

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyoloji Anabilim Dalı
Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Turgay BUDAK

SİGARA TİRYAKİLERİNDE BLEOMYCİN'İN KROMOZOMAL DÜZENSİZLİKLERE ETKİSİ

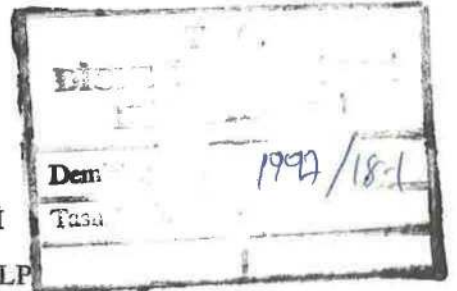
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)



Araş. Gör. Diclehan ÖKTÜREN ORAL

TEZ YÖNETİCİSİ

Yrd. Doç. Dr. Nail ALP



TEŞEKKÜR

İlgi duyduğum bir konuda çalışmamı sağlayan, yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve bu çalışmanın ortaya çıkmasında bana yol gösteren, yardımlarını esirgemeyen D.Ü.Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Sayın Prof.Dr.Turgay BUDAK'a

Çalışmalarım süresi boyunca ilgi ve yardımlarını gördüğüm, değerli hocam Sayın Prof.Dr.Ali KELLE'ye, tez yöneticim Sayın Yrd.Doç.Dr.Nail ALP'e ve istatistiksel değerlendirmede bilgilerinden yararlandığım Sayın Prof.Dr.Yusuf ÇELİK'e

Ve çalışmamdaki katkılarından dolayı Sayın Uzman Mehmet FİDANBOY'a ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Araş.Gör.Diclehan ÖKTÜREN ORAL

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1.Bleomycin Hakkında Genel Bilgiler	5
2.1.1.Bleomycin'in Kimyasal Yapısı	5
2.1.1.1.Klinik Olarak Kullanılan Bleomycin Sülfatın Spesifikasyonu	6
2.1.2.1.Stabilite	6
2.1.2.Bleomycin'in Etki Mekanizması	6
2.1.2.1.Bleomycin Aksiyon Mekanizması	7
2.1.2.2.Hücreler Üzerine Etkileri	8
2.1.2.3.Makromolekül Sentezi Üzerine Etkileri	8
2.1.2.4.Hücre Döngüsü ve Bleomycin Aktivitesi	8
2.1.2.5.Hücre Morfolojisi Üzerine Etkileri	9
2.1.3.Bleomycin Farmakokinetiği	9
2.1.3.1.Absorbsiyon ve Dağılım	9
2.1.3.2.Metabolizma ve Boşaltım	9
2.1.4.Bleomycin Kullanılışı ve Klinik Toksite	10
2.1.5.Bleomycin'in Genotoksitesi	10
2.1.6.Kromozom Efektleri	10
2.1.7.Bleomycin'in İmmunofarmakolojisi	11

2.2.Sigara Kullanımı	11
2.2.1.Sigara İçmenin Kromozomal Etkileri	12
2.3.Kromozomal Hakkında Genel Bilgiler	13
2.3.1.Kromozomların Morfolojik Özellikleri	13
2.3.2.Kromozomların Adlandırma Sistemi	13
2.3.3.Kromozom Düzensizlikleri	14
3.GEREÇ ve YÖNTEM	18
3.1.Gereç	18
3.1.1.Araştırma Populasyonu	18
3.1.2.Kimyasal Maddeler	18
3.1.3.Solüsyonlar	19
3.1.4.Kültür Ortamı	20
3.1.5.Diğer Gereçler	20
3.2.Yöntem	21
3.2.1.Kromozom Elde Etme Yöntemi	21
3.2.2.Değerlendirme	24
3.2.3.1.Preparatların Değerlendirilmesi	24
3.2.3.2.İstatistiksel Değerlendirme	25
4.BULGULAR	26
4.1.Düzensizlik İçeren Hücrelere Ait Bulgular	28
4.2.Yapısal Kromozom Düzensizliklere Ait Bulgular	31
4.2.1.Yapısal Kromozom Düzensizliklerin İstatistiksel Değerlendirilmesi	34
4.2.1.1.Yapısal Kromozom Düzensizliklerin Hata Kareleri Ortalamasına Göre Belirlenmesi	35

4.2.1.2.Yapısal Kromozom Düzensizliklerin Etkileşime Göre Belirlenmesi	36
4.2.1.3.Ortalamalar Arası Farkın Önem Kontrolü	37
4.2.2.Yapısal Düzensizliklerin Kromozom Gruplarına Göre Dağılımı	38
4.3.Sayısal Kromozom Düzensizliğine Ait Bulgular	40
4.3.1.Süre Dışlandığında Doz Faktörünün Poliploid Hücre Oluşumuna Etkisi	40
4.4.Satellit Assosiasyonlarına Ait Bulgular	42
4.5.BULGULARA AİT ÇİZELGE VE ŞEKİLLER	44
5.TARTIŞMA	54
5.1.Sayısal Kromozom Düzensizlikleri	54
5.2.Düzensizlik İçeren Metafaz Oranları ve Yapısal Kromozom Düzensizlikleri	54
5.2.1.Kontrol Grubu	54
5.2.2.Doç Gruları Bulguları	57
5.3.Kromozom Grularına Göre Yapısal Kromozom Düzensizlikleri	58
5.4.Satellit Assosiasyonları	59
6.SONUÇ	60
7.ÖZET	62
8.SUMMARY	63
9.KAYNAKLAR	64

1.GİRİŞ

Eski çağlardan günümüze kadar ulaşan bilimsel yöntemlere temel olan biyolojik bilimler günden güne birçok araştırmacı tarafından değişik boyutlarıyla incelenmektedir. Bilim ve teknolojiadaki gelişmeler günümüzde en hızlı gelişim sürecini yaşamaktadır.

Yirminci yüzyıla bilgisayar çağı olarak baktığımızda; bugün hafızasında yüzbinlerce bilgi saklayan ve son derece karmaşık işleri bir anda çözen dev bilgisayarlar geliştirilmiştir. Fakat canlıları incelediğimizde bir tek hücrenin yaptığı işe bakacak olursak hiçbir bilgisayarın erişemeyeceği düzeyde olduğunu görürüz. Hücrenin yapı ve işlevini anlamak için çalışmalar moleküler düzeyde olmuştur. Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar "Genetik" bilim dalının ortaya çıkmasına neden olmuştur.

Genetiğin babası sayılan Mendel'in ve diğer birçok araştırmacının yaptıkları deneyler sonucu canlıların tüm özelliklerinin kuşaktan kuşağa "Gen" adı verilen maddelerle taşındığı bilinmektedir (5). Genlerin kromozomlar üzerinde bulunduğu Griffith tarafından bulunmuştur.

Yeryüzündeki yüzbinlerce canlı türünün birbirinden farklı olmasını sağlayan en önemli faktör, türe özgü kromozom sayısı ve kromozomlar üzerinde bulunan genlerin sayısı ve dizilişlerindeki farklılıktır.

Hücre nükleusunda bulunan hayatın ve canlılığın sırrı DNA adı verilen genetik materyalin yapısında yeralan dört bazın (A.G.T.C) milyonca değişik dizilişinde ve her dizilişin belirli bir boyutsal anlam ifade edişinde gizlidir (21).

Moleküler genetik alanında yeni araştırma yöntemi olarak kısa süre önce yerini almış olan "Gen klonlama sistemleri" ve "Polimeraz Zincir Reaksiyonları (PCR)" DNA haritalarının çıkartılması çalışmalarına katkılarıyla moleküler genetik çalışmalarda devrim sayılabilecek bir süreci başlatmıştır (64).

İlk kez 1986 yılında Renato Dalbecco tarafından "İnsan genomunun tümünün nükleotid dizisinin saptanması gerekir" şeklinde öne sürmüştüğü sav kısa süre sonra hayata geçirilmeye başlanmıştır. 1990 yılında insan genom projesi için zaman

işlemeye başlamıştır. İnsan genom projesinin işlemeye başlaması ile mitokondrial; DNA dışında boyutları 80-300 milyon baz çifti arasında değişen 22 otozom ve 2 cinsiyet, kromozomlarına dağılmış bulunan 3.3 milyon civarında DNA baz çiftinin haritasının çıkartılması ve gen dizilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. İnsan genomunu oluşturan 100.000 genden 1991 yılı sonuna kadar 5000 gen çözümlenerek arşivlenmiş, 1900 tanesinin bir kromozomla ilgili olduğu varsayılmış ve 600 tanesi de klonlanmış olarak elde edilmiştir (64).

Bilim dünyasında geçen her hafta için de ortalama 30 gen tanımlanarak nukleotid dizisi belirlenerek haritası çıkartılmaktadır.

Yaklaşık 2000 yılına kadar insan genomunu oluşturan 100.000 insan geninin katoloğunun tanımlanacağı tahmin edilmektedir (24,63).

DNA baz çiftleri esas alınarak DNA haritaları oluşturulmuştur. Bin baz çifti "Kilo baz", milyon baz çifti de "Mega baz" olarak adlandırılmıştır. DNA'nın organizasyonu- nu gösteren üç çeşit harita vardır.

Fiziksel haritalar: DNA molekülü kendine özgül enzimler tarafından kırılır. Bu enzimlere restriksiyon enzimleri denir. Hücrede bu enzimlerden yüzlerce çeşit belirlenmiştir. En basit fiziksel haritalar; spesifik restriksiyon enzimlerinin DNA molekülünü kestikleri noktalara göre yapılan DNA haritalarıdır. Restriksiyon haritaları, rekombinant DNA klonları ile istenilen DNA parçaları büyük miktarlarda saflaştırılmak suretiyle yapılmaktadır (20).

Sitogenetik haritalar: Günümüzde oldukça ilerlemiş bantlama teknikleri ile kromozomlar incelendiğinde her bir kromozoma özgü olan ve 45 (mega baz) çifti içeren değişik tonda boyanmış bant bölgeleri ayırtedilebilmektedir. Metafaz plaklarından hazırlanan karyotipler incelendiğinde bireylerdeki delesyon, rearanjman, translokasyon ve diğer anormallikleri gösteren görsel bir simgedir.

Genetik haritalar: Bağlantı haritaları olarak bilinirler ve belirli DNA aralığında genetik işaretlerin görece konumlarını yansıtır. İşaretler arası mesafe fiziksel uzaklıktan çok kalıtsal özelliklere dayanır. İki homolog kromozom parçasının

birbirinden ayırt edilmesinde ve bir kuşaktan sonraki kuşağa aktırılmasını izlemekte kullanılır (22,24,64,75).

DNA molekülünün yukarıda sözü edilen fiziksel ve genetik haritaların nukleotid seviyesinde ortaya çıkarılmasında klonlama sistemleri ve polimeraz zincir reaksiyonları kullanılmaktadır (22,24).

a) Klonlama sistemleri: Hızlı şekilde üreyen bir organizmanın DNA'sının üretilmesi istenilen ve özgün restriksiyon enzimleri ile kesilerek elde edilen yabancı DNA parçacığı eklenip konakçı DNA ile birlikte çoğaltılması ilkesine dayanır. Yeterince çoğaltılan DNA parçacığı izole edilerek elektroforetik yöntemlerle nukleotid dizisi belirlenebilir. Bir *Escherchia coli* plazmidine 10 kilo baz'dan küçük DNA parçaları eklenerek klonlanabilirken, kozmid plazmid adı verilen modifiye plazmidlerle 40-45 kb'lik DNA parçaları klonlanabilmektedir. En son gelişmelerle ise bakteri plazmidleri yerine YAC (Yeast Artificial Chromosome) adı verilen yapay maya kromozomları ile 100-1000 kb'lik DNA'ların klonlanması yapılabilmektedir (22,75).

b) Polimeraz Zincir Reaksiyonları: Kalıp olarak kullanılan DNA iplikçiklerine yüksek özgüllükle bağlanabilen iki sentetik oligonukleotid hedef DNA'yı sınırlar. DNA sentezi oligonukleotide doğru ilerler, DNA sentezi tanımlanmış örnek 90°C ısıtılarak çift sarmallı DNA molekülünün ayrılması (denatürasyonu) sağlanır.

Soğutma işlerinden sonra bu olay arka arkaya 25-40 kez tekrarlandığında genetik dizi şeklinde üssel bir artış söz konusu olduğundan örnek DNA parçacığından yüzbinlerde kopya elde edilmiş olur. Bundan sonraki aşamada örnek DNA parçacığının dizisi elektroforetik işlemlerle belirlenebilmektedir.

Kromozomlar üzerinde normalde inaktif halde bulunan ve onkogenler adı verilen genler bulunmaktadır. Şu güne kadar saptanabilen onkogenler 2,7,11,19 ve 22 numaralı kromozomlarda birer 8,12 ve 17 numaralı kromozomlarda 4 tane olmak üzere 50'nin üstündedir (3). Onkogenler normalde inaktif olup, bazı kemoterapötikler, radyasyon, sigara zehirleri ve rearanjmanların etkisiyle aktif hale gelebilmektedirler. Bazı kanser türleri ile kromozomal düzensizlikler arasında ilişkiler olduğu bilinmektedir (22,34).

Kanser, hücrelerin gereksiz ve zamansız olarak organizmanın düzenleme ve ayarlama mekanizmasının dışında, kontrol edilemeyen gelişme ve çoğalması sonucu oluşturdukları doku veya organın büyümesi ile karakterize olan geniş bir hastalık grubunu içerir. Kanserdeki en önemli sorun; gereğinden fazla oluşan ve denetlenmeyen hücre bölünmesidir (43,44). Kanser hücresinin bölünmesi normal dokulara göre farklıdır. Bütün enerji bölünmeye harcandığı için bölünme çok hızlı olmaktadır. Farklılaşmış hücrelerin hemen her türü kanser hücrelerine dönüşebilir.

Çalışmada kullandığımız "Bleomycin", kanser terapisinde kullanılan anti tümör aktiviteye sahip bir grup peptide verilen genel bir addır. "DNA" da ayrışmalara ve fragmantasyonlara (parçalanmalara) neden olurlar (6). Bleomycin, lenfoma ve testis kanserlerinde etkindir (6).

Biz çalışmamızda denekleri kronik olarak sigara kullanan sigara tiryakilerinden seçtik. Sigaranın ve bleomycinin tek başına ve kombine etkileşimleri sonucu neden oldukları kromozomal düzensizlikleri belirlemeyi amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Bleomycin Hakkında Genel Bilgiler

Streptomyces verticillus'un fermentasyonu ile üretilen, anti tümör ajanların önemli bir grubu olan bleomycin 1962 yılında Umezawa ve arkadaşları tarafından bulunmuştur (8,10,11,14,15,18,25,33,35,40,42,46,50,57,63,66,68,69,70).Halen klinik olarak kullanılan bakırın glikopeptidlerle chelatig bağ yaparak oluşturduğu karışımın predominant olarak iki kapalı ilgi ajanları, bleomycin A₂ ve bleomycin B₂ içeren bir ilaçtır (11,14,15,19). Bunlar A₁, A₂, A₃, A₄, A₅, A₆, A₂-b, A₂-a, B₁, B₂, B₄, B₅, B₆ olarak izole edilmiştir (6,28,65,74). Asit ve baz stabilitesi ile fleomisinden (Phyleomycin) ayırt edilir (11,14,15,19). İzole edilen bleomycin kompleksinin sülfür, kromofor ve bakır içerdiği bulunmuştur (15,69). Fleomisin D₁ ve E'nin oksidasyonu Bleomycin B₂ ve B₄'ü verir.

Hücrelerde serbest radikaller oluşturarak DNA zincirlerinde kırılmalara neden olur. Diğer antibiyotiklerden farklı olarak belirgin derecede döneme özgü etkinlik gösterir. En fazla G₂ döneminde etkilidir. Geç G₁, erken S ve M dönemlerinde de etkilidir.

Diğer birçok neoplastik ajanlarla karşılaştırdığımızda bleomycinin myelosuppressive ve immunosuppressive aktivitesi minimaldir (11,14,15,19). Nadiren kutanöz ve pulmoner toksiteye neden olur.

2.1.1.Bleomycinin Kimyasal Yapısı

Bleomycin suda eriyebilen, bazal glikopeptidleri birini diğerinden ayıran kendi terminal amin kısımlarıdır (11,14,15,19). Kimyasal yapısı hala tartışılmakta olduğu halde, şimdiye kadar bleomycin C, H, O, N ve S içeren bir glukolipid olduğu kabul edilmiştir (prospektüsten).

Bleomycinlerin tümü 5. amino asit, 1 amin, 1 glukoz ve 3-o-karbamil D-mannoz içerir ve terminal kısımları ile biri diğerinden ayrılır (15,70). Bleomycinler Cu⁺² ve Fe⁺² ile ekimolar kompleksler oluştururlar (11,14,15,19).

2.1.1.1.Klinik Olarak Kullanılan Bleomycin Sulfatın Spesifikasyonu

Birleşmiş Milletlerde klinik olarak kullanılan bleomycin yani blenoxane bakırı çeşitli bleomycin türlerinden ayırır (15,70). Blenoxane, 15 ünitelik şişelerde krema renkli bir toz halinde temin edilir. Etki gücü 1.2-1.7 ünit/mg arasındadır.

Daha önce 15 mg potens şeklinde bir miktar birimi kullanılmaktayken, şimdi daha değişik olan "ünit" terimi kullanılmaktadır. Blenoxane 15 ünit 15 mg potense, etki gücü de 1.2-1.7 ünit/mg arasındadır (7,30).

Blenoxane'nın %65'i bleomycin A grubu türlerini içerirken, total ağırlığının %35'i bleomycin B grubu türlerini içerir. Bleomycin A₁ ve B₂ tam ağırlığının sırası ile %55-70'ini ve %25-32'sini meydana getirir. Bakır içeriği %0.1 den daha azdır (7).

2.1.1.2.Stabilite

Lyofilize olan bleomycin sulfat tozu oda sıcaklığında 1-2 yıl stabildir. Ayrıca suda ve %5-10 dekstrozdaki solusyonda ve oda sıcaklığında en az 8 saat stabil olarak kalabilir (7). (Prospektüsten not! normal ısı derecelerinde (15-25°) bir yıl devam eder). Heparin içeren solüsyonlarda stabilitesi kanıtlanmamıştır (7).

Bleomycin saf vazelinde bozulmaz, iki yıl içinde aktivitesinin %7'si zarar görür. Fakat benzan ruhu veya dermobazda tamamen anstabildir (7).

2.1.2.Bleomycinin etki mekanizması

Bleomycin'in birçok ilginç biyokimyasal özellikleri var ise de onun yeteneği sitotoksik etkisinin sonucudur. İn vitro çalışmalar bleomycin hücrelerin hücre siklusunda G₂ fazında birikmesine neden olur ve bu hücrelerin çoğu kromozomal aberasyonlar gösterir; kromozomal kırıklar, gapler fragmentler ve translokasyonlar gibi bleomycin O₂ ve Fe⁺² ile etkileşmesi DNA'yı bölmeye neden oluyor gibi gözükmemektedir. Oksijen ve ditiotreitol gibi indirgen bir ajan varlığında metalbleomycin kompleksi bir ferröz oksidaz olarak aktive edilir. Fe⁺² den elektronları moleküler oksijene aktararak aktive edilmiş oksijen türevleri üretir (11,14,15,19).

Metalbleomycin kompleksinin flavin enzimi, reaksiyonu, NADPH-sitokrom P₄₅₀ reduktaz ile aktive edilebildiğinde gösterilmiştir. Bleomycin DNA'ya amino

terminal peptidi ile bağlanır ve aktive edilmiş kompleks serbest radikaller oluşturur. Bu radikaller DNA zincirinin bölünmesinden sorumludurlar (11,14,15,19).

2.1.2.1. Bleomycin Aksiyon Mekanizması

a) Aktive Spektrumu

Bleomycin'in çeşitli kaynaklardan izole edilen DNA üzerine etkili olduğu gösterilmiştir (8,11,14,15,16,18,33,37,39,42,46,68,70).

Bleomycin'in polinükleotidler üzerine etkileri, reaksiyon durumları ve deneme metodları; polinükleotidin baz kompozisyonu, molekül ağırlığı ve ikincil yapılarındaki değişikliklerle belirlenmiştir (7).

Tek zincirli deoksi-polinükleotidler genellikle çift zincirli moleküllerden daha çabuk bozulmaya uğrarlar (7).

Doğal olarak oluşan RNA ve sentetik poliribonükleotidler bleomycin ile bozulmazlar (15,68).

Mueller ve arkadaşları bleomycin'in DNA'ya bağlı DNA polimeraz enzimini ve RNA'ya bağlı DNA polimeraz enzimini inhibe ettiğini göstermektedirler (68).

İnhibisyon DNA üzerine olmaktan daha fazla enzim üzerine etkilidir (15,68).

b) Reaksiyon Karakteristikleri

Optimal aktiviteye sahip olabilmek için bleomycin serbest bakır içermelidir. Reaksiyon karışımına EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit), Cu^{++} ve Zn^{++} eklenmesi DNA bozulmasını engeller, fakat aynı şey magnezyum için geçerli değildir (15,33).

Her ne kadar DNA zincirindeki kırılmalar katalizör yokluğunda meydana gelse de, oksitleyici ve redükleyici ajanları varlığında DNA bozulması önemli derecede uyarılır. Çok sık olarak kullanılan katalizör 2-merkaptetanoldür. Dithiothreitol, askorbik asit, sulfhidril ve hidrojen peroksitin de DNA bozulmasını yani bleomycin aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (15,31,33,37).

DNA bozulması için optimal pH aralığı 7-8 dir.

2.1.2.2.Hücreler üzerine etkileri

a) Büyümenin inhibisyonu

Bleomycin geniş bir antiviral ve antibakteriyel spektruma sahiptir. Bleomycinin virüsler, bakteriler ve memeli hücrelerinin replikasyonunu engellediği gösterilmiştir. Birçok gram pozitif ve gram negatif bakterileri, T₄ fajının ve SV₄ virüslerinin replikasyonunu engeller (11,15).

Bleomycin tümör büyümesini engelleyerek anti-tümör, antineoplastik aktivite gösteren bir ilaçtır (11,14,15,18,39,70).

Normal karaciğer hücrelerinin ve PHA (phytohemagglutinin) ile uyarılan lenfositlerin blastogenezisini de engeller (15,40).

2.1.2.3.Makromolekül Sentezi Üzerine Etkileri

a) DNA Sentezi:

Bleomycin duyarlı hücrelerdeki DNA sentezini inhibe eder. Ayrıca bleomycinin in vivo DNA sentezini de inhibe ettiği ispatlanmıştır (9,14,15,37,42,46,68).

b) RNA Sentezi:

RNA sentezi, DNA sentezine göre bleomycin ile daha az inhibisyona uğrar, Fare L hücrelerinde 100 µg/ml'lik yüksek bir konsantrasyonda RNA sentezinin inhibisyonu başarılmıştır (9,14,15,37).

c) Protein Sentezi:

Protein sentezinin inhibisyonu DNA sentezinin inhibisyonununa göre daha azdır (7,15,35).

2.1.2.4.Hücre Döngüsü ve Bleomycin Aktivitesi

Hücre döngüsünde S fazı hücreleri ilaca orta derecede duyarlı iken, M ve G₂ fazlarının bleomycine çok duyarlı oldukları bildirilmiştir (4,15,18,39,40,42,46,70). G₁ fazının hücre döngüsünün en az duyarlı fazı olduğu gösterilmiştir. Hücre siklusu içindeki farklılığın veya fazlar arası duyarlılık farkının nedeni bilinmemektedir. Bleomycin'in neden olduğu kromozom aberasyonlarının interfaz hücrelerde oluşturduğu, fakat genellikle mitotik hücrelerde biriktiği söylenebilir.

2.1.2.5.Hücre Morfolojisi Üzerine Etkileri:

Bleomycin en fazla lymphatic dokuda hasar yapar (64). Bleomycin ile muamele edilen bakteri hücrelerinin büyümesi ve polynuclear dev Hela ve L hücrelerinin oluşması gösterilmiştir (15).

Bleomycinin etkisi Hela S3 hücrelerinin büyüme döngüsüne bağlıdır (15,27).

Bleomycin hücre membranının fonksiyonlarını da bozar (65).

2.1.3.Bleomycinin Farmakokinetiği

2.1.3.1.Absorbsiyon ve Dağılım

Bleomycin, subkutan, intramuskuler ve intravenöz olarak uygulanır (6,25,28, 65,74).

İlacın cisplatin, vinplastin gibi bazı ilaçlarla beraber kullanıldığı, testiküler kanserlerde gösterilmiştir. Böylece testiküler karsinomada bleomycin küratif tedavisinin ancak 1/3'ünü oluşturur (68,74). Etki spektrum oldukça geniştir. Kombinasyon halinde Hodgkin ve diğer lenfomalarda, testis tümörlerinde, mesanenin yüzeysel kanseri, baş ve boyun kanseri ve serviks kanserinde etkilidir (6,29,65,73).

Mide ve barsak kanalında absorbe edilmez (29). Merkezi sinir sistemine giremez.

2.1.3.2.Metabolizma ve Boşaltım

Bleomycin kan ve beyin bariyerini geçmez. Bleomycin değişik tümörlere lokalize olur. Bu da bu bölgelerde inaktive edici enzim seviyesinin daha düşük olduğu fikrini verir.

Bleomycin intramuskuler uygulandığında kandaki düzeyi 30-60 dakika için en yüksek seviyeye ulaşır (28).

Eliminasyon yarı ömrü yaklaşık olarak 3 saattir.

Normal ve tümör dokularında 24 saat içinde anında aktif ilaç olarak yaklaşık %50'si geri emilir (28).

2.1.4.Bleomycinin Kullanılışı ve Klinik Toksite

Testiküler karsinomların tedavilerinde bleomycin etkili tedavi edicidir. Bleomycin tek verildiğinde ayrıntılı tepki oranı yaklaşık olarak %30 dur. Bu ilaç vinblastin ile verildiğinde tepki oranı %90 kadar artar. Cisplatinin bu sisteme eklenmesi ile hastaların çoğu iyileşir.

Bleomycin sulfate (Bleomycin) 15 ünitelik flakonlarda toz halinde temin edilebilir. Tavsiye edilen dozu 10-20 ünit/m² dir. İlaç intravenöz veya intramusküler olarak uygulanır. Bu uygulama haftada bir veya iki kez yapılır. Böbrek yetmezliği olan kişilerde doz ayarlanmalıdır.

Bazı neoplastik ajanların aksine bleomycin minimal düzeyde kemik iliği toksisitesine neden olur. En önemli toksik etkisi akciğerde pnomoni yapmasıdır. Bu durum akciğer fibrozisine dönüşebilir. Akciğer komplikasyonu, tedavi edilenlerin yaklaşık %10'un da ortaya çıkar ve özellikle akciğer fonksiyonu yetersiz yaşlı hastalarda ölümle sonuçlanabilir. Hiperpigmentasyon, ciltte kalınlaşma, el ayası ve dirseklerde hiperkeratoz gibi cilt lezyonlarına, sıklıkla neden olmaktadır (29).

2.1.5.Bleomycinin Genotoksitesi

Bleomycin tek genotoksik etkili bir radiometil anti-tümör ajandır. Bleomycin birçok aminoasit ve şeker içeren ve değişik analoglara neden olan terminal aminli glikopeptiddir. Değişik analoglar arasında aktivitede birkaç önemli farklılık bulunmuştur. Bleomycin, klinik formülü başlıca A₂ ve B₂ karışım komponentleridir. Klinik kemoterapide bu ilacın uygun kullanılması onun genetik toksitesi için oldukça anlamlıdır (45).

2.1.6.Kromozom efektleri

1970 yılında Ohana ve Kadotoni insan lenfosit kültürlerinde değişik konsantrasyondaki bleomycinleri muamele ederek kromozomal aberasyonları incelediler. İn vitro ve in vivo çalışmalar belomycinin kromozomlar üzerindeki etkilerini göstermiştir. Tüm çalışmalar bleomycinin kromozomlarda delesyonlara, disentriklere, yüzüklere, exchangelere, kırıklara ve gaplere neden olduğunu ortaya koymuştur.

Bleomycin'in SCE (Sister Chromatid Exchange) seviyesinde fazlaca bir etkinliğinin olmadığı, sadece yüksek dozda az bir etkiye sebep olduğu görölmüştür (45).

2.1.7.Bleomycin'in İmmunofarmakolojisi:

Bleomycin'in immunofarmakolojik etkenleri oldukça ilginçtir. Bunlardan biri bleomycin'in çok az ya da hiç myelosupresyon göstermemesidir. Bleomycin immün yeterliliği baskılamaz. Squamöz hücreli karsinoma ve malign lenfomalara karşı etkisi kanıtlanmış olan bleomycinin az bir immunosupressif etkiye sahip olduğu bulunmuştur (10,40).

2.2.Sigara Kullanımı

Tütün alışkanlığı, günümüzde dünya nüfusunu tehdit eden tek önemli "önlenebilir ölüm nedeni" dir. Her yıl, sigara ya da tütün alışkanlığı yüzünden, yaklaşık üç milyon kişi yaşamını yitirmektedir (2).

Tütün ilk kez 16.yüzyılın başlarında Avrupa'ya götürölerek orada ekilmeye başlandı. Kısa sürede tütün kullanma alışkanlığı Avrupa'ya yayıldı. 1965 yılında 20 yaşın üstündeki erkeklerin %52'si, kadınların da %34'ü sigara içmekteyken 1980'li yıllarda bu oranlar erkeklerde %38'e, kadınlarda ise %30'a düşmüştür.

Sigara içen yetişkinlerde mortalite oranı 1.7 olarak belirlenmiştir. Mortalite oranı sigara içenlerde gözlenen ölümleri içmeyenlerdekine oranlanması sonucu elde edilmektedir. Bu oran içilen sigara miktarı ve içme süresi ile ilgilidir. Mortalite oranı genç yaşta sigaraya başlayanlarda daha yüksektir.

Bu çalışmalarla belirlenen sigaranın zararları konusunda sayısız çalışmalar yapılmıştır. Sigaranın meydana getirdiği sağlık sorunlarının bazılarını şöyle sıralayabiliriz:

-Sigaranın koroner kalp hastalığının %21'den sorumlu olduğu yapılan çalışmalarla açıklanmıştır (2).

-Sigara içenlerde peptik ülser insidansı, içmeyenlere göre daha yüksektir. sigaranın peptik ülser oluşumundaki etki mekanizması; asit salgılanmasını uyarmak safra reflüsünü artırmak ve prostaglandin sentezini baskılamak biçimindedir (2).

-Hamilelik esnasında sigara içiminin, düşük doğum ağırlığına, fetüsün gelişmemesine ve spontan abortuslara, erken doğumlara, prenatal ölümlere neden olduğu açıklanmıştır (19,57).

-Sigara alışkanlığının doğurganlık üzerinde etkili olduğunu, kadınlarda konsepsiyonu geciktirirken erkeklerde sperm anormalliği oranını artırdığı saptanmıştır (2).

-Sigara kullanımı deri kırışıkları ve yaşlanmayı arttırmaktadır (52).

-Sigaranın içerdiği nikotin son derece toksik bir maddedir. İnsanda güçlü fiziksel bağımlılığa yol açar. Ayrıca nikotinin düşük dozları uyarıcı, yüksek dozları depresyon yapıcı ve felç edici etki gösterir.

Nikotin, beyin nikotinik reseptörlerini uyararak, santral ve otonom sinir sistemini etkiler, ruhsal durum, öğrenme, konsantrasyon ve performans değişiklikleri yapar (2).

-Sigara kullanımı üst-alt solunum yolları Ca, ağız, dudak, özefagus, pankreas, böbrek, mesane ve serviks Ca'ya olan eğilimi artırır (19,54).

Sigara dumanı gaz ve parçacık (partikül) olmak üzere iki bölümden oluşmaktadır. Doğal bir çalışma odasında $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ olan parçacık düzeyi, odada sigara içildiğinde $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 'e, yoğun sigara içilmesi durumunda ise $300-1000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 'e ulaşmaktadır.

Sigara dumanının kanserojen etkisi içerdiği nikotin, karbomonoksit, azotoksit, amonyak, hidrojeniyanür ve akrolein maddelerine bağlıdır. Katran, sigara dumanının özel filtre üzerinde kalan bölümünün su ve nikotin dışındaki parçasıdır. Katranda bulunan maddeler akciğerde bronşyolları daraltarak, silyostaz gelişmesine yol açmaktadır.

2.2.1.Sigara İçmenin Kromozomal Etkileri

Sigara içme, insanların somatik hücrelerinde genetik değişikliklere yol açmaktadır. Sigara tiryakilerinde bu hücrelerdeki kromozomal zedelenme düzeyi, istatistiksel olarak önemli derecede daha yüksektir. Kromozomal bozulma, yapısal

değişiklikler, kardeş kromatid değişimlerini ve mikronükleusları kapsar. Sigara dumanı, izole insan lenfositlerinde de kardeş kromatid değişimini artırmaktadır (2).

2.3.Kromozomlar Hakkında Genel Bilgiler

2.3.1.Kromozomların Morfolojik Özellikleri:

İnsan kromozomları ($2n=46$) ışık mikroskobu altında, hücrenin mitotik bölünmesi esnasında metafaz evresinde incelenerek tanımlanabilir (5,49,60).

Normal kromozomlarda görülen morfolojik özellikler şunlardır.

1-Sentromer: Boyandığında kromozomların en soluk boya olan kesimleridir. Kromozomlar sentromer lokalizasyonuna göre 3 gruba ayrılır. Bunlar dışındaki örnekler normal sayılmazlar. Her kromozomda bir sentromer bulunur ve bunlar hücre bölünmesi esnasında kromozomların iç ipliklerine tutulmalarını sağlar.

a) Median (Metasentrik) Kromozom: Sentromeri ortadadır ve iki kolu birbirine eşit olan kromozomlardır.

b) Submedian (Submetasentrik) Kromozom: Sentromeri merkezden uzak ve iki kolu birbirine eşit olmayan kromozomlardır.

c) Akrosentrik Kromozom: Sentromeri kromozomun bir ucuna çok yakın olan kromozomlardır.

2-Satellit: Belirli kromozomların kısa kollarına bağlı bulunan yuvarlak düğme şeklindeki kromatin materyalidir. Nukleolus (çekirdeçik) ile ilgili olduğu ileri sürülmektedir.

3-Sekonder Darlık: 1, 3, 6, 9, 11 ve 16 numaralı kromozomlarda bulunan bir oluşumdur. Sentromerden farklı ve ayrı özelliklere sahiptir. Satellitler gibi bunların da çekirdeçik oluşumu ile ilgili oldukları düşünülmektedir (5,49,60).

2.3.2.Kromozomların Adlandırma Sistemi

Tijo ve Levan'ın 1956 yılında insan kromozomların tam sayısının ($2n=46$) kesin olarak ortaya koymalarından sonra, tanımlanan kromozomlar hastalıkların sayısında belirgin bir artış görülmüştür. Ancak, yayınlar belli bir sisteme uydurulmadığı için, karışıklıklar ortaya çıkmıştır, bunun üzerine, bulguları standartlaştırmak için 1960

yılında, A.B.D.'nin Denver kentinde toplantı düzenlenmiş, Denver kentinde kabul edilen sisteme Denver klasifikasyonu adı verilmiştir (5,59,60).

1963'te Londrada, 1968'de Chicago'da ve 1971'de Paris'te bir dizi uluslararası toplantı yapılmıştır.

Bu toplantılarda Denver klasifikasyonu geliştirilmiş ve insan kromozomları standartlaştırılarak ortak bir adlandırma sistemi kabul edilmiştir. Bu sınıflandırmaya göre, anlatılmak istenen tüm bilgi bir formüle verilebilir bir hale gelmiştir. Formülde önce total kromozom sayısı sonra da varsa kromozom düzensizliği belirtilmektedir (5,49,60). Bugün kullanılan sistem son şeklini "An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1995)" de almıştır (35).

Bu sisteme göre insan kromozomları, A, B, C, D, E, F ve G olarak 7 gruba ayrılmakta ve cinsiyet kromozomları hariç tutularak en büyükten en küçüğe doğru 1-22 arasında numaralandırılmaktadır (5,49,60).

Bazı genetik bilimcileri cinsiyet kromozomların, (X ve Y) 22 nolu kromozomlar sona gelecek şekilde yerleştirirken bazılarında X kromozomunu, C grubu kromozomlara benzemesinden dolayı 6 nolu kromozomdan önce veya 12 numaralı kromozomdan sonra Y kromozomunda G grubu kromozomlardan sonra yerleştirmeyi uygun görmüşlerdir. Bazı kriterler esas alınarak ayrılan kromozomlar, Denver sistemine göre sıralanarak "karyotip" hazırlanmaktadır.

Kromozomların tanısında göz önünde bulundurulacak özellikler şöyle sıralanmaktadır (5).

- a) Kromozomun total uzunluğu ve kolların boy uzunluğu
- b) Sentromerin kromozomdaki konumu
- c) Kromozomdaki sekonder darlığın bulunup bulunmaması, eğer varsa konumu
- d) Kromozomların bant özellikleri
- e) Kromozomlara ait otoradyografik bulgular

2.3.3.Kromozom Düzensizlikleri

Normal bireylerin vücut hücrelerinde daima 46 olan kromozomlar, bazan sayı, şekil ve yapı bakımından bazı değişiklikler gösterebilmektedir (5,59).

A) Sayısal Kromozom Düzensizlikleri

I) Öploidi (Euploidy): Kromozom sayısındaki artış veya azalışların temel kromozom sayısının ($n=23$) tam katları kadar olmasıdır.

1-Triploidi: Hücrede temel kromozom sayısının 3 katı kadar kromozom bulunmasıdır.

2-Tetraploidi: Hücrede temel kromozom sayısının 4 katı kadar kromozom bulunması durumudur.

3-Yüksek poliploidiler: Hücrede temel kromozom sayısının 4 katından fazla kromozom bulunması durumudur.

II) Aöplöidi (Aneuploidy): Temel kromozom sayısının tam katı kadar olmayan artma ya da azalışları ifade eder.

1-Hiperploidi (Hyperploidy): Kromozom sayısının $2n+1$ ve $2n+2$ şeklinde artmasıdır.

2-Hipoploidi (Hypoploidy): Kromozom sayısının $2n-1$ ve $2n-2$ şeklinde azalmasıdır.

Yapısal Kromozom Düzensizlikleri

1-Eksilme (Deletion): Kromozomdan küçük bir parçanın koparak ayrılması durumudur.

2-Artma (Duplication): Homolog ya da homolog olmayan iki kromozomun birinden kopan bir parçanın başka kromozoma eklenmesidir.

3-Aralık (Gap): Kromozom kollarının herhangi bir bölgesinde kromatidin enini geçmeyen ve kromozom ekseninden sapmamış, boya almayan bir bölgenin görülmesidir.

3.1. Kromatid Gap: Kromozomun bir kromatidinde görülen gap durumudur.

3.2.İzokromatid Gap: Kromozomun her iki kromatidinde görülen gap durumudur.

4-Kırık (Break): Kromozomun herhangi bir bölgesinde bir kromatid enini aşan ve kromozom ekseninden sapan, boyanmamış bölgelerdir.

4.1.Kromatid kırık: Kırık olarak değerlendirilen düzensizliğin kromozomun bir kromatidinde görülmesidir.

4.2.İzokromatid kırık: Kırık olarak değerlendirilen düzensizliğin kromozomun her iki kromatidinde görülmesidir.

5-İki Sentromerli Kromozom (Disentrik): Kromozomda bir yerine iki sentromer bulunması durumudur.

6-Haç Kromozom (Quadriradial): Büyük ve küçük submetasentrik kromozomların, kollarının yanyana gelerek haç şeklini almasıdır.

7-Sentromersiz Kromozom (Acentrik): Kromozomun sentromersiz olmasıdır.

8-Fragment: Kopmuş kromatid parçalarıdır.

9-Kromatin Damlacı (Minute): Terminal delesyondan daha küçük asentrik fragmenttir. Karakteristik olarak bir çift kromatin kitlesi görünümündedir. Ara delesyonları (intercalar) ifade eder.

10-Minik Kromozom: Büyük ölçüde delesyona uğramış kromozomu ifade eder.

11-Halka (Ring): Kromozomun iki ucunun birleşerek yüzük şeklini almasıdır. Sentromer içerenlere "sentrik ring" denir ve genellikle asentrik fragmentle yanyana bulunur. Sentromer içermeyenlere ise asentrik ring denir.

12-Yapışkanlık: Kromozomların birbirine tutularak yığın haline gelmesidir.

13-Ters Dönme (İnversiyon): Bir kromozoma iki darbenin gelmesi ve kopan parçanın kaybolmadan kendi eksenini etrafında 180 derece dönerek eski yerine tutunması durumudur. Kırılma ve yeniden birleşme, kromozomun aynı kolunda olursa; parasentrik inversiyondan, kırılma ve yeniden birleşme noktaları sentromeri de içeriyorsa perisentrik inversiyondan söz edilir.

14-Yer Değiştirme (Translocation): İki ayrı kromozomdan kopan birer parçanın yer değiştirilerek kromozomlara tutulmasıdır.

15-Satellit Asosiasyonu: Büyük ve küçük akrosentrik kromozomların metafaz plaklarında kısa kollarındaki satellitlerini birbirine çevirmiş biçimde bir araya gelerek, rozet şeklini almalarıdır.

16-İri Satellitler: D ve G kromozomların kısa kollarında bulunan satellitlerin normalden büyük görünmeleri durumudur.

17-İzokromozom: Sentromerin boyuna bölünmeyip enine bölünmesi sonucu oluşan düzensiz kromozomdur.

18-Sentromer bölgesinde asenkroni: Sentromerin aynı anda bölünmemesi durumudur.

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.GEREÇ

3.1.1.Araştırma Populasyonu

Çalışmamızda yaşları 25-35 arasında değişen 5 erkek birey kullanılmıştır. Deneklerin numaralarına göre yaşları; 1) 27 2) 29 3) 30 4) 30 5) 28'dir. Bunların yaş ortalamaları 28.8'dir. Deneylerimizdeki bireyler günde en az iki paket sigara içen sigara tiryakisi olup ve son 5-6 ay içinde virütik enfeksiyon geçirmemiş, herhangi bir antibiyotik kullanmamış radyoterapi görmemiş ya da radyasyon etkisinde kalmamış, tamamen sağlıklı bireyler arasından seçilmiştir.

3.1.2.Kimyasal Maddeler

- a) TC Medium 199 (Difco, 5477-72-6)
- b) TC Fetal Calf Serum Dessicated (Difco 5065-67)
- c) Bacto phytohemagglutinin L (Seromed)
- d) Colchicine kristal reinat (Merck)
- e) KCL (Potassium chloride)
- f) Acetic acid Glacial (Merck)
- g) Methanol (Merck)
- h) Xylol (Merck)
- ı) Giemsa's Lösung (Merck)
- i) Heparin (Liquemine, Roche)
- j) Peniciline - G Potassium (İ.G)
- k) Streptomycine Sulfate (İ.G)
- l) Kanada Balzamu (Rhenohistol, Merk)
- m) Ethyl alcohol
- n) Serum fizyolojik (Baxter)
- o) Trypsin Certified (Difco 1:250)
- ö) Bleomycin (Mustafa Nevzat)
- p) Na H₂ PO₄ . H₂ O (Merck)

r) $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (Merck 9)

s) Triple Distile su

t) Aceton

y) Parafin

3.1.3.Solüsyonlar

a) Kolşisin (Colchicine) Solüsyonu

40 mg Colchicine + 100 ml triple distile su

b) Hipotonik Solüsyonu

0.075 M KCl

c) Tespit Solüsyonu (Fiksatif)

3 kısım Methanol + 1 kısım acetic acid glacial

d) Penicilline Solüsyonu

1.000.000 u penicilline-G potassium 10 ml steril triple distile su

e) Streptomycine Solüsyonu

1 gr streptomycine sulfate + 10 ml steril triple distile su

f) Phytohemaglutinine Solüsyonu

3 mg pthohemaglutinine L (seromed) + 5 ml steril triple distile su

g) Serum Solüsyonu

TC fetal calf serum dessicated+ 30 ml steril triple distile su

h) Fosfat Tampon Solüsyonu

(11.4 gr $\text{NaH}_2 \text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 500 ml distile su) + (20.1 gr $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 500 ml distile su)

i) Boya solüsyonları:

I- 1 ml Giemsa-Lösung + 19 ml distile su

II- 1.2 ml giemsa-Lösung + 18.8 ml fosfat tampon

i) Bleomycin Solüsyonu:

I- Ana stok solüsyon (3000 $\mu\text{g/ml}$)

15 mg bleomycin + 5 cc TC Medium 199

II-Stok solüsyon I (300 µg/ml)

0.5 cc Ana stoktan + 4.5 cc TC Medium 199

III- Stok solüsyon II (30 µg/ml)

0.5 cc stok solüsyon I+4.5 cc TC Medium 199

IV- Stok solüsyon III (3 µg/ml)

0.5 cc stok solüsyon II+4.5 cc TC Medium 199

j) Tripsin solüsyonu: 50 mg tripsin + 100 ml 120 tonik serum fizyolojik

3.1.4.Kültür Ortamı

Periferik Kan Kültürü

- | | |
|---------------------------|--------|
| a) TC Medium 199 | 80 ml |
| b) TC fetal Calf Serum | 15 ml |
| c) Phytohemagglutinin sol | 3.5 ml |
| d) Penicilline sol | 0.1 ml |
| e) Streptomycine sol | 0.1 ml |

3.1.5.Diğer Gereçler

- a) Zaman ayarlı santrifüj (Heltich Universal II)
- b) Etüv (Heraeus)
- c) Kuru hava sterilizatörü (Kotterman)
- d) Mikroskop (Olympus)
- e) Mikrofotografi aygıtı (Jenamed-2 1000X)
- f) Elektronik duyarlı terazi (0.1 mg'a kadar hassas, Bosch)
- g) Değişik çapta enjektörler ve pipetler
- h) 10 ml'lik kültür tüpleri
- ı) Şaleler
- i) 15 ml'lik konik santrifüj tüpleri
- j) Mezürler
- k) Lamel (34-32 mm)
- l) Lam
- m) Applied Imaging Karyoteyp cihazı

3.2.Yöntem

Günümüzde kalıtsal hastalıklar etyolojilerindeki kalıtsal etkenin türüne göre aşağıdaki şekilde üç gruba ayrılarak incelenirler:

I- Tekli Mutant Genlere Bağlı Olanlar

A-Otozomal kalıtım

- 1) Otozomal Dominant
- 2) Otozomal Resesif

B- Gonozomal kalıtım

- 1) X'e bağlı dominant
- 2) X'e bağlı resesif
- 3) Y kromozomal

II- Polijenik olanlar

III- Kromozomal olanlar

Bunlardan tekli mutant genlere bağlı olanların kalıtım biçimleri aile, ikiz ve pedigrî yöntemi gibi dolaylı yöntemlerle, poligenik olanlar geniş anlamda aile ve populasyon araştırmaları ile ve kromozomal olanlar ise karyotip analizi ile ortaya konabilmektedir (5,59,71).

Araştırmamızda amaç gerek spontan ve gerekse kullanılan kemoterapötığe bağlı olarak oluşan indüklenmiş kromozom düzensizliklerini lenfositlerde saptamak olduğu için karyotip analizine başvurulmuştur.

3.2.1.Kromozom Elde Etme Yöntemi

Çeşitli dokularda kromozomlar mitoz bölünmenin metafaz evresinde en iyi şekilde görülebilirler. Bu nedenle kromozom incelenmesinin yapılabilmesi için elimizde çok sayıda metafaz plağı bulunmalıdır. İnceleyeceğimiz insan lenfositleri normal olarak %1 gibi düşük oranda kendiliğinden (spontan) mitoz bölünmeye girerler (5,59). Bu nedenle fitohemaglutinin denilen bir kimyasal madde ile hücre kültürlerine üretilecek lenfositlerin yapay olarak mitoz sokulmaları ve sonradan

kolşisin adı verilen diğer bir kimyasal ile mitoz bölünmenin metafaz evresinde durdurulmaları gerekmektedir (5,59).

Lenfositlerin fitohemagglutinin ile muamelesinden 24 saat sonra ikinci mitoz bölünmeye girdikleri bilinmektedir (5,59). Bu nedenle lenfositler kültür ortamlarında 37°C'de 72 saat bekletilirler. Bu süre içinde hücrelerin canlılıklarını sürdürebilmeleri için esasını amino asitler, vitaminler ve minerallerin oluşturduğu heterolog insan serumu ya da dana serumu içeren kültür ortamlarında tutulmaları gerekir (1,5,59,60). Çalışmamızda, Moorhead ve arkadaşlarının (36) geliştirmiş oldukları standart ya da makrokültür tekniğinin modifiye şekli olan ve mikroteknik ya da tüm kan tekniği olarak da bilinen yöntemden yararlanılmıştır (5,36).

Çalışmamızdaki uygulama aşamaları sırası ile aşağıdaki gibidir.

a) Bleomycinin uygulama konsantrasyonları belirlenirken, terapötik doz, terapötik dozun 10 katı ve maksimum tolere edilebilir doz olarak da terapötik dozun 100 katı alınmıştır.

Kültürün bleomycine maruz kalma süreleri olarak ta 6,24 ve 48 saat seçilmiştir.

b) Aseptik koşullarda ve steril malzeme kullanılarak hazırlanmış ve buzdolabında muhafaza edilmiş stok kültür ortamı solüsyonu kullanılacağı zaman buzdolabından çıkarılmış ve her bir kültür tüpüne 4.5 ml aktarılmıştır.

c) Uygulanacak kimyasalın her konsantrasyonu ve kontrol grubu için heparinlenmiş, disposable, steril enjektör ile her bireyden alınan venöz kandan, aseptik koşullarda ağzı açılan kültür tüplerine 1 numaralı enjektör iğnesi ile 8 damla eklenmiş ve tüplerin ağzı alevden geçirilerek parafilm ile kapatılmış ve her birinin üzerine daha sonra eklenecek bleomycin konsantrasyonu ve uygulama sürelerini belirten etiketler yapıştırılarak etüvde 72 saat süreyle 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

d) Çalışmamızda bleomycin'in 0.3 µg/ml, 3 µg/ml ve 30 µg/ml'lik final konsantrasyonlarının 72 saatlik lenfosit kültürlerinin son 6 saatlik, son 24 saatlik ve son 48 saatlik sürelerde etkilerinin araştırılması amaçlandığından bu doz ve süre kombinasyonuna uygun olarak gerekli uygulama yapılmıştır.

Buna göre inkübasyona bırakılmış olan 4.5 ml'lik kültürler uygulama süreleri dikkate alınarak, 24 saatte, 48 saatte ve 66. saatte etüvden çıkarılarak arzulan final konsantrasyonunu sağlayacak şekilde önceden hazırlanmış 3 ayrı stok solüsyonunun uygunundan 0.5 ml alınmış ve kültüre eklenerek ortamda homojen dağılımı sağlanmıştır.

Kontrol grubu için de aynı işlemler yapılmış ancak sözü edilen saatlerde anılan miktardaki bleomycin solüsyonu yerine TC Medium 199 ilave edilmiştir.

Çalışmamızda 3 ayrı konsantrasyon ve 3 ayrı uygulama süresi ve 1 de kontrol grubu oluşturulduğundan her bireyden alınan kan 12 ayrı kültür tüpüne eklenmiştir.

Doz/süre	6 saat	24 saat	48 saat
0.3 µg/ml	1	1	1
3 µg/ml	1	1	1
30 µg/ml	1	1	1
Kontrol	1	1	1

Çizelge 1: Doz-Süre kombinasyonları

e) Inkübasyondan 71.5 saat sonra etüvden çıkarılan kültür tüplerinin her birine 2 numaralı enjektör iğnesi ile 4 damla kolsisin solüsyonu eklenip, hafifçe karıştırıldıktan sonra tekrar etüve konarak yarım saat bekletilmiştir.

72. saatin sonunda kültürler etüvden çıkarılmış ve 800 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüj edilmiştir.

f) Üzerlerine kültür tüplerindeki bilgilerin aynılarını içeren etiketler yapıştırılmış pastör pipetleri ile tüplerdeki hücre çöküntüsü üzerindeki sıvı (supernatant) atılmış, geriye kalan hücre çöküntüleri üzerine 8 ml hipotonik solüsyonu eklenerek pipetaj yapılmıştır. Hipotonik solüsyonda, hücre ve nükleus membranlarının parçalanmasını sağlamak amacı ile 15 dakika bekletildikten sonra tekrar 800 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip üsteki sıvı atılmıştır.

g) Çöküntü üzerine, hücreleri bulundukları evrede tespit etmek için, 5 ml. tespit solüsyonu (fiksatif), tüp kenarından kaydırılarak damla damla eklenip, pipetaj yapıldıktan sonra 800 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

h) Aynı işlem 4 kez daha tekrarlanmış, üsteki sıvı atılarak, kalan hücre çöküntüsü üzerine onu örtecek kadar tespit solüsyonu konarak hafifçe pipetaj yapılmış ve içine alınmıştır.

i) Kültür tüplerinin üzerindeki bilgilerin aynılarının yazıldığı temiz lamalar üzerine birkaç damla damlatılarak yayma işlemi yapılmış ve preparatlar kurumaya bırakılmıştır. Her doz-süre kombinasyonu için hazırlanan preparat sayısı 5'tir.

j) Hazırlanan her 5 lamdan 1 tanesi I nolu Giemsa boya solüsyonu ile 20 dakika boyanmış, üzerindeki boya döküldükten sonra musluk suyundan geçirilmiş ve yeniden kurumaya bırakılmıştır.

Kuruyan preparatlar 10-15 saniyelik sürelerle sırası ile aseton, aseton-xylol ve xylol serisinden geçirilmiş lam üzerine kanada balzamu damlatılarak lamel ile kapatılmış ve böylece düz boyanmış preparatlar elde edilmiştir.

j) Geriye kalan 4 lam etüvde 3 gün bekletildikten sonra, 37°C'de ayarlanmış tripsin çözeltisine 10-30 saniye kadar daldırılmıştır.

Tripsin çözeltisinden çıkarılan lamalar distile sudan geçirilmiş, II nolu Giemsa solüsyonunda 5 dakika boyanmış, tekrar distile sudan geçirilip kurumaya bırakılmıştır.

Kuruyan lamalar 15 saniye süre ile aseton, aseton-xylol ve xylol serisinden geçirilmiş, kurutulmuş ve kanada balzamu ile lamelle kapatılmıştır. Böylece bantlı olarak boyanmış preparatlar elde edilmiştir.

3.2.2.Değerlendirme

3.2.3.1.Preparatların Değerlendirilmesi

Değerlendirme işlemine mikroskop altında incelenen preparatların önceden hazırlanmış formlara kayıt edilmesi ile başlamıştır. Preparatların tarama işlemi küçük büyütmeli objektif (10X) ile başlanmış kaliteli metafazlar immersiyon objektifi ile (100X) ayrıntılı bir şekilde incelenip hazırlanmış değerlendirme formuna gerekli

kısaltma ve sembollerle kayıt edilmiştir. Her bir doz-süre kombinasyonu için 50 metafaz değerlendirilmiştir.

3.2.3.2. İstatistiksel Değerlendirme

a) Düzensizlik İçeren Hücrelere Ait İstatistiksel Değerlendirme

Kromozomal düzensizlik içeren hücrelere ait veriler sayılarak elde edilen verilerdir. Bu verilerin istatistiksel değerlendirmesini yapabilmek için önce veriler Arc-sin transformasyonu ile açı değerlerine dönüştürülmüştür. Bu değerler çok etkenli çalışmalar için varyans analiz yöntemlerinden olan iki yönlü faktöryel planlama düzeni ile test edilmiştir (47).

b) Yapısal Kromozom Düzensizliklerinin İstatistiksel Değerlendirme

Yapısal kromozom düzensizliği ile ilgili bulgular sayımla elde edilen veriler olduğu için veriler Arc-sin transformasyonu ile açı değerlerine dönüştürülmüştür. Daha sonra çok etkenli çalışmalar için en yaygın yöntem olan varyans analizi yöntemlerinden iki yönlü faktöryel planlama düzeni uygulanmıştır (47).

Deneklerin yapısal kromozom düzensizlikleri açısından bleomycinden etkileşme derecelerinin farklı olup olmadığı X^2 testi ile değerlendirilmiştir (47).

c) Euploidy Tipi Kromozom Düzensizliklerinin İstatistiksel Değerlendirmesi

Öploidi (Euploidy) tipi kromozom düzensizliklerin deney ve kontrol gruplarına ait verileri yüzde oranlarına dönüştürülerek t oran testi ile test edilmiştir.

d) Satellit Assosiasyonlarının İstatistiksel Değerlendirmesi

Satellit assosiasyonlarının farklı doz ve süre kombinasyonlarına ait verilerin istatistiksel değerlendirmesi t oran testi ile test yapılmıştır (47).

$$t = \frac{P_1 - P_2}{\sqrt{\frac{Pq}{n_1} + \frac{Pq}{n_2}}}$$

4.BULGULAR

Araştırmamızda Bleomycin + sigaranın kromozom düzensizliklerine etkisini belirlemek amacıyla sigara içen 5 erkek bireyden alınan venöz kanlardan lenfosit kültürü yapılmak suretiyle kromozom analizi yapılmıştır.

Çalışmamızda bir birey için 3 farklı doz (0.3 µg/ml, 3 µg/ml, 30 µg/ml) ve 3 farklı süre (6.24, 48 saat) kombinasyonları ve kontrol grupları da olmak üzere 5 birey için toplam 60 kültür hazırlanmıştır.

Her bir bireyin kültüründen 1 tanesi normal giemsa boyama ve 4 tanesi de tripsin bantlama yöntemiyle olmak üzere 5 preparat hazırlanmıştır.

Değerlendirmeye alınan toplam preparat sayısı $5 \times 60 = 300$ 'dür. Her bir doz-süre kombinasyonu için her bir bireyden 50 metafaz incelemeye alındığından toplam $50 \times 60 = 3000$ metafaz "Düzensizlik içeren hücreler", yapısal kromozom düzensizlikleri ve satellit assosiasyonları açısından değerlendirmeye alınmıştır. Kontrol ve doz gruplarına ait genel düzensizlik bulguları Çizelge 2'de verilmiştir.

Kromozom düzensizliklerini belirlemek amacıyla değerlendirilen metafazlardan yapısal koromozom düzensizliği ve öploid tipi (endomitoz ve endoreduplikasyon kökenli tetraploidi) düzensizlik olguları, düzensizlik içeren metafaz başlığı altında incelenmiştir. Metafazlarda belirlenmiş olan yapısal düzensizlik tiplerinin toplamı "Yapısal Kromozom Düzensizlikleri" başlığı altında incelenmiştir (Çizelge 2).

Gruplar	Kontrol grubu	0.3 µg/ml	3 µg/ml	30 µg/ml	Toplam
İncelenen metafaz sayısı	750	750	750	750	3000
Normal metafaz sayısı	537	454	346	258	1595
Düzensizlik içeren meta. sayısı	171	258	387	573	1389
Düzensizlik içeren met. %	22.8	34.4	51.6	76.4	184.93
Poliploid hücre	2	4	3	1	10
Satellit assosiasyonları	42	50	72	49	213
Satellit assiasyonları %	5.6	6.66	9.6	6.53	28.39

Çizelge 2: Kontrol ve doz gruplarına ait kromozomal düzensizliklerin genel sonuçları

4.1.Düzensizlik İçeren Hücelere Ait Bulgular:

Çalışmada incelenen toplam 3000 metafazdan 1320 tanesinde düzensizlik saptanmıştır. Bunları deney gruplarındaki dağılımına göre inceleyecek olursak; Kontrol grubunda incelenen 750 metafazdan 171 tanesinde düzensizlik kaydedilmiştir. Kontrol grubunda düzensizlik içeren hücre yüzdesi %22.8 olarak bulunmuştur.

0.3 µg/ml'lik doz grubunda doz sabit tutularak 6, 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinde toplam 750 metafaz incelenmiş olup 258 tanesinde düzensizlik kaydedilmiştir. Düzensizlik içeren hücre yüzdesi ise %34.4 olarak saptanmıştır.

3 µg/ml'lik doz grubunda doz sabit tutularak 6, 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinde toplam 750 metafaz incelenmiştir. Bunların 387 tanesinde düzensizlik saptanmıştır. Düzensizlik içeren hücre yüzdesi ise %51.6 olarak belirlenmiştir.

30 µg/ml'lik doz grubunda doz sabit tutularak 6, 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinde toplam 750 metafaz kaydedilmiş, Bunların 573 tanesinde düzensizlik kaydedilmiştir. Bunların toplam metafaz sayısına oranı da %76.4 olarak saptanmıştır.

Düzensizlik içeren hücelere ait bulgular istatistiksel olarak değerlendirildiğinde bleomycin dozunun artırılmasına paralel olarak sürenin artırılmasının kromozomal düzensizlik oluşumuna etkisinin olmadığını ($P>0.05$) ve doz sabit tutularak sürenin artırılmasının düzensizlik içeren hücre oluşumunu etkilediği saptanmıştır ($P<0.01$).

Bleomycin dozunun artırılmasına paralel olarak uygulama süresinin arttırılmasından düzensizlik içeren hücre sayısının arttığı ($P<0.01$), bleomycin uygulama süresinin artmasına bağlı olarak kromozomal düzensizlik içeren hücre sayısında bir artış olduğu ($P<0.01$) ve süre sabit tutularak dozun arttırılması ile düzensizlik içeren hücre sayısının arttığı ($P<0.01$) belirlenmiştir (Çizelge 3, 4).

Kaynak	SD	K.T	K.O
Genel kareler toplamı	59	6502.0	-
Gruplar arası K.T.	11	5117.1	465.2
Süre grupları K.T.	2	1136.1	568.0
Doz grupları K.T.	3	3641.8	1213.9
Etkileşim K.T.	6	339.3	56.5
Gruplar içi K.T.	48	1384.9	28.9
Aynı sürede doz grupları arası K.	9	3981.1	442.34
Aynı dozda süre grupları arası K.	8	1475.4	184.425
Süre grupları içi K.T.	57	53.66	94.14

Çizelge 3: Farklı doz-süre kombinasyonlarında oluşan düzensizlik içeren hücrelere ait kaynak tablosu

Kaynak	DF	F değeri	Tablo değeri 0.05-0.01		Sonuç
Doz-süre etkileşimi	6	1.95	2.30	3.20	$P>0.05$
Aynı dozda süre	8	6.38	2.14	2.90	$P<0.01$
Doz grupları arası fark	3	42.0	2.80	4.22	$P<0.001$
Süre grupları arası far	2	19.65	3.19	5.08	$P<0.001$
Aynı sürede doz	9	3.25	2.08	2.80	$P<0.01$

Çizelge 4: Düzensizlik içeren hücrelerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları

4.2.Yapısal Düzensizliklere Ait Bulgular

Yapısal kromozom düzensizliklerini kontrol, 0.3 µg/ml, 3 µg/ml ve 30 µg/ml'lik doz gruplarında incelemek gerekirse, kontrol grubunun 6 saatlik uygulama süresinde kromatid gap toplam olarak 3, izokromatid gap 5, kromatid kırık 14, izokromatid kırık 3, eksilme (delesyon) 2, fragment 1, toplam diğer yapısal düzensizliklerin (asentrik kromozom, disentrik kromozom, ring kromozom, multiple aberasyon) sayısı ise 9 olarak bulunmuştur. Kontrol grubunun 24 saatlik uygulama süresinde toplam kromatid gap 5, izokromatid gap 9, toplam kromatid kırık 13, izokromatid kırık 6, eksilme 1, fragment 1, artma (duplikasyon) 3, toplam diğer yapısal düzensizlikler 33 olarak saptanmıştır.

Kontrol grubunun 48 saatlik uygulama süresinde toplam kromatid gap 7, toplam izokromatid gap 7, kromatid kırık 12, izokromatid kırık 6, eksilme 2, fragment 1, artma 1, toplam diğer yapısal düzensizlikler 24 olarak saptanmıştır.

0.3 µg/ml'lik doz grubunun 6 saatlik uygulama süresinde toplam kromatid gap 7, toplam izokromatid gap 7, kromatid kırık 22, izokromatid kırık 3, eksilme (delesyon) 2, fragment 2, artma 1 ve toplam diğer yapısal düzensizlikler 33 olarak saptanmıştır.

0.3 µg/ml'lik doz grubunun 24 saatlik uygulama süresinde toplam kromatid gap 15, toplam izokromatid gap 11, kromatid kırık 7, izokromatid kırık 6, eksilme 3, fragment 4, artma (duplikasyon) 1 ve toplam diğer yapısal düzensizlikler 28 olarak saptanmıştır.

0.3 µg/ml'lik doz grubunun 48 saatlik uygulama süresinde toplam kromatid gap 7, toplam izokromatid gap 12, kromatid kırık 17, izokromatid kırık 15, eksilme 4, toplam fragment 3, artma (duplikasyon) 3 ve toplam diğer yapısal düzensizlikler 41 olarak saptanmıştır.

3 µg/ml'lik doz grubunun 6 saatlik uygulama süresinde toplam kromatid gap 13, toplam izokromatid gap 10, kromatid kırık 17, izokromatid kırık 11, eksilme 6, toplam fragment 1, artma 4 ve toplam diğer yapısal düzensizlikler 24 olarak saptanmıştır.

3 µg/ml'lik doz grubunun 24 saatlik uygulama süresinde toplam kromatid gap 8, toplam izokromatid gap 19, toplam kromatid kırık 34, toplam izokromatid kırık 20, eksilme 5, toplam fragment 6, toplam artma 4 ve toplam diğer yapısal düzensizlikler 36 olarak saptanmıştır.

3 µg/ml'lik doz grubunun 48 saatlik uygulama süresinde toplam kromatid gap 26, toplam izokromatid gap 14, toplam kromatid kırık 21, toplam izokromatid kırık 34, eksilme 4, toplam fragment 10, toplam artma (duplikasyon) 4 ve toplam diğer yapısal düzensizlikler 53 olarak saptanmıştır.

30 µg/ml'lik doz grubunun 6 saatlik uygulama süresinde toplam kromatid gap 31, toplam izokromatid gap 10, toplam kromatid kırık 19, toplam izokromatid kırık 12, toplam eksilme (delesyon) 5, toplam fragment 2, toplam artma (duplikasyon) 3 ve toplam diğer yapısal düzensizlikler 46 olarak saptanmıştır.

30 µg/ml'lik doz grubunun 24 saatlik uygulama süresinde toplam kromatid gap 24, toplam izokromatid gap 9, toplam kromatid kırık 28, toplam izokromatid kırık 33, toplam eksilme 19, toplam fragment 5, toplam artma (duplikasyon) 14 ve toplam diğer yapısal düzensizlikler 63 olarak saptanmıştır.

30 µg/ml'lik doz grubunun 48 saatlik uygulama süresinde toplam kromatid gap 32, toplam izokromatid gap 30, toplam kromatid kırık 19, toplam izokromatid kırık 64, toplam eksilme (delesyon) 18, toplam fragment 4, toplam artma 7 ve toplam diğer yapısal düzensizlikler 75 olarak saptanmıştır.

Yaptığımız çalışmada en çok rastladığımız yapısal düzensizlik çoklu kırıkların, asentrik kromozomları, ring kromozomunu disentrik kromozom içine alan diğer yapısal düzensizliklerdir (Çizelge 5). Bunların diğer yapısal düzensizliklere oranı %33.72 dir. Kromatid kırıklar diğer yapısal düzensizliklere oranı %16.71 dir. İzokromatid kırıkların diğer yapısal düzensizliklere oranı %15.37 dir. Kromatid gaplerin tüm yapısal düzensizliklere oranı %12.90 dir. İzokromatid gapler tüm yapısal düzensizliklere oranı %10.36 dir.

Delesyonların tüm yapısal düzensizliklere oranı %5.14 tir. Duplikasyonların diğer yapısal düzensizliklere oranı %3.40 dır. Fragmentlerin diğer yapısal düzensizliklere oranı %2.90 dır.

Yapısal düzensizlik tipleri	Düzensizlik sayısı	%
Kromatid Gap	178	12.90
Kromatid kırık	223	16.71
Diğer yapısal düzensizlikler	465	33.72
İzokromatid kırık	212	15.37
İzokromatid Gap	143	10.36
Delesyon	71	5.14
Duplikasyon	47	3.40
Fragment	40	2.90
Toplam	1379	100

Çizelge 5: Diğer yapısal düzensizlikler (Ring kromozom, Disentrik kromozom, Asentrik kromozom, Triradyal, Quadriradyal görüntü, minut kromozom, multiple aberasyon)

4.2.1.Yapısal Kromozom Düzensizliklerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Çalışmamızda kontrol grubu, 0.3 µg/ml, 3 µg/ml, 30 µg/ml doz gruplarında bleomycin'in 6, 24 ve 48 saatlik uygulama süreleri sonrasında oluşan yapısal kromozom düzensizliklerine ait veriler sayımla elde edilen değerlerdir. Bu veriler çalışmamıza uygun istatistiksel yöntemin uygulanabilmesi için Arc-sin transformasyonu ile açı değerlerine çevrilmiştir. Daha sonra farklı doz-süre kombinasyonlarına genel olarak dozun, sürenin, etkileşiminin, aynı dozda süre ve aynı sürede dozun etkisini belirlemek ve gruplara ait verileri birbirleri ile karşılaştırmak için çift yönlü varyans analizi-faktöryel planlama yöntemi ile test edilmiştir (Çizelge 6).

Kaynak	S1	K.T.	K.O
Genel kareler toplamı	59	19021.7	-
Gruplar arası K.T.	11	146.46	1331.45
Süre grupları K.T.	2	2770.3	1385.1
Doz grupları K.T.	3	10154.3	3384.8
Etkileşim K.T.	6	1721.4	286.9
Gruplar içi K.T.	48	4375.7	91.2
Aynı sürede doz grupları arası K.T.	9	11875.7	1319.52
Aynı dozda süre grupları arası K.T.	8	4491.7	561.46
Süre grupları içi	57	16251.4	285.11

Çizelge 6: Farklı doz-süre kombinasyonlarında oluşan yapısal kromozom düzensizliklerinin kaynak tablosu

4.2.1.1.Yapısal Kromozom Düzensizliklerin Hata Kareleri Ortalamasına Göre Belirlenmesi

Yapılan istatistiksel değerlendirmeye göre; doz artışına paralel olarak sürenin artırılmasının kromozomlarda yapısal düzensizlik oluşumunu etkilediği ($P<0.01$) bleomycin dozunun artırılması ile yapısal kromozom düzensizliklerinde artış olduğu ($P<0.001$), bleomycin uygulama süresinin artırılmasına bağlı olarak yapısal kromozom düzensizliklerinin artmadığı ($P>0.05$), dozun sabit tutulup süre artırılmasının kromozomlarda yapısal düzensizlik oluşumunu etkilediği ($P<0.01$) tespit edilmiştir. Ayrıca süre sabit tutulup doz artırılması ile kromozomlarda yapısal düzensizliklerin arttığı ($P<0.001$) tespit edilmiştir (Çizelge 7).

Kaynak	DF	F değeri	Tablo değeri 0.05-0.01		Sonuç
Doz-süre etkileşimi	6	3.145	2.30	3.20	$P<0.01$
Aynı dozda süre	8	6.156	2.14	2.90	$P<0.01$
Doz grupları arası fark	3	37.11	2.80	4.22	$P<0.01$
Süre grupları arası fark	2	3.126	3.19	5.08	$P>0.05$
Aynı sürede doz	9	14.47	2.08	2.80	$P<0.00$

Çizelge 7: Yapısal kromozom düzensizliklerin hata kareleri ortalamalarına göre belirlenmesi

4.2.1.2.Yapısal Kromozom Düzensizlerinin Etkileşime Göre Belirlenmesi

Etkileşime göre yapılan istatistiksel değerlendirmede; kromozomlardaki yapısal düzensizlik durumunda doz grupları arası farkın anlamlı olduğu ($P<0.01$), süre grupları arasındaki yapısal düzensizliklerin anlamsız olduğu tespit edilmiştir ($P>0.05$) (Çizelge 8).

Kaynak	DF	F değeri	Tablo değeri 0.05-0.01		Sonuç
Doz-süre etkileşimi	6	3.145	2.30	3.20	$P>0.01$
Aynı dozda süre	3	1.956	4.76	9.78	$P>0.05$
Doz grupları arası fark	2	11.79	5.14	10.52	$P<0.01$
Süre grupları arası fark	8	4.82	4.15	8.10	$P>0.05$
Aynı sürede doz	9	4.60	4.10	7.98	$P>0.05$

Çizelge 8: Yapısal kromozom düzensizliklerinin etkileşime göre belirlenmesi

4.2.1.3.Ortalamalar Arası Farkın Önem Kontrolü

Yapılan istatistiksel değerlendirmede dozlar karşılaştırıldığında 0.3 µg/ml ile kontrol grubu arasında yapısal kromozom düzensizliği oluşumu bakımından fark yoktur ($P>0.05$) 3 µg/ml ile kontrol grubu arasında fark vardır ($P<0.05$), 3 µg/ml ile 0.3 µg/ml arasında fark vardır ($P<0.05$), 30 µg/ml ile kontrol grubu arasında fark vardır ($P<0.05$), 30 µg/ml ile 0.3 µg/ml arasında fark vardır ($P<0.05$), 30 µg/ml ile 3 µg/ml arasında fark yoktur ($P>0.05$) (Çizelge 9).

Karşılaştırılan dozlar	1.Doz $\bar{X}$	2.Doz $\bar{X}$	Fark	G 0.05	Sonuç
0.3 µg/ml/Kontrol	37.05	31.10	5.95	9.111	$P>0.05$
3 µg/ml/Kontrol	46.27	31.10	15.17	9.111	$P<0.05$
3 µg/ml/0.3 µg/ml	46.27	37.05	9.22	9.111	$P<0.05$
30 µg/ml/Kontrol	51.10	31.10	20	9.111	$P<0.05$
30 µg/ml/0.3 µg/ml	51.10	37.05	14.05	9.111	$P<0.05$
30 µg/ml/3 µg/ml	51.10	46.27	4.83	9.111	$P>0.05$

Çizelge 9: Ortalamalar arası önem kontrolüne ait istatistiksel değerlendirme

4.2.2.Yapısal Düzensizliklerin Kromozom Gruplarına Göre Dağılımı

Yapısal düzensizliklerden kromatid gap, izokromatid gap, kromatid kırık ve izokromatid kırık ve delesyonların hangi kromozom grubunda meydana geldiği Çizelge 10-11'de gösterilmiştir.

X kromozomu C grubu, Y kromozomu ise G grubu içine dahil edilmiştir.

Kontrol gruplarında toplam 16 tane kromatid gap, toplam 20 tane izokromatid gap, toplam 37 tane kromatid kırık, toplam 16 tane izokromatid kırık, toplam 4 tane delesyon kaydedilmiştir.

Toplam düzensizlik sayısı 93'tür. Bunların 36 tanesinde A grubu kromozomlarında, 34 tanesi B grubu kromozomlarda, 13 tanesi C-X grubu kromozomlarda, 8 tanesi D grubu kromozomlarda 2 tanesi E grubu kromozomlarda tespit edilmiştir. G-Y grubunda hiç düzensizliğe rastlanmamıştır.

Kromozom grupları içerdikleri yapısal düzensizliklerin çokluğuna göre kromozom grupları A, B, C-X, D, E grubu kromozomları olarak sıralanabilir.

Deney gruplarında toplam 171 tane kromatid gap 130 tane izokromatid gap, 175 tane kromatid kırık, 193 tane izokromatid kırık, 66 tane delesyon kaydedilmiş.

Toplam düzensizlik sayısı 735'tir.

Kromozom gruplarını içerdikleri yapısal düzensizliklerin çokluğuna göre sıraladığımızda ilk grubu A grubu oluşturuyor. A grubunun toplam düzensizliğe oranı %36,32'dir. B grubu toplam düzensizliğin %25,52'sini CX grubu % 20.81'ini E grubu %5.71'ini D grubu %5.03'ünü, en son olarak F grubu kromozom %2.58'ini oluşturur (Çizelge 10, 11).

Düzensizlik tipleri Gruplar	A	B	C+X	D	E	F	G+Y	Top.	Top. %
Kromatid Gap	4	8	1	3	-	-	-	16	17.20
İzokromatid Gap	9	7	3	1	-	-	-	20	21.50
Kromatid kırık	16	13	4	2	2	-	-	37	39.70
İzokromatid kırık	6	5	4	1	-	-	-	16	17.20
Delesyon	1	1	1	1	-	-	-	4	4.30
Toplam	36	34	13	8	2	-	-	93	
Genel Toplam %	38.70	36.55	13.97	8.60	2.18	-	-	-	100

Çizelge 10: Kontrol gruplarında rastlanan yapısal kromozom düzensizliklerinin tiplere ve kromozom yapılarına göre dağılımı

Düzensizlik tipleri Gruplar	A	B	C+X	D	E	F	G+Y	Top.	Top. %
Kromatid Gap	60	60	24	12	13	2	-	171	23.30
İzokromatid Gap	39	38	37	3	11	2	-	130	17.68
Kromatid kırık	78	51	36	7	3	-	-	175	23.80
İzokromatid kırık	73	60	45	4	9	2	-	193	26.25
Delesyon	17	8	11	11	6	13	-	66	8.97
Toplam	267	217	153	37	42	19	-	735	
Genel Toplam %	36.32	29.52	20.81	5.03	5.74	2.58	-	-	-

Çizelge 11: Deney gruplarında rastlanan yapısal kromozom düzensizliklerinin tiplere ve kromozom yapılarına dağılımı

4.3.Sayısal kromozom düzensizliğine ait bulgular:

5 denek'e ait sayısal kromozom düzensizlik (Endomitoz, endoreduplikasyon) bulguları kontrol ve deney gruplarında şöyle kaydedilmiştir.

Kontrol 6 saatte 1, kontrol 24 saatte 2 olarak kaydedilmiş. Kontrol 48 saatte hiç kaydedilmemiştir. Deney gruplarında; 0,3 µg/ml'lik deney gruplarının 6 saatlik uygulanmasında 1/24 saatlik uygulamasında 2/48 saatlik uygulamada 1 olarak kaydedilmiştir. 3 µg/ml'lik deney grubunun 6 saatlik uygulamasında 1,24 saatlik uygulamasında 1,48 saatlik uygulamasında 1 olarak kaydedilmiştir.

30 µg/ml'lik deney grubunun 6 ve 24 saatlik uygulamalarında sayısal düzensizlik kaydedilmemiş, 30 µg/ml'lik deney grubunun 48 saatlik uygulamasında 1 tane sayısal düzensizlik kaydedilmiştir.

Poliploid hücre oranları her deneğin farklı doz süre kombinasyonu için farklı bulunmuştur.

Ancak rastlanan poliploid hücre oranları çok düşük olduğundan istatistiksel açıdan yalnızca süre dışlandığında doz dışlandığında sürenin etkisi incelenmiştir.

4.3.1.Süre Dışlandığında Doz Faktörünün Poliploid Hücre Oluşumuna Etkisi:

Sürenin dışlanması ile dozun poliploid oluşumuna etkisinin belirlenmesi için kontrol ve deney gruplarında rastlanan sıklıklar Çizelge 12'de gösterilmiştir.

Poliploid olgularının oranı her deneğin farklı doz ve farklı süre kombinasyonları için değişmekle beraber genel bulunma oranı %0.36'dır. En yüksek poliploid hücre oranı 0,3 µg/ml'lik deney gruplarında olup %0.53'tür. En düşük oranı ise %0.13 ile 30 µg/ml'lik deney grubunda rastlanmıştır (Çizelge 12, 13).

Grup	İncelenen hücre sayısı	Poliploid hücre sayısı	Poliploid hücre %
Kontrol grup	750	3	0.40
0.3 µg/ml	750	4	0.53
3 µg/ml	750	3	0.40
30 µg/ml	750	1	0.13
Toplam	3000	11	0.36

Çizelge 12: Süre dışlandığında dozun etkisiyle oluşan poliploid oranları

Grup	İncelenen hücre sayısı	Poliploid hücre sayısı	Poliploid hücre %
6 saat	1000	3	0.3
24 saat	1000	5	0.5
48 saat	1000	3	0.3
Toplam	3000	11	0.36

Çizelge 13: Doz dışlandığında süre etkisinde oluşan poliploid hücre oranları

4.4.Satellit Assosiasyonlarına Ait Bulgular:

İnsanda D ve G grubu kromozomların P (kısa) koluna bir sapla bağlı satellit adı verilen küçük kromatin parçacıkları bulunur. Metafaz plakları incelemeye alındığı zaman D ve G grubu kromozomların kendi aralarında ve birbirleriyle karışık olmak üzere çoğunlukla ikili ve üçlü, gittikçe azalan miktarlarda da dördü ve 5'li gruplar halinde toplanarak satellitleri birbirine bakacak şekilde rozetsi görünüm oluştururlar. Böyle görünüm genellikle satellit assosiasyonu olarak adlandırılmamaktadır.

Satellit assosiasyonları genelde kromozomal düzensizlik olarak adlandırılmaktadır. Ancak bazı kaynaklarda satellit assosiasyonlarının anöploidi tipi kromozom düzensizliklerinin nedeni olabildiği şeklinde görüşler bulunmaktadır.

Satellit assosiasyonları 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 'lik ve 3 $\mu\text{g/ml}$ 'lik deney gruplarında en fazla, kontrol grubunda daha az 30 $\mu\text{g/ml}$ 'lik deney gruplarında ise en az olarak kaybedilmiştir (Çizelge 14).

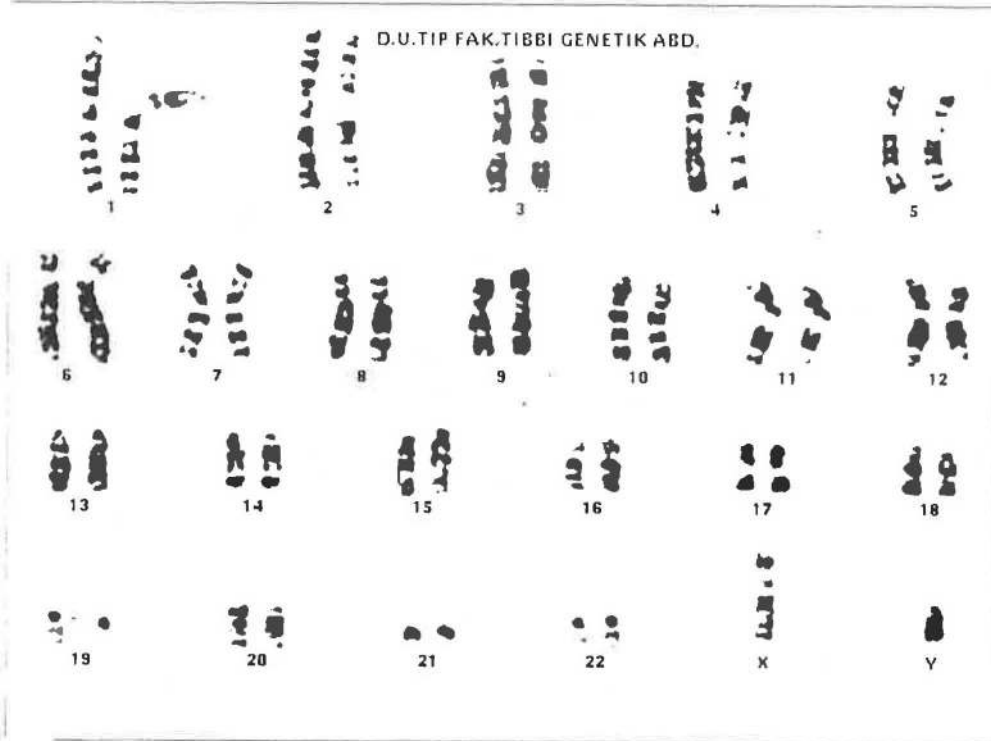
Doz-Süre Kombinasyonu	İncelenen Met. sayısı	Satellit Assosiasyon sayısı	Satellit Assosiasyon %
Kontrol - 6 saat	250	17	6.8
Kontrol - 24 saat	250	9	3.6
Kontrol - 48 saat	250	16	6.4
0.3 µg/ml - 6 saat	250	11	4.4
0.3 µg/ml - 24 saat	250	17	6.8
0.3 µg/ml - 48 saat	250	19	7.6
3 µg/ml - 6 saat	250	19	7.6
3 µg/ml - 24 saat	250	36	14.4
3 µg/ml - 48 saat	250	17	6.8
30 µg/ml - 6 saat	250	15	6
30 µg/ml - 24 saat	250	27	10.8
30 µg/ml - 48 saat	250	10	4
Toplam	3000	213	7.1

Çizelge 14: Satellit assosiasyon sayısı ve yüzdeleri

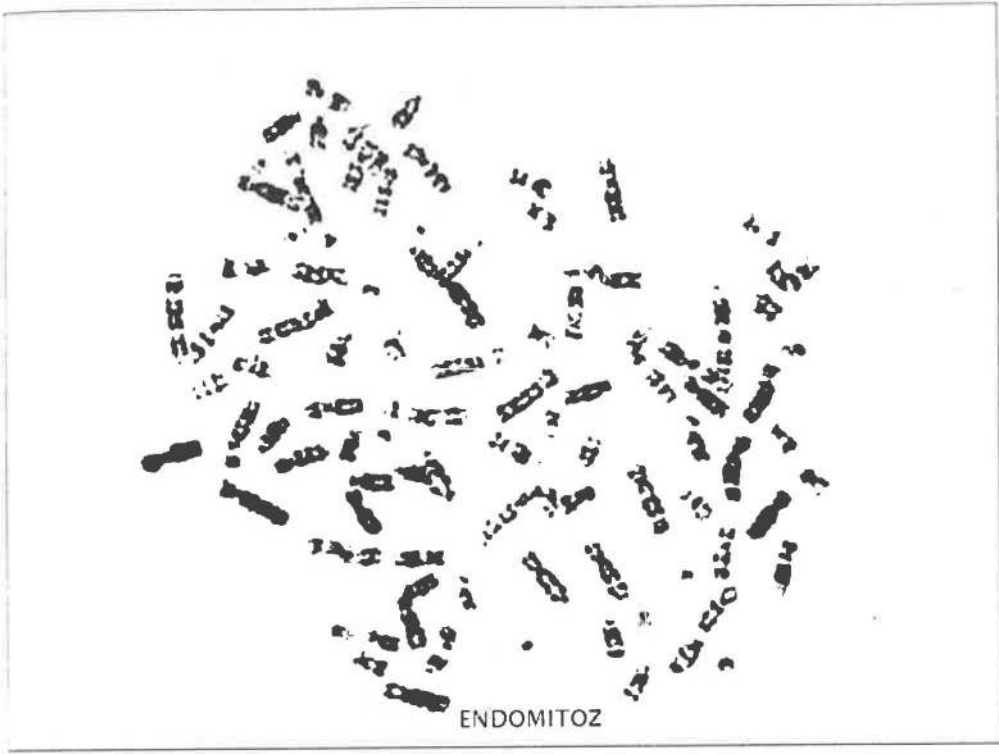
4.5.BULGULARA AİT ÇİZELGE VE ŞEKİLLER

Kimyasalın Dozu ve uygulama süresi	İncelenen Metafaz Sayısı	Normal Metafaz Sayısı	Düzensizlik İçeren Hücre Sayısı	Düzensizlik İçeren Hücre Sayısı %'si	YAPISAL DÜZENSİZLİKLER								Toplam Yapısal Düzensizlikler	Toplam Yapısal Düzensizliklerin İncelenen Metafaz Sayısına Oranı %	SAYISAL DÜZENSİZLİKLER		Toplam Düzensizlik	Toplam Düzensizliklerin İncelenen Metafaz Sayısına Oranı %	Satellit Asosiasyonu
					Kromatid Gap	İzokromatid Gap	Kromatid Kırık	İzokromatid Kırık	Ekziline (Delesyon)	Fragment	Artma (Duplikasyon)	Diğer Yapısal Düzensizlikler			Endomitoz	Endoreduplikasyon			
Kontrol / 6 Saat	250	188	62	24.8	3	5	14	3	2	1	0	9	34	13.6	1	0	35	1.4	17
Kontrol / 24 Saat	250	169	82	32.8	5	9	13	6	1	1	3	33	71	28.4	0	1	72	28.8	9
Kontrol / 48 Saat	250	136	70	28	7	7	12	6	2	1	1	24	60	24	0	0	60	24	16
0,3µg/ml/ 6 Saat	250	169	81	32.4	7	7	22	3	2	2	1	33	77	30.8	0	1	78	31.2	11
0,3µg/ml/ 24 Saat	250	152	88	35.2	15	11	7	6	3	4	1	28	75	30	1	1	77	30.8	20
0,3µg/ml/ 48 Saat	250	133	105	42	7	12	17	15	4	3	3	41	102	40.8	0	1	103	41.2	19
3µg/ml/ 6 Saat	250	152	98	39.2	13	10	17	11	6	1	4	24	86	34.4	0	1	87	34.8	19
3µg/ml/ 24 Saat	250	107	143	57.2	8	19	34	20	5	6	6	36	134	53.6	1	0	135	54	36
3µg/ml/ 48 Saat	250	87	150	60	26	14	21	33	4	10	4	53	165	66	1	0	166	66.4	17
30µg/ml/ 6 Saat	250	122	107	42.8	31	10	19	12	5	2	3	46	128	51.2	0	0	128	51.2	12
30µg/ml/24 Saat	250	76	174	69.6	24	9	28	33	19	5	14	63	195	78	0	0	195	78	27
30µg/ml/48 Saat	250	60	170	68	32	30	19	64	18	4	7	75	249	99.6	0	1	250	10	10
TOPLAM	3000	1551	1330	532	178	143	223	212	71	40	47	465	1376	550.4	4	6	1386	451.8	213
Toplam Yapısal Düzensizliğin İncelenen Metafaz Sayısına Oranı		51.7	44.33	17.73	5.9	4.8	7.4	7.1	2.4	1.3	1.6	16	45.87	18.35	0.1	0.2	46.2	15.06	7.1

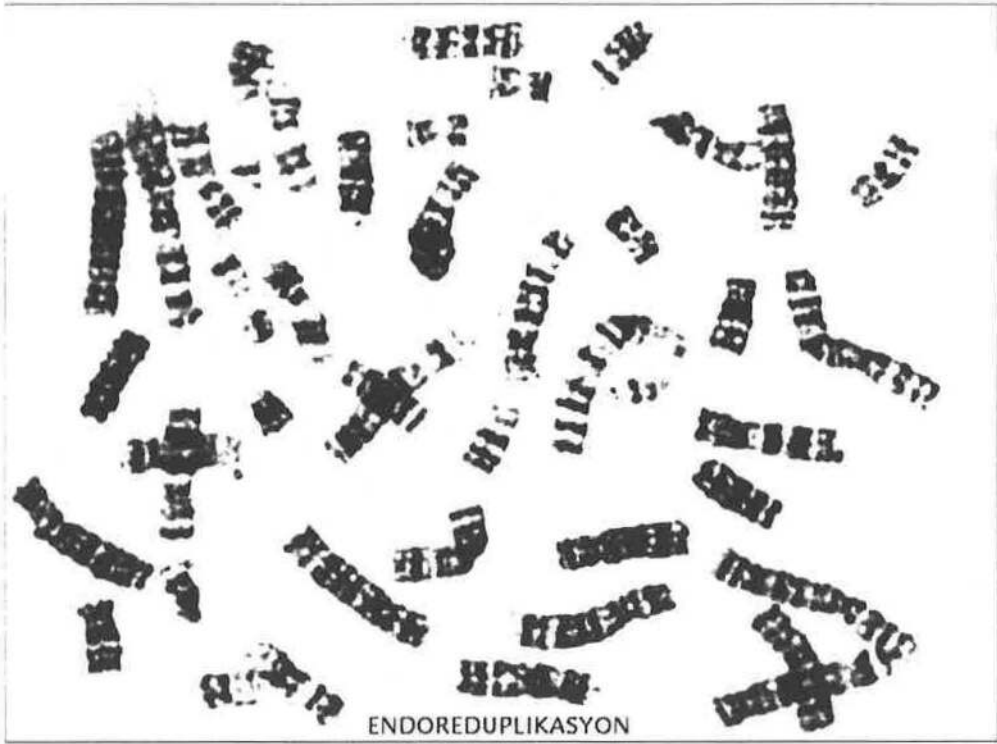
Şekil 15: Farklı doz-süre kombinasyonlarında Bleomycin+sigara etkisi ile oluşan kromozomal düzensizliklere ait genel sonuçlar



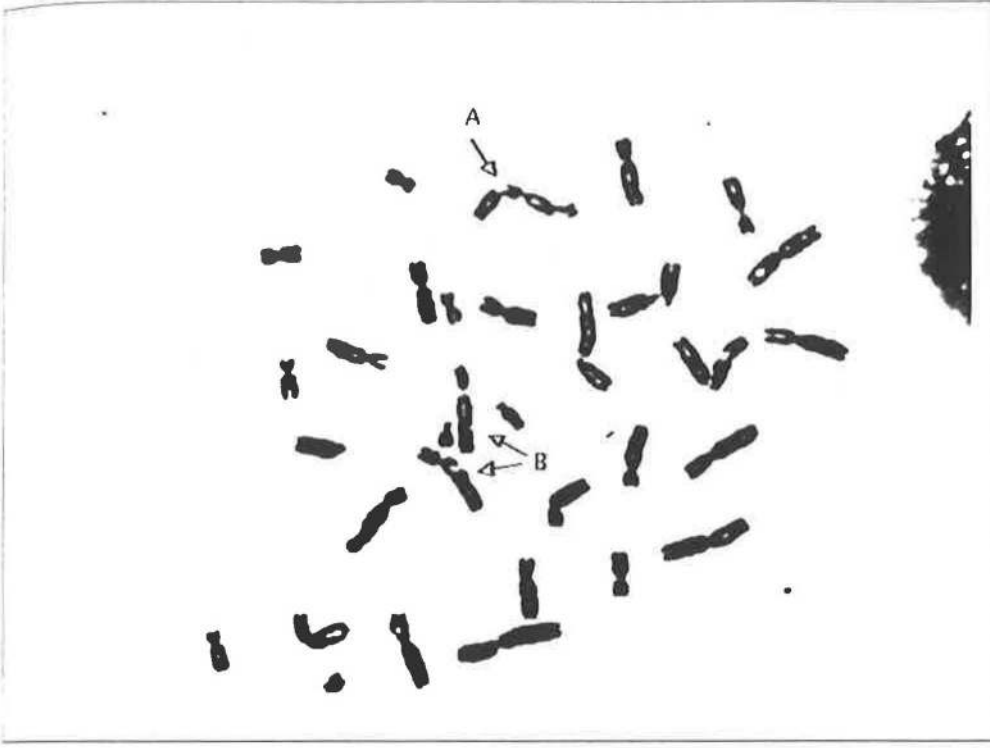
Şekil 1: Giemsa bantlama yöntemi ile elde edilmiş ve Denver sistemine göre hazırlanmış normal bir erkeğe ait karyotip.



Şekil 2: Endomitoz kökenli tetraploid hücre ($4n=92$)



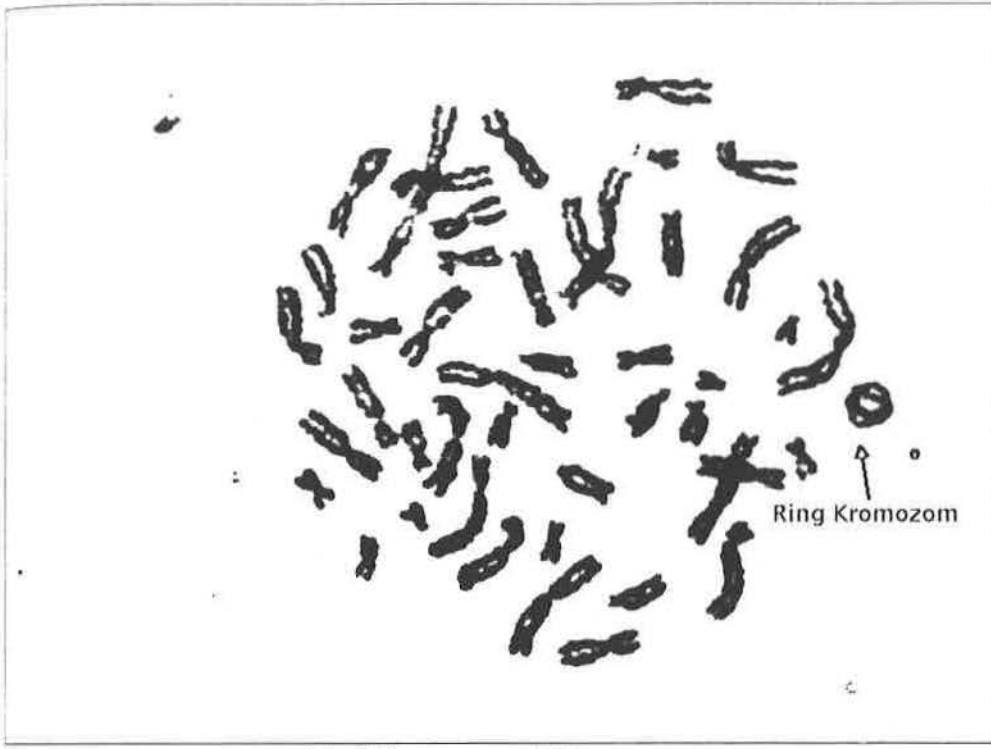
Şekil 3: Endoredüplikasyon kökenli tetraploid hücre
(Giemsa bantlama yöntemi ile elde edilmiş)



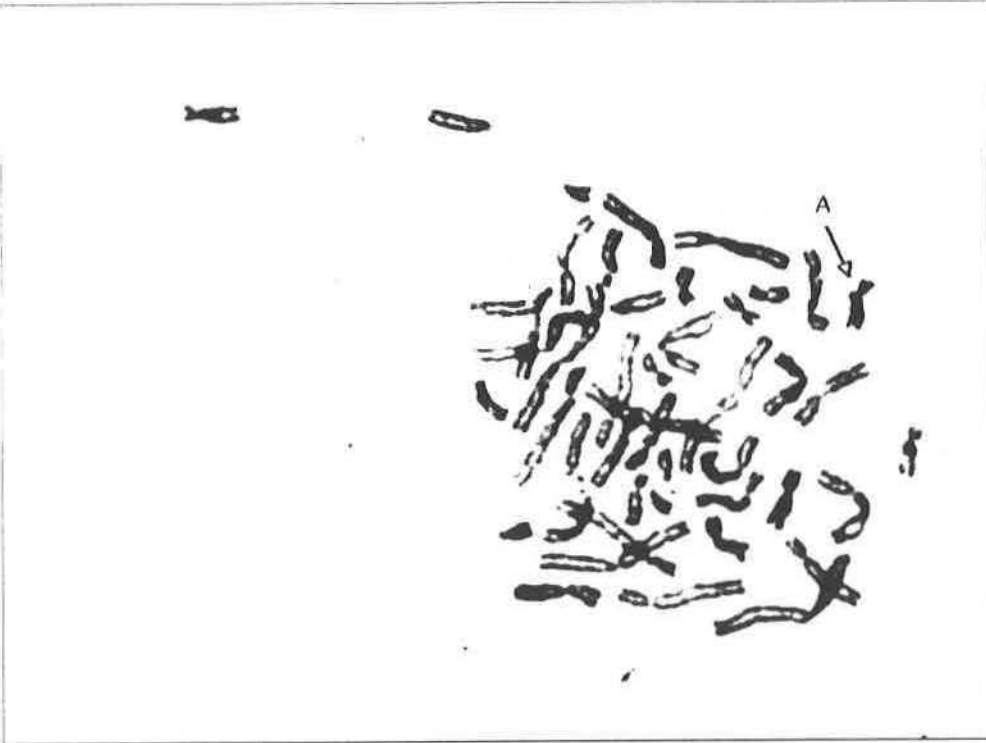
Şekil 4: A. Kromozom kırık B. Kromatid gap



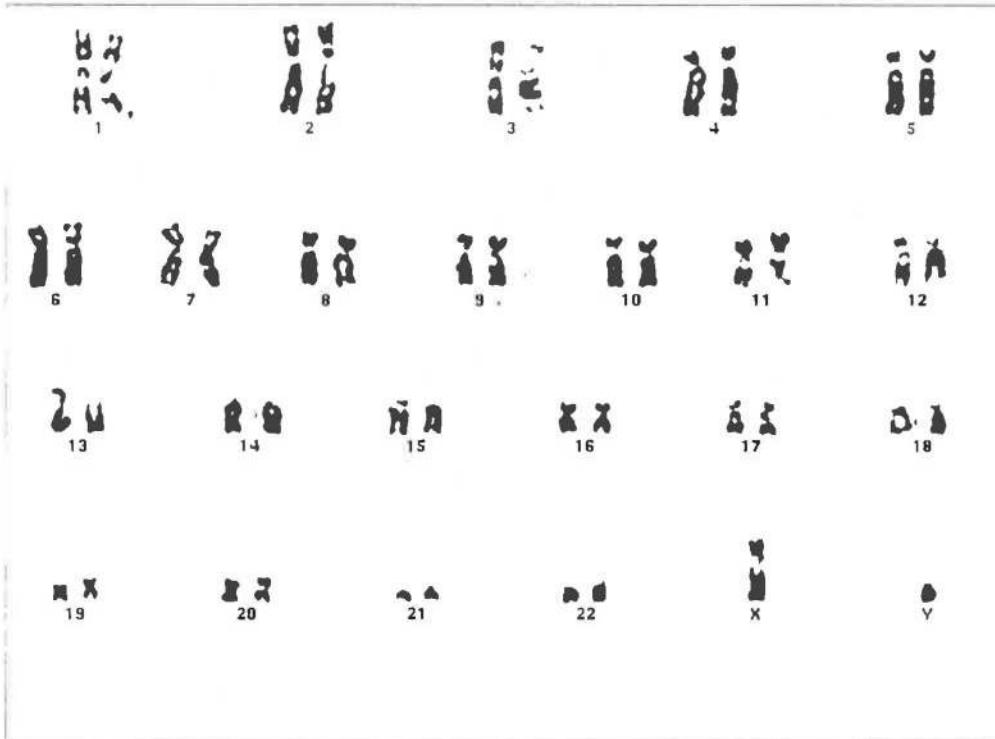
Şekil 5: C. Delesyon



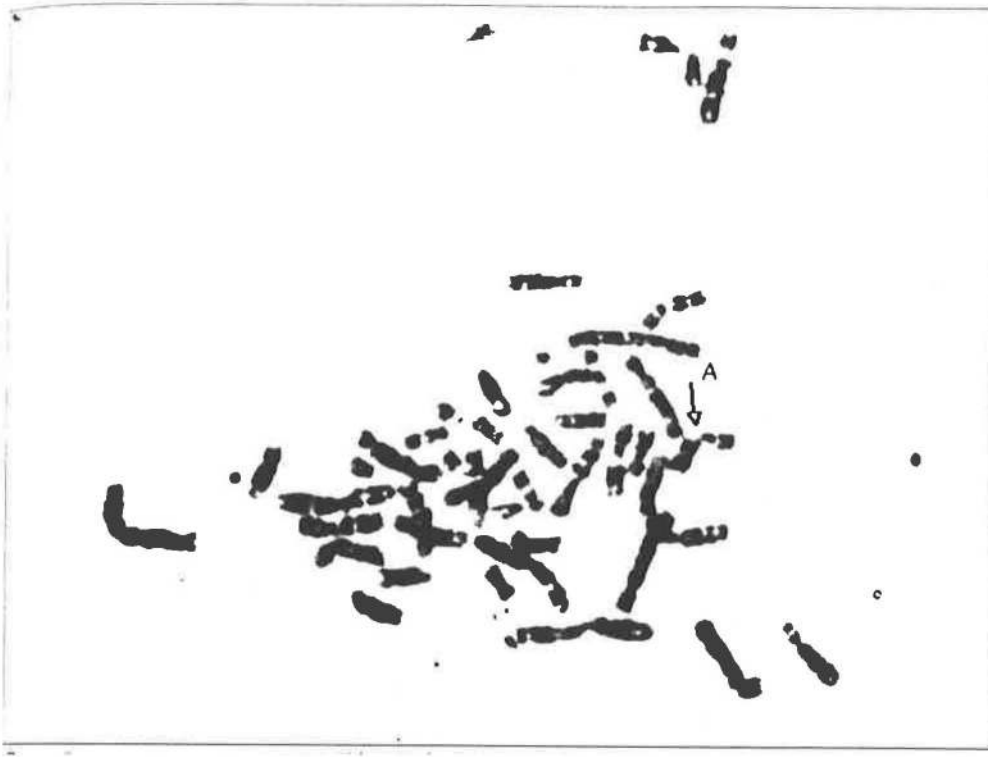
Şekil 6: Ring kromozom



Şekil 7: A. İzokromatid kırık



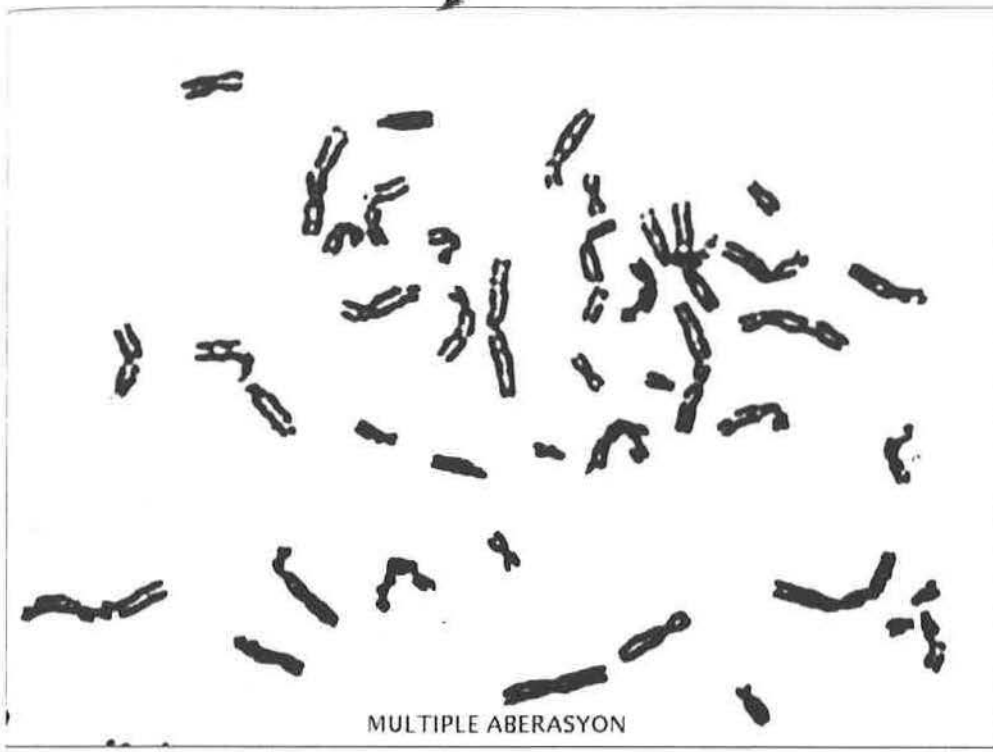
Şekil 8: A. İzokromatid kırık



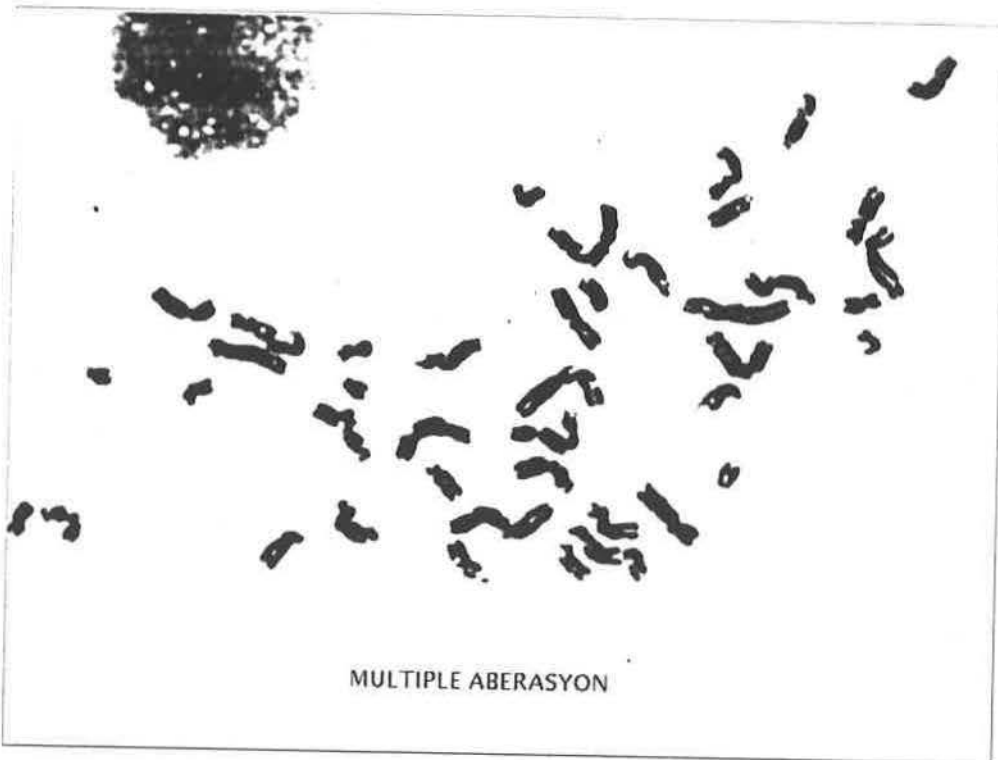
Şekil 9: A. Kromatid kırık



Şekil 10: B. İzokromatid kırık C. Minör kromozom



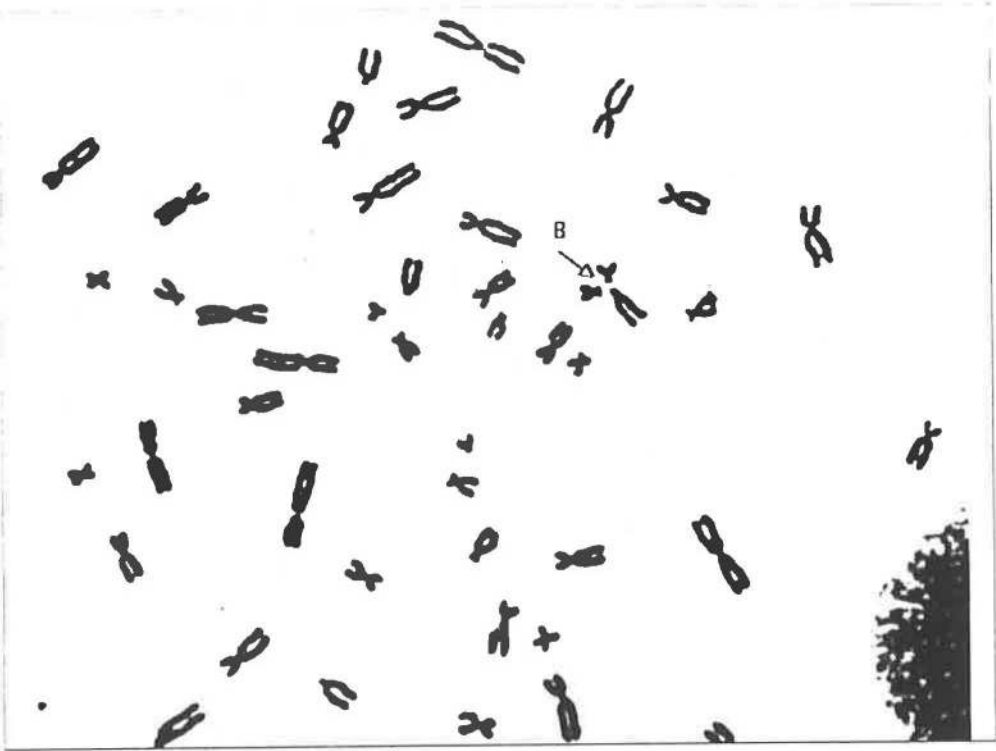
Şekil 11: Multiple Aberasyon



Şekil 12: Multiple Aberasyon



Şekil 13: GGG Assosiasyonu



Şekil 14: DGG Assosiasyonu

5.TARTIŞMA

3 doz, 3 farklı süre kombinasyonlu, 3 tekerrürlü ve kontrollü yapılan araştırmamızın bulguları kendi içinde ve mevcut literatür bilgisinin ışığında tartışılmıştır.

5.1.Sayısal Kromozom Düzensizlikleri

Sigara içen normal sağlıklı bireylerde kontrol ve deney gruplarında toplam 3000 metafazda 11 tane tetraploidi tipi poliploid hücre belirlenmiştir. Bunların 3 tanesi kontrol gruplarında 8 tanesi ise deney gruplarında incelenmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeye göre kontrol ve deney grupları arasındaki farkın önemli olduğu anlaşılmıştır.

Kontrol ve deney gruplarında tetraploid hücre yüzdeleri şöyle sıralanmaktadır. Kontrol grubunda %0.40, 0.3 µg/ml'lik deney grubunda %0.53, 3 µg/ml'lik doz grubunda %0.40, 30 µg/ml'lik doz grubunda ise %0.36 olarak bulunmuştur.

Promchainant (46) 1974'de insan leucocytlerin üzerine bleomycinin in vitro sitogenetik etkilerini araştırdığı bir çalışmada nadir de olsa endoreduplikasyonlara rastlandığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda endoreduplikasyonlara rastlanmış bulunması dikkate alındığında promchainant ile bu konudaki bulgularımızın uyum içinde olduğu söylenebilir.

5.2.Düzensizlik İçeren Metafaz Oranları ve Yapısal Kromozom Düzensizlikleri:

5.2.1.Kontrol Grubu:

Sigara içen sağlıklı bireylerde kontrol grubunda 6, 24 ve 48 saatlik uygulama süreleri için incelenen toplam 750 hücrede 171 adet düzensizlik içeren hücre ve düzensizlik içeren metafaz oranı %22.8 dir. Yapılan düzensizlik tipleri yoğunluklarına göre sıralandığında %39.78'le kromatid kırık, %21.50 izokromatid gap, kromatid gap ve izokromatid kırık %17.20, delesyon %4.30 şeklinde sıralanmaktadır.

Vijayalexmi ve Evans (72) 1982 yılında, sigara kullanımının kromozomal hasarlara etkisini belirlemek için yaşları 25 ile 55 arasında değişen 27 bayan ve 28 erkekte inceledikleri 5500 metafazda %8.16 oranında yapısal kromozom düzensizliği

belirlemişlerdir. Bu oran kontrol grubunda ise %5.68 dir. Düzensizlik içeren hücre oranı sigara içmeyenlerde %2.22 sigara içenlerde ise %3.20 olarak belirlenmiştir ($P<0.05$).

Littlefield ve Joiner (32) 1986 yılında, ağır sigara tiryakilerinde kromozom düzensizliklerini araştırdıkları çalışmada, sigara içenlerde %4.59 oranında yapısal kromozom düzensizliği belirlemişlerdir. Bu oranın sigara içmeyenlere eşit oranlara göre 4 kat daha yüksek olduğunu saptamışlardır.

Sinues ve arkadaşlarının (54) 1990 yılında yaptıkları çalışmada sigara içmenin, kromozom tipi ve kromatid tipi düzensizliklere etkisini araştırmışlardır. Toplam 94 kişiden oluşan grupta 53'ü sigara içen grubu ve 41'i ise sigara içmeyenleri oluşturmaktaydı.

İstatistiksel değerlendirmede kromozom bozulmalarının frekansının sigara içenlerde sigara içmeyenlerden daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir ($P<0.01$).

Tawn ve arkadaşları (61) 12 orta dereceli sigara içen ve 12 sigara içmeyenlerin kan lenfosit kültürlerinde hücre analizi yapmışlardır.

Toplam her birinden 6000 metafaz kaydedilmiştir. Grubun yaş ortalamaları sigara içenlerde 35.5 sigara içmeyenlerde ise 35.3'tür. Sigara içmeyenlerde disentrik frekansı 0.17 ± 0.17 iken sigara içenlerde 0.67 ± 0.33 idi. Asentrik frekansı sigara içmeyenlerde 1.00 ± 0.41 , sigara içenlerde 0.83 ± 0.37 idi.

Hopkin ve Evans (23) 1980 yılında, sigara içenlerde DNA hasarı ve akciğer kanseri riskini araştırdıkları çalışmada SCE frekansının sigara içenlerde içmeyenlere göre daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir ($P<0.01$). Ayrıca akciğer kanserine yakalanma riskinin sigara içenlerde daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir.

Reidy ve arkadaşlarının (48) 1989'da yaptıkları çalışmada kromozom tip ve kromatid tip bozulmaları araştırmışlardır. 30 sigara içen ve 30 sigara içmeyen kişilerin kanları kullanılmış. Sigara içenler en az 5 yıl günde 1 paket (20 sigara), sigara içenlerden seçilmiş. Sigara içmeyenler ise evvelki 5 yıl içinde hiç sigara içmemiş ve bir sigara içenlerle de birlikte yaşamamış kişilerden oluşturulmuş. Her hücre kültüründen 100 metafaz değerlendirilmiş. Yapılan istatistiksel

değerlendirmede kromatid ve kromozom tipi düzensizliklerin sigara içenlerde içmeyenlerden daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir.

Obe ve Herba (38) 1978 yılında sigara tiryakilerinde kromozom düzensizlikleri konulu çalışmada; sigara içenlerde incelenen 3823 metafazda toplam 26 adet exchange tipi (10 disentrik kromozom, 2 ring kromozom, 13 triradyal ve 1 quadiradyal görüntü) düzensizlik belirlemişlerdir. Kontrol grubunda ise 14164 mitozda 16 exchange tipi düzensizlik (5 disentrik, 11 triradyal ve quadiradyal görüntü) saptamışlardır. Sonuç olarak sigara içmeyenlerde 10.000 mitoz da 11.269 olan exchange tipi düzensizlik sigara içenlerde 68.009'a yükselmiştir ($P<0.01$).

Spita ve arkadaşları (56) 1989 yılında üst solunum yolu kanserlilerde bleomycin mutajenik etkilerini araştırdıkları çalışmada; sigara içen pharinx kanserlilerde %4.5, sigara içen larinx kanserlilerde %10.8 ve oral cavity kanserlilerde %2 oranında kromozom düzensizliği saptamışlardır. Günlük içilen sigara miktarına göre; sigara içmeyenlerde %1, 1-14 sigara içmeyenlerde %0.7, 15-24 sigara içenlerde %2.8, 25'den fazla içenlerde ise %12.7 oranında kromozomal düzensizlik belirlemişlerdir.

Brinkworsth ve arkadaşları (12) 1992 yılında, sigara içenlerde ve içmeyenlerde onkogen ürünleri ve sitogenetik ölçütler konulu çalışmalarında, kromozomal düzensizlik oranlarının sigara içmeyenlere göre sigara içenlerde daha yüksek olduğunu saptamışlardır ($P<0.05$).

Sigara içen kontrol grubumuzda oluşan kromozom düzensizliğine ait oranlarımız yukarıdaki literatür bulguları ile karşılaştırıldığında; büyük bir çoğunluğu benzerlik göstermektedir.

Osento ve arkadaşlarının (41) 1991'de sigara içen 15 ve sigara içmeyen 22, toplam 37 testiküler kanserli hastada yaptıkları araştırmada bleomycinin kromozomal kırıklara neden olduğunu göstermişlerdir. Fakat sigara içenler ve sigara içmeyenlerde bir fark olmadığını kaydetmişlerdir ($P>0.005$).

Spita ve arkadaşlarının (56) 1989'da değişik kanserli hastalarda yaptıkları çalışmada bleomycinin yapısal kromozom düzensizliklerinin (gap ve kırık) frekansında artış yaptığını rapor etmişlerdir.

Veronchousky ve arkadaşlarının (73) 1989'da 19 testiküler kanserli hastada ve 22 sağlıklı bireyde bleomycinin etkisini araştırdıkları çalışmada;

Bleomycinle muamele edilmiş lenfositlerde; kanserli hastalarda kontrol grubundan daha fazla aberasyonlu hücre frekansının artmış olduğunu ve daha yüksek sayıda kırıkların oluştuğunu rapor etmişlerdir. (Kanser hastalarında 1.60, kontrol grubunda 0.67) Fark anlamlıdır ($P<0.01$).

5.2.2. Doz Grupları Bulguları

a) 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 'lik Doz grubu

0.3 $\mu\text{g/kg}$ 'lik bleomycinin dozunun 6, 24 ve 48 saatlik uygulama süreleri için incelenen 750 metafazda toplam 258 adet düzensizlik içeren hücre toplam 254 adet yapısal kromozom düzensizliği saptanmıştır. Düzensizlik içeren hücre oranı %34.4, yapısal kromozom düzenliği oranı ise %33.86'dır. Yapısal düzensizlik tipleri yoğunluk sırasına göre kromatid kırık %6.1, izokromatid gap %4, kromatid gap %3.8, izokromatid kırık %3.2, eksilme ve fragment %1.2 ve artma %0.6 olarak sıralanmaktadır.

b) 3 $\mu\text{g/ml}$ 'lik Doz grubu

3 $\mu\text{g/ml}$ 'lik bleomycin dozunun 6, 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinde incelenen 750 metafazda toplam 387 adet düzensizlik içeren hücre ve 385 adet yapısal kromozom düzensizliği belirtilmiştir.

Düzensizlik içeren hücre oranı %51.6 ve yapısal kromozom düzensizlik oranı %51.33'dür. Yapısal düzensizlik tipleri yoğunluklarına göre; kromatid kırık %9.6, izokromatid kırık %8.5, kromatid gap %6.2, izokromatid gap %5.7, fragment %2.2, eksilme (delesyon) %2, artma (duplikasyon) %1.8 olarak sıralanmaktadır.

c) 30 $\mu\text{g/ml}$ 'lik Doz grubu

30 $\mu\text{g/ml}$ 'lik bleomycin dozunun 6, 24 ve 48 saatlik uygulama sürelerinde incelenen 750 metafazda toplam 573 ve 572 adet yapısal kromozom düzensizliği kaydedilmiştir. Düzensizlik içeren hücre oranı %76.4 ve yapısal kromozom düzensizlik oranı %76.26'dır.

Yapısal kromozom düzensizliği tipleri yoğunluklarına göre; izokromatid kırık %14.5, kromatid gap %11, kromatid kırık %8.8, izokromatid gap %6.5, delesyon (eksilme) %5.6, artma (duplikasyon) %3.2, fragment %1.4 tür.

Budak ve arkadaşları (13) 1991 yılında yaptıkları çalışmada sigara içen bireylerde %4.22 düzensizlik içeren hücre ve %3.77 yapısal kromozom düzensizliği belirlemişlerdir. Ayrıca bu oranların sigara içmeyenlere göre daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir ($P<0.05$).

Sigara kullanımı + bleomycin etkisi ile oluşan kromozom düzensizliklerine ait oranlarımız, yukardaki literatür bulguları ile karşılaştırıldığında belli bir kısmı ile benzerlikler göstermektedir. Fakat sigara kullanımı + bleomycin kombine etkilerini araştıran bir yayına rastlamadığımız için bleomycin uygulama şekli, uygulama süresi farklı olması nedeniyle oranlar arasında sağlıklı bir kıyaslama yapılamamıştır.

5.3.Kromozom Gruplarına Göre Yapısal Kromozom Düzensizlikleri

Kromozomların uzunluklarına göre etkilenmelerini incelediğimizde büyük kromozomların küçük kromozomlara göre daha fazla etkilendiği gözlenmiştir. Kromozomlarda oluşan düzensizlikler genellikle kırıklar, gaplar ve delesyonlar şeklinde saptanmıştır. Bleomycinin DNA'nın yapısını bozduğunu, DNA zincirinin kırılmasına sebep olduğunu düşürerek büyük kromozomların daha uzun DNA içerdiklerinden; bleomycin için daha büyük bir hedef olduğu da düşürülebilmektedir.

Yaptığımız çalışmada kontrol grubunda 93, deney grubunda 735 tane kromatid gap izokromatid gap, kromatid kırık, izokromatid kırık ve delesyon tipi düzensizlik kaydedilmiştir.

X kromozomu, C grubu kromozomları, Y kromozomu ise G grubu kromozomları içinde kabul edilmiştir. Deney gruplarında ve kontrol gruplarında belirlenen kromatid ve izokromatid kırık ve gap ve ayrıca delesyon tipi kromozom düzensizliklerinin, kromozom gruplarına göre dağılımları çizelge 10 ve 11'de gösterilmiştir.

İki çizelgeyi değerlendirdiğimizde, kontrol grubunda A, B ve C-X grubu kromozomlarda daha fazla düzensizlik kaydedilmiş. D ve E grubunda daha az sayıda düzensizlik kaydedilmiş. F ve G-Y grubunda hemen hemen hiç düzensizlik

saptanmamış. Deney gruplarını değerlendirdiğimizde A, B ve C-X grubunda düzensizlik daha çok saptanmıştır. D ve E grubunda kontrol grubuna göre daha fazla kromatid gap, izokromatid gap, kromatid kırık, izokromatid kırık ve delesyon saptanmıştır. F grubu kromozomlarda ise 19 tane düzensizlik saptanmıştır.

Promchainant (46) 1975 yılında yaptığı bir çalışmada A, B, C ve D grubu kromozomlarında E grubu kromozomlara göre daha fazla düzensizlik saptamış, F ve G grubu kromozomları ile Y kromozomunun hiç etkilenmediğini rapor etmiştir.

Bu konudaki bulgularımız Promchainant'ın bulguları ile hemen hemen uygunluk göstermektedir.

5.4.Satellit Assosiasyonları

Genel olarak satellit assosiasyonları kromozomal bir düzensizlik olarak kabul edilmemektedir. Ancak satellit assosiasyonlarının aneuploidy tipi sayısal kromozom düzensizliklerine neden olduğu konusunda görüşler ile sürüldüğünden tarafımızdan değerlendirilmiştir (1).

Gözlemlerimizde 0.3, 3 ve 30 µg/ml'lik bleomycin dozlarının her üç uygulama süresinde (6, 24 ve 48 saat) kontrolden farklı olduğu istatistiksel değerlendirmede kaydedilmiştir.

Satellit assosiasyonlarının büyük çoğunlukla DD ve DG ve GG biçimde ikili olmakla beraber D ve G grubu kromozomların değişik kombinasyonlarına rastlanmıştır.

6.SONUÇ

3 farklı doz, 3 farklı süre ve bunların kontrollerinden oluşan çalışmamızda elde ettiğimiz bulguların değerlendirme sonuçları aşağıda çıkarılmıştır.

1- Bleomycin dozunun artırılmasına paralel olarak uygulama süresi de arttırıldığında düzensizlik içeren metafaz sayısının arttığı ($P<0.01$), bleomycin uygulama süresinin artmasına bağlı olarak kromozomal düzensizlik içeren hücre sayısında bir artış olduğu ($P<0.01$) ve süre sabit tutularak dozun arttırılması ile düzensizlik içeren hücre sayısının arttığı belirlenmiştir.

2-Kromozomlarda yapısal düzensizlik oluşumunu incelemek için yapılan istatistiksel değerlendirmeye göre doz artışına paralel olarak sürenin artırılmasının kromozomlarda yapısal düzensizlik oluşumunu etkilediği ($P<0.01$), bleomycin dozunun artırılması ile yapısal kromozom düzensizliklerinde artış olduğu ($P<0.01$) bleomycin uygulama süresinin artırılmasına bağlı olarak yapısal kromozom düzensizliklerin artmadığı ($P>0.05$) tespit edilmiştir.

Etkileşime göre yapılan istatistiksel değerlendirmede yapısal düzensizlik durumunda doz grupları arası farkın anlamlı olduğu ($P<0.01$), süre grupları arasındaki yapısal düzensizliklerin anlamsız olduğu tespit edilmiştir ($P>0.05$).

Ortalamalar arası fark önem kontrolü ile ilgili olarak yapılan istatistiksel değerlendirmede; dozlar karşılaştırıldığında 0.3 $\mu\text{g/ml}$ ile kontrol grubu arasındaki yapısal kromozom düzensizliği oluşumu bakımından farkın anlamlı olmadığı ($P>0.05$), 3 $\mu\text{g/ml}$ ile kontrol grubu arasında farkın anlamlı olduğu ($P<0.05$), 3 $\mu\text{g/ml}$ ile 0.3 $\mu\text{g/ml}$ arasında farkın anlamlı olduğu ($P<0.05$), 30 $\mu\text{g/ml}$ ile kontrol grubu arasındaki farkın da anlamlı olduğu ($P<0.05$) saptanmıştır.

Yapısal kromozom düzensizlikleri kromozom gruplarına göre dağılımı açısından incelendiğinde, kontrol gruplarında yapısal düzensizlik sırası A, B, C-X, D, E grubu olarak saptanmıştır. Deney gruplarında bu sıra A, B, C-X, E, D ve F grubu olarak sıralanmıştır.

3-Süre dışlandığında en yüksek poliploid hücre oranı 0.3 µg/ml'lik deney grubunda olup bulunma oranı %53'tür. En düşük oranı ise 30 µg/ml'lik deney grubunda olup %0.13 olarak tespit edilmiştir.

4-Satellit assosiasyonları herhangi bir kromozom düzensizliği olarak kabul edilmemekle beraber 0.3 µg/ml'lik ve 3 µg/ml'lik deney gruplarında en fazla, kontrol ve 30 µg/ml'lik deney grubunda ise en az olduğu tespit edilmiştir.

7.ÖZET

Bu çalışmamız 5 sigara tiryakisi (8 yıldan beri günde en az 2 paket sigara içen) deneke ait 0.3, 3 ve 30 $\mu\text{g/ml}$ dozda bleomycin 6, 24 ve 48 saat süre ile in vitro koşullarda uygulanarak kontrollü olarak toplam 3000 metafazla değerlendirilmiştir.

Uygulama sonucu elde edilen bulgular değerlendirildiğinde bleomycin dozunun sabit tutularak sürenin arttırılmasının düzensizlik içeren hücre oluşumunu etkilediği saptanmıştır ($P<0.001$). Bleomycin dozunun arttırılması ile yapısal kromozom düzensizliğinin arttığı gözlenmiştir. Bleomycin dozunun arttırılmasına paralel olarak uygulama süresinin arttırılmasında düzensizlik içeren hücre sayısının arttığı tespit edilmiştir.

Düzensizlik içeren metafaz sayısının normal metafaz sayısına oranı kontrol grubunda %22.8, 0.3 $\mu\text{g/ml}$ 'lik deney grubunda %34.4, 3 $\mu\text{g/ml}$ 'lik deney grubunda %51.6, 30 $\mu\text{g/ml}$ 'lik deney grubunda %76.4 olarak belirlenmiştir.

Bleomycin dozunun artmasına bağlı olarak satellit assosiasyonlarında bir düşme olmaktadır.

Poliploid hücre oluşumu doza bağlı uygulama süresinde değişmemektedir.

8.SUMMARY

In this study, 0.3, 3.0 and 30 $\mu\text{g/ml}$ doses of bleomycin were applied to the blood of 5 smokers (who had been smoking at least two packets a day for 8 years) for 6, 24 and 48 hours under in-vitro conditions, and were assessed by 3000 metaphases in a controlled way.

When the findings obtained through application were evaluated, it was observed that prolonging the time by keeping bleomycin dose constant affect the formation of aberrant cells ($P<0.001$).

It was also observed that structural aberrations were increased by the elevation of bleomycin dose. In addition, it was identified that, in case of prolonging the application time parallel to bleomycin dose, the number of aberrant cells increased.

The ratio of irregular metaphases was found to be 22.8% in control group, 34.4% in experimental group of 0.3 $\mu\text{g/ml}$, 51.6% in experimental group of 3.0 $\mu\text{g/ml}$, and 76.4% in experimental group of 30 $\mu\text{g/ml}$.

Satellit associations, were decreased by increasing of bleomycin dose.

Poliploid cell formation remains unchanged during dose-based application period.

9.KAYNAKLAR

- 1- Akbaşı, E.: Trimethoprim sigara kullanımı ve radyasyonun (X-ışını) insan kromozomlarına etkileri, (Doktora tezi) ,1993, Diyarbakır.
- 2- Aşut, Ö.: Hekim ve sigara. Türk Tabibler Birliği Yayınları 1.Baskı, 1993.
- 3- Bağcı,H.: Tubitak Moleküler Biyoloji ve Gen Mühendisliği Lisanüstü ders notları. 70-74. ODTÜ. Biyoloji Bölümü Ankara, 1985.
- 4- Barranco, S.C.: A Review Of The Survival And Cell Kinetics Effects Of Bleomycin. Current Status and New Developments, Carter, S.K., Crobke, S.T., and Umezawa, H. (Eds.) NY. Academic Press. pp, 81-90, 1978.
- 5- Başaran, N.: Tıbbi Genetik, 3.Baskı. Bilim Teknik Yayınevi, Eskişehir, 1985.
- 6- Berkow, RWD.: The MERCK manuel of diagnosis and theraphy. Çeviri: Pekus RM., 2.cilt, 1731, 1986.
- 7- Bishun, N.P., Valera, N., Williams, D.C.: The effect of bleomycin on rat bone marrow cells. Cytobios. 23:91-92, 1978.
- 8- Bistrovic, M., Maricic, Z., Kolaric, K.: Interaction of bleomycin and radiation in combination treatment on mouse L cells. Int. J. Cancer, 18:540-542, 1976.
- 9- Bleehen, N.M., Gillies, N.E., Twentyman, P.R.: The effect of bleomycin and radiation in combination on bacteria and mammalian cells in culture.Br.J. Radiol. 47:346-351, 1974.
- 10- Boggs, S.S., Sartiano, G.P., De Mezza, A.: Minimal bone marrow damage in mice given bleomycin. Cancer Res, 34: 1932-1942, 1974.
- 11- Bornstein, R.S., Hungerford, D.A., Haller, G., Engstrom, P.F., Yarboro, J.W.: Cytogenetic effects of bleomycin therapy in man. Cancer Res. 31:2004-2007, 1971.

- 12- Brinkworth, M.H., Yardley-Jones, A., Edwards, A.J., Hughes, J.A., Andersen, D.: A comparison of smokers and non smokers with respect to oncogene products and cytogenetic parameters. *Bibra Toxicology International*, 34 (12): 1181-1188, 1982.
- 13- Budak, T., Alp, N., Akbaş, E.: The effects of trimethoprin on chromosomal aberrations in cigarette-smokers. *The American Journal of Human Genetics*, Supplement volume, 49 (4):446, 1991.
- 14- Cox, R., Daoud, A.H., Irving, C.C.: Damage of rat liver deoxyribonucleic acid by bleomycin. *Biochem. Pharmacol.* 23:3147-3151, 1974.
- 15- CROORE, S.T., and BRADNER, W.T.: Bleomycin, A review. *Journal of Medicine*, 7 (5):333-429, 1976.
- 16- Cuiffo, B.P. Fox, H.B., Babior, B.M.: Chromatin structure during bleomycin induced DNA damage and repair. *J. Free Radic. Biol. Med.* 1 (2):139-44, 1985.
- 17- Çelik, A.: Kronik olarak düşük dozda radyasyona maruz kalmış sigara tiryakilerinde bleomycinin kromozomal düzensizliklere etkisi (Yüksek lisans tezi) 1995, Diyarbakır.
- 18- Dresch, J., Schmid, E., Bauchinger, M.: The cytogenetic effect of bleomycin on human peripheral lymphocytes in vitro and in vivo. *Mutat Res.* 56:341-353, 1978.
- 19- Farmakoloji Ders notları. Ankara 1989. 2.Baskı. Hacettepe Metay Yayınları, 136-1.
- 20- Goh, H.O.: Total-body irradiation and human chromosomes: Cytogenetic studies of the peripheral blood and bone marrow leukocytes seven years after total body irradiation. *Radiation Research*, 35:155-180, 1968.
- 21- Gözükar E.: Biyokimya. 426-502, 1990, Ankara.

- 22- Green, E.D., Waterson, R.H.: İnsan genom projesi-klinik uygulama için taşıdığı anlam ve beklentiler. *Jama*, 5.cilt, sayı 9, Gen teknolojisi eki, 5-15, 1992.
- 23- Hopken, H.J., Evans, H.J.: Cigarette smoke induced DNA damage and lung cancer risks. *Nature* 283:288-293, 1980.
- 24- Hughes, M.R., Caskey, T.: Tıbbi Genetik. *Jama*, 5.cilt, sayı 9, Gen teknolojisi eki, 3-4, 1992.
- 25- Ishizuka, M., Takayama, H., Takeuchi, T. and Umezawa, H.: Activity and toxicity of bleomycin. *J. Antibiotics. Ser. A*, 15-24, 1967.
- 26- ISI H.: Kronik olarak radyasyona (X-ışını) maruz kalmış bireylerde bleomycinin kromozomlar üzerine etkisi (Yüksek lisans tezi) 1993, Diyarbakır.
- 27- Kama D. Pauka and Awtor: Krishon: Bleomycin-induced chromosomal aberrations in cultures mammalian cells. Children cancer research foundation (K.D.P.A.K.) and department of pathology (A.K) Harvard medical school, Borton, Massachusetts, 33: 961-965, 1973.
- 28- Katsung, B.G.: Basic and Clinical Pharmacology. 645-646, 1982.
- 29- Kayaalp O. Prof.Dr.: Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji 1.cilt 1046-1047, 7.Baskı, 1994.
- 30- Lehane, D.E., Lane, M.: The immunopharmacology of bleomycin in man. current status and new development, Carter, S.K., Croske, S.T., and Umezawa, H., (Eds). New York Academic Press., pp. 143-150, 1978.
- 31- Lijima, K., Morimoto, K., Koizumi, A., Higurashi, M. And Hirayama, M.: Bleomycin-induced chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in Down lymphocytes cultures. *Hum. Genet.* 66:57-61, 1984.
- 32- Littlefield, L.G., Toirer, E.E.: Analysis of chromosome aberrations in lymphocytes of lung heavy smokers. *Mutation Research* 170:145-150, 1986.

- 33- Lown, J.W., Sim, S.K.: The mechanism of the bleomycin-induced cleavage of DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 77:1150-1157, 1977.
- 34- Marwick C.: Gen tedavisinde ilerleme Jama 5.cilt, sayı 9, Gen teknolojisi eki, 1992.
- 35- Mitelman, F., ISCN (1995) An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Memphis, Tennessee, USA, October 9-13, 1994.
- 36- Moorhend, R.S., Nowell, P.C., Mellman, W.J., Battips, D.M. and Hungerford, D.A.: Chromosomic preparations of lenkocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. cell Res*, 20:613-616, 1960.
- 37- Muller, W.E., Yamazaki, Z., Breter, H.J., Zahn, R.K.: Action of bleomycin on DNA and RNA. *Eur. J. Biochem.* 31:518-525, 1972.
- 38- Obe, G., Herh, T.: Chromosomal aberrations in heavy smokers. *Human Genetic*, 41:259-265, 1978.
- 39- Ohama, K., Kadotani, T.: Cytologic effects of bleomycin. On cultured human lymphocytes. *Tap. Jour. Hum. Genet.*, 14:293-297, 1970.
- 40- Ohno, R., Nishiwaki, H., Kawashima, K., Uetani, T., Hirano, M., Miura, M., Yamada, K.: Lack of Immunosuppressive effect of bleomycin on the primary response of mice to sheep red blood cells. *Gann.* 62:267-274, 1971.
- 41- Osonito S, Thijssen C.P., Woldering M.V., Rijn von LS., Nataragon T.A., and Tartes A.D.: Increased frequency of chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes up to Nine Years following curative chemotherapy of patients with testicular carcinoma. *Enviromental and molecular mutagenesis* 17:71-78, 1991.
- 42- Paika, K., Krishan, A.: Bleomycin induced chromosomal aberrations in cultured mammalian cells. *Cancer Res.* 33:961-965, 1973.
- 43- Patoloji Ders notları. Hacettepe 64-65, 1989.
- 44- Patoloji Ders notları. Preklinik tıp serisi, Ankara Tıp Fak. 56-57, 1988, Ankara.
- 45- Povirk, Lawrence F., and Austin M.J., Finley Genotoxicity of bleomycin. 257 (127-143) 1991.

- 46- Promchainant, C.: Cytogenetic effect of bleomycin on human leukocytes in vitro. *Mutat. Res.* 28:107-112, 1975.
- 47- Püskülcü H., İkiz F.: İstatistiğe giriş. E.Ü.Ders Kitapları Yayını No:1, 3.Baskı, 1989, İzmir.
- 48- Reidy A.J., Zhas H., Chen A.T.L., Annest J.L. and Welty T.K.: Complete culture medium 15 better. than lowfolete medium for detecting increased Chromosome aberrations in smokers in 48-h lymphocytes cultures. *Mut. Res.* 225:175-179, 1989.
- 49- Rooney D.E., Czepulkwski, B.H. Human cytogenetic 1, 1992.
- 50- Schlein, