| $\Sigma x$<br>$X$ | 13,6<br>2,72 | 12,3<br>2,46 | 12,4<br>2,18  | 7,3<br>1,46   | 45,6<br>2,28      |
| $\Sigma x$<br>$X$ | 36,5<br>2,43 | 31,8<br>2,12 | 31,2<br>2,08  | 20,4<br>1,36  |                   |

## BULGULAR

Trimethoprimin sigara içmeyen bireylerde mitotik aktiviteye etkilerini belirlemeye çalıştığımız I. aşamada, deney ve kontrol grubuna ait bulgular genel olarak incelendiğinde; Kontrol grubunda % 2,43 olan mitotik indeks değerinin 8  $\mu$ g/ml'de % 2,12'ye, 35 $\mu$ g/ml'de % 2,08'e ve 60  $\mu$ g/ml'de ise % 1,36'ya düşüğü görülmektedir. (tablo-1).

Deney ve kontrol gruplarına ait bulgular üzerinde yapılan istatistiksel değerlendirmelerde: artan trimethoprim dozuna paralel olarak mitotik indeks düşerken ( $P<0,01$ ), mitotik indeks oranları uygulama süresi artışından etkilenmemiştir( $P>0,05$ ). Bu nedenle yaptığımız değerlendirmelerde uygulama süresi artışı dışlanarak trimethoprim dozu artışı esas alınmıştır.

Trimethoprimin sigara içen bireylerde mitotik aktiviteye etkilerini belirlemeye çalıştığımız II.

aşamada, deney ve kontrol grubuna ait bulgular genel olarak incelendiğinde; Kontrol grubunda % 1,76 olan mitotik indeks değerinin 8 µg/ml'de %

1,46'ya, 35 µg/ml'de % 1,37'ye ve 60 µg/ml'de ise % 1,06'ya düşüğü görülmektedir. (tablo-2).

**Tablo-2: Trimethoprimin sigara içen bireylerde mitotik aktiviteye etkilerine ait genel sonuçlar.**

| Doz<br>Süre       | Kontrol      | 8µg/ml       | 35µg/ml      | 60µg/ml     | $\Sigma x$<br>$X$ |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------------|
| 6 saat            | 2,2          | 0,9          | 1,0          | 0,7         |                   |
|                   | 1,7          | 1,6          | 1,0          | 1,0         |                   |
|                   | 1,9          | 1,8          | 1,6          | 1,0         |                   |
|                   | 2,0          | 1,2          | 1,9          | 1,5         |                   |
|                   | 1,5          | 1,2          | 1,1          | 1,0         |                   |
| $\Sigma x$<br>$X$ | 8,30<br>1,66 | 6,70<br>1,34 | 6,60<br>1,32 | 5,2<br>1,04 | 26,8<br>1,34      |
| 24 saat           | 2,0          | 1,8          | 1,2          | 1,0         |                   |
|                   | 1,8          | 1,6          | 1,4          | 1,5         |                   |
|                   | 1,6          | 1,3          | 1,3          | 1,2         |                   |
|                   | 1,7          | 1,1          | 1,3          | 1,2         |                   |
|                   | 1,6          | 1,4          | 1,6          | 1,9         |                   |
| $\Sigma x$<br>$X$ | 8,70<br>1,74 | 7,2<br>1,44  | 6,80<br>1,36 | 5,8<br>1,16 | 28,5<br>1,42      |
| 48 saat           | 1,7          | 1,8          | 2,0          | 0,9         |                   |
|                   | 1,6          | 2,4          | 1,3          | 1,6         |                   |
|                   | 1,6          | 1,1          | 1,1          | 0,8         |                   |
|                   | 2,0          | 1,5          | 1,2          | 0,9         |                   |
|                   | 1,5          | 1,2          | 1,6          | 0,8         |                   |
| $\Sigma x$<br>$X$ | 8,40<br>1,68 | 8<br>1,6     | 7,2<br>1,44  | 5<br>1      | 28,6<br>1,43      |
| $\Sigma x$<br>$X$ | 26,4<br>1,76 | 21,9<br>1,46 | 20,6<br>1,37 | 16<br>1,06  |                   |

Sigara kullanımının mitotik aktiviteye etkilerini belirlemek için II. aşamanın farklı doz-süre kombinasyonuna ait değerler, I. aşamadaki kendisine parellilik gösteren değerlerle istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; tüm doz-süre kombinasyonları için sigara içenlerdeki mitotik indeks değerlerinin - sigara içmeyenlerinkinden daha düşük olduğu saptanmıştır ( $p<0,05$ ).

