

The micronucleus test: method and its application in human cell in culture as well as diagnosis of patient with chromosome breakage diseases

Oentoeng Iskandar, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20277469&lokasi=lokal>

Abstrak

ABSTRAK

Sel limfosit darah perifer dan sel fibroblast kulit manusia, yang telah dibenihkan dapat dipakai untuk penelitian mutagenita in vitro. Begitu pula SCE dapat digunakan sebagai titik akhir biologik untuk mengukur mutagenitas beberapa agens. Pambenihan sel limfosit darah perifer mudah dan sederhana. Oleh karena itu sel limfosit merupakan bahan pilihan terbaik untuk menganalisa kromosom dalam pemeriksaan rutin diagnostik sitogenetik. Pada keadaan-keadaan tertentu, misalnya pada pemeriksaan "point mutation" pambenihan sel fibroblast sangat diperlukan. Penelitian-penelitian yang dikemukakan dalam tesis ini diawali dengan usaha untuk mengembangkan suatu metoda baru yang lebih baik, untuk mendeteksi micronucleus didalam sel darah limfosit perifer, sehingga dapat digunakan untuk mengukur efek-efek mutagen. Karena micronucleus itu berasal dari fragmen kromosom yang tidak mengandung sentromir, sehingga ditinggalkan di dalam sitoplasma "daughter cell" pada mitosis, maka adalah penting pada metoda yang diperbaiki itu, untuk mempertahankan keutuhan sitoplasma sel limfosit. Pencampuran sel darah limfosit perifer dengan suatu larutan hipotonik lemah, merupakan suatu langkah penting untuk mempertahankan agar sitoplasma itu tetap utuh. Secara eksperimental dapat ditemukan bahwa larutan hipotonik lemah tersebut ialah suatu campuran garam faali (0,98 natrium klorida) dan 5,6 gr/l kalium klorida dengan perbandingan 10 dan 1. Campuran ini ternyata mempunyai tekanan osmotik sebesar 285 milliosmol. Bila metoda ini digunakan, maka membedakan suatu struktur yang mirip micronucleus (umpama fragmen dari sel yang sedang mengalami kemunduran dan akan mati) dan micronucleusnya sendiri tidaklah sukar lagi. Ternyata metoda yang telah diperbaiki ini dapat pula diterapkan pada sel fibroblast manusia, untuk mempertahankan agar sitoplasma itu utuh, sehingga micronucleus yang terletak didalamnya dapat dideteksi. (lihat karangan IV dan gambar 16). Sel fibroblast itu berubah menjadi hulat, dengan sitoplasma yang utuh. Bila didalamnya terdapat micronucleus, akan tampak jelas. Frekuensi micronucleus spontan pada penderita "chromosomal breakage disease" (Fanconi's anemia, karangan IV; Blackfan Diamond, karangan II; Down's syndrome, karangan VI) dengan mudah dapat ditentukan. Ternyata frekuensi spontan pada penderita penyakit tersebut lebih tinggi daripada pada orang normal. Karena micronucleus itu didalam sitoplasma dapat tinggal lama, maka sel yang mengandungnya dapat diperiksa dari pambenihan, pada saat mana saja setelah proses tersebut dimulai. (Yang optimum adalah 72 jam setelah dibenihkan). Dari penelitian dapat disimpulkan bahwa frekuensi micronucleus spontan dapat digunakan untuk mendeteksi adanya suatu "chromosome breakage syndrome". Kesederbanaan atau mudahnya tehnik yang diperbaiki ini sebagai metoda untuk pemeriksaan atau pengukuran efek-efek mutagen dapat dilihat dari makalah II dan VI untuk MMC dan sinar X, makalah III untuk Aflatoxin B1, serta karangan IV untuk acetaldehida dan akhirnya karangan V untuk EMS dan MMC. Peningkatan efek-efek mutagen Aflatoxin B1 oleh "S9 mix" dapat diukur dengan frekuensi MN yang meningkat, hal mana dapat dipelajari di makalah III. Analisa kelainan astruktur kromosom dan

frekuensi MN (yang timbul karena dirangsang) pada penderita Down's syndrome dan pada orang normal disajikan dalam tulisan VI. Didalam eksperimen ini ditunjukkan pula kepekaan sel limfosit darah penderita Down's syndrome pada sinar X. yang menunjukkan adanya hubungan dengan umur, serta refleksinya dapat terlihat pada frekuensi disentrik dan M yang meninggi. Data yang diperoleh, memperlihatkan pula kesimpulan-kesimpulan Hedrile yang menyatakan bahwa meningkatnya frekuensi MN lebih merupakan refleksi kelainan jenis "exchanges" daripada frekuensi " chromosome breaks ". Suatu kesan yang kuat tentang kemungkinan adanya suatu respons in vitro yang berbeda dan bersangkut-paut dengan sex, disajikan dalam karangan VI. Tidak adanya perbedaan respons semacam itu untuk MMC, juga disajikan dalam karangan tersebut. Pada penelitian ini meningkatnya frekuensi M yang berbeda antara pria dan wanita akibat exposure pada EMS, merupakan bukti adanya perbedaan yang berkaitan dengan sex. Kesimpulan ini diperkuat dengan analisa dari frekuensi SCE yang meninggi pada wanita, akibat pemaparan sel limfosit A nya pada BMS. Frekuensi MN akibat pemaparan pada EMS, menunjukkan perbedaan yang menyolok antara pria dan wanita, tetapi tidaklah demikian halnya dengan response terhadap MMC. Karena data SCE tidak dapat dihasilkan untuk donor VI, suatu kesimpulan yang tegas belumlah dapat dibuat. Tetapi penemuan lain, menimbulkan dugaan yang kuat tentang adanya suatu respons yang berbeda terhadap EMS bagi pria dan wanita, tetapi tidak untuk MMC. Hasil-hasil yang didapat dari semua eksperimen menunjukkan bahwa metoda yang diperbaiki untuk mendeteksi MN dalam sel limfosit manusia dan sel fibroblast itu mudah, cepat dan dapat disesuaikan dengan tujuan suatu penelitian. Karenanya faedah dari metoda ini dihari kamudian nampaknya besar. Jadi apa yang diramalkan dalam hipotesa itu ternyata benar.

<hr>

ABSTRACT

Peripheral blood lymphocytes and cultured skin fibroblasts can be used as materials for in vitro mutagenicity studies, using chromosomal aberrations, micronuclei, as well as SCEs as biological endpoints for assessing mutagenicity of diverse agents. However, for routine diagnostic cytogenetic work, in clinics culture of peripheral blood lymphocytes is really the material of choice, in view of the ease and simplicity with which they can be cultured and processed for chromosomal analysis. In some situations, such as point mutation studies, culture of fibroblasts is essential. The studies in this thesis were initiated to develop an improved method for the detection of MN in peripheral human lymphocytes, which can be used for assaying effects of mutagens. As a micronucleus is left behind in the cytoplasm of a daughter cell following cell division, it should be important in an improved method to preserve the cytoplasm of the lymphocytes intact. Mild hypotonic treatment was found to be the important step in preserving cytoplasm. This mild hypotonic solution consists of a mixture of physiological saline (0.9% sodium chloride) and 5,6 gr/l potassium chloride with a proportion of 10 to 1, of which the osmotic pressure was found to be 285 milliosmol.

To distinguish an intracytoplasmic localized micronucleus and other structures resembling M is very easy by this method. This improved method seems also to be applicable for human fibroblasts, with regard to preserving the cytoplasm intact for detecting a micronucleus (see paper IV and figure 16), The fibroblasts are transformed to a spherical shaped cell with an intact cytoplasm and a micronucleus inside when present. The frequencies of spontaneous M in normal individuals, and in patients with chromosomal breakage

disease (Fanconi's anemia, paper IV; Blackfan Diamond, paper II; and Down's syndrome paper VII), can be easily determined. The frequencies are higher in chromosomal breakage syndrome when compared to normal. Since MN persists for a long time, a larger number of cells carrying them can be scored in the culture at any time following initiation. From these studies we can conclude that the frequencies of spontaneous MN can be used easily for detection of a chromosome breakage syndrome. The ease with which the improved method can be used as a method of assay for effects of mutagens are also demonstrated in papers II, VI, VII for MMC and X-ray irradiation, paper III for Aflatoxin B1, paper IV for acetaldehyde, paper VI for EMS and MMC.

The enhancement of effect of Aflatoxin B1 by S9 mix, assessed by the frequencies of induced MN, is also shown in paper III.

An analysis of the induced chromosomal aberrations and micronuclei in Down's syndrome patients and in normal individuals is presented in paper VII. In this experiment is shown the age related sensitivity the patients to X-ray, which is reflected in the yield of both dicentrics and micronuclei: Our data also support Heddle's conclusion that the increase of frequencies of micronuclei is more a reflection of the exchange type of aberrations, than the frequencies of chromosome breaks.

A strong suggestion about the possible existence of a sex related difference of in vitro responses between male and female to aus is presented in paper VI. The absence of such difference for MMC is also shown in that paper. In this study, the differential increase of frequencies of induced M , following exposure to EMS between male and female, provides some evidence to conclude a sex related difference of responses. This conclusion is supported by the analysis of the frequencies of induced SCEs (for each treatment as well as controls) The frequencies of induced HN, show a considerable difference between male and female donors, which is not the case following exposure to MMC. As SCE data are not available for donor VI, a firm conclusion cannot be reached as yet. But the other findings, strongly suggest the existence of a sex related response to EMS, but not for MMC.

The results obtained from all experiments indicate that the improved method for the detection of MN in human lymphocytes and fibroblasts, is easy, fast and adaptable to the aim of an investigation. Therefore the utility of this method in the future investigations appears to be high, It is clear, that what is stated in the hypothesis is true.