### TARTIŞMA

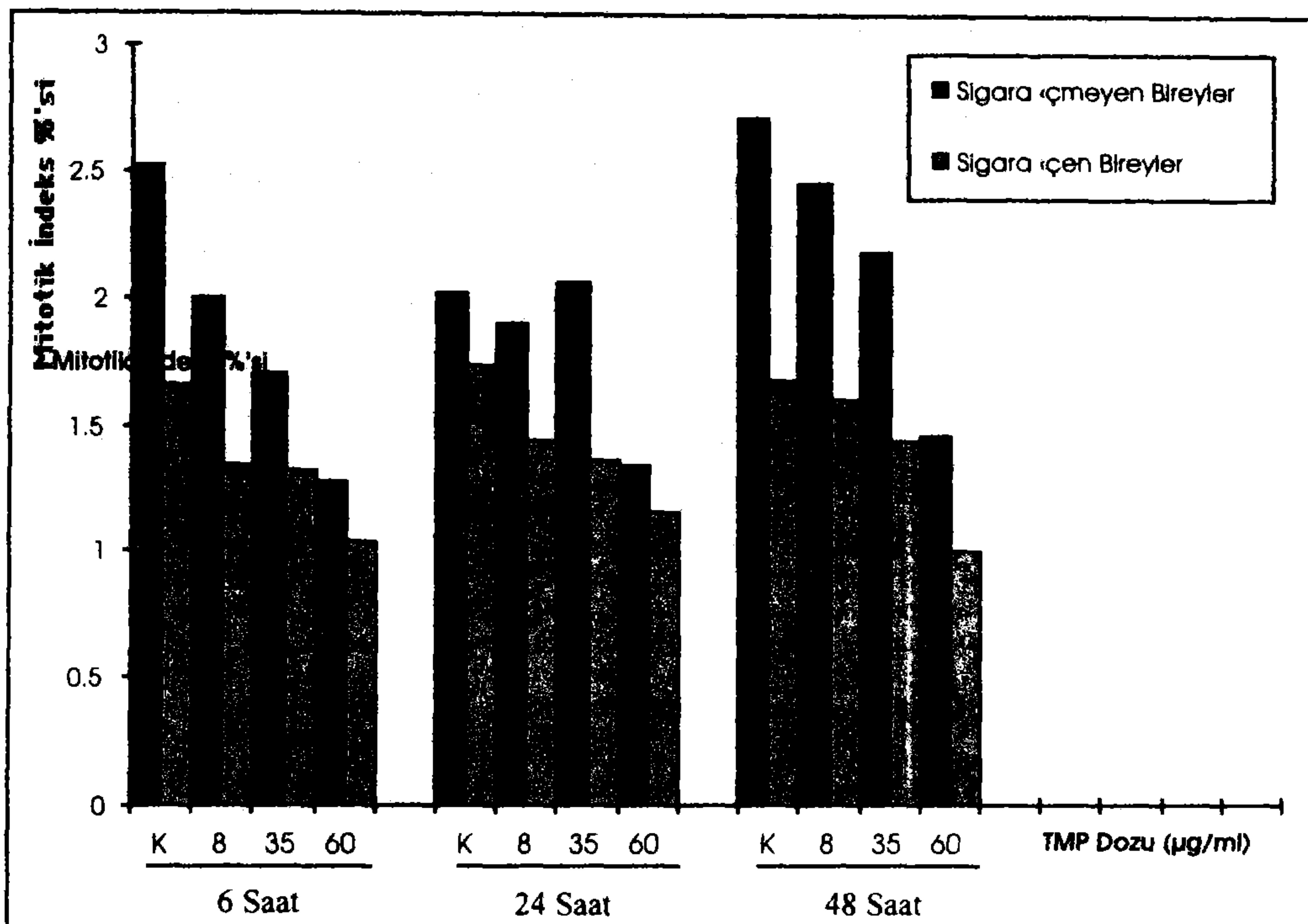
Bu çalışmanın her iki aşamasında da, artan TMP dozuna paralel olarak mitotik indeksin önemli ölçüde düşüğü ( $p<0,01$ ), ancak uygulama süresindeki artıştan etkilenmediği belirlenmiştir ( $p>0,05$ ). Sigara

kullanımı + trimethoprimin mitotik aktivite üzerine etkilerini belirlemek için yapılan ikinci aşamaya ait bulgularımızı - trimethoprimin mitotik aktiviteye etkilerini belirlemek için yapılan birinci aşamanın aynı doz süre kombinasyonlarına ait değerler karşılaştırıldıklarında II. aşamaaki bulguların istatistiksel açıdan daha düşük ( $p<0,05$ ) olduğu belirlenmiştir (şekil 1).

TMP'nin mitotik aktiviteye etkilerinin belirlendiği I. aşamada; her bir doz süre kombinasyonu için 1 000 adet olmak üzere, her bireyden 12 farklı doz-süre kombinasyonu olduğundan 5 birey için toplam 60 000 adet hücre değerlendirmeye alınmıştır. Mitotik indeks oranları

ortalaması kontrol gruplarında % 2,43 olmasına karşın, 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'de % 2,12, 35  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'de % 2,08 ve 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik doz grubunda ise % 1,36'ya kadar düşmüştür. Yapılan yayın taramasında TMP ile

sigara kullanımının mitotik aktivite kombine etkileri konusunda herhangi bir çalışma saptanamamıştır. Ancak, TMP'nin mitotik aktiviteye etkilerine degenen çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.



**Şekil - 1.** iki aşamadaki farklı doz-süre kombinasyonlarına ait mitotik indeks oranlarının karşılaştırılması.

Bjoranson ve arkadaşları (9), 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik TMP dozunu invitro uyguladıklarında granülosit oluşumunun % 47 oranında yavaşladığını belirlemişlerdir. Murdia ve arkadaşları (10), 160 mg TMP + 800 mg Suphamethoxazol'ü 7-10 gün uyguladıkları bireylerde sperm oluşumunun % 6,7 - % 88 arasında azaldığını belirlemişlerdir. Golde ve arkadaşları (5), 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  TMP'nin invitro koşullarda eritrosit oluşumunu % 55 ve granülosit ise % 50 azalttığını belirlemiştir. Chanarin ve England (11), 320 mg TMP + 1600 mg SMX'in invitro uygulanmasından sonra kandaki nötrofil, retikülosit ve plateletlerin miktarında önemli düşmeler olduğu belirlenmiştir. Steinberg ve arkadaşları (12), 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  TMP + 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  SMX'in invitro uygulanmasından sonra eritrosit oluşumunun önemli ölçüde blokaja uğradığını ve bu blokajın % 17'sinin G<sub>1</sub>, % 68'inin S ve % 15'inin ise G<sub>2</sub> fazında olduğu belirlenmiştir.

Yaptığımız bu çalışmada artan TMP dozuna paralel olarak lenfositlerde mitotik indeksin düşüğü şeklindeki bulgumuz, 5, 9, 11 ve 12 numaralı

yayılardaki diğer kan hücrelerinde de mitotik indeksi yavaşlatığı ve düşürdüğü şeklindeki bulgularla birbirini desteklemektedir. 10 numaralı yayında ise TMP'nin aynı etkiyi sperm oluşumunda da gösterdiği belirtilmektedir. Söz konusu yayılardaki hücre tiplerinin ve dozların farklı olması nedeni ile oranlar arasında bir kıyaslamaya gidilememiştir.

TMP ve sigara kullanımının mitotik aktiviteye kombine etkilerinin belirlendiği II. aşamada; her bir doz süre kombinasyonu için 1 000 adet olmak üzere, her bireyden 12 farklı doz-süre kombinasyonu olduğundan 5 birey için toplam 60 000 adet hücre değerlendirmeye alınmıştır. Mitotik indeks oranları ortalaması kontrol gruplarında % 1,76 olmasına karşın, 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'de % 1,46, 35  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'de % 1,37 ve 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik doz grubunda ise % 1,06'ya kadar düşmüştür. Yapılan yayın taramasında TMP ile sigara kullanımının mitotik aktivite kombine etkileri konusunda herhangi bir çalışma saptanamamıştır. Bu nedenle bulgularımızı kıyaslama olanağı bulunmamaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Gleckman R, Blagg N, Joubert DW: Trimethoprim mechanisms of action, antimicrobial activity bacterial resistance, pharmacokinetics, adverse reactions and therapeutic indications. *Pharmacotherapy*. 1981; 1: 14-20.
2. Lambie DG, Johnson RH: Drugs and folate metabolism. *Drugs*. 1985; 30: 145-155
3. Kayaalp SO: Rasyonel Tedavi Yönünden Tibbi Farmakoloji III. Cilt 5.baskı, Ankara: Feryal Matbaası, 1990: 2341-2357.
4. Goodman LS, Gilman A: Trimethoprim-sulphamethoxazole. The pharmacological basis of therapeutics (Fifth edition). Mac Millan Publishing Co., Inc. *Antimicrobial Agents*. 1975; 1124-1127.
5. Golde DW, Bersch N, Quan SG: Trimethoprim and Sulphamethoxazole inhibition of haematopoiesis in vitro. *British J. of Haematol.* 1978; 40: 363-367.
6. Hitchings GH: Mechanism of action of trimethoprim-sulfamethoxazole-I. *J. Inf. Dis.* 1973; 128:433-436.
7. US Department of Health and Human Services, The Health Consequences of Smoking: Cancer: A Report of Surgeon General US Government Printing Office, 1982.
8. Hopken JM, Evans HJ: Cigarette smoke condensates damage DNA in human lymphocytes. *Nature*. 1979; 279:241-248.
9. Bjorlonson BH, Mcintyre AP, Harvey JM, Tauber AI: Studies of the effects of trimethoprim and sulphamethoxazole on human granulopoiesis. *Am. J. Haematol.* 1986; 23: 1-7.
10. Murdia A, Mathur V, Kothari LK, Singh, KP: Sulphamethaksazole-trimethoprim combinations and male fertility. *Lancet*. 1978; 2:375-376.
11. Chanarin I, England JM: Toxicity of trimethoprim - sulfamethoxazole in patients with megaloblastic haemopoiesis. *British Med. J.* 1972; 1: 651-653.
12. Steinberg SE, Campbell CL, Rabinovitch PS, Hillman RS: The effects of trimethoprim - sulphamethoxazole on friend erythroleukemia cells. *Blood*. 1980; 55:501-504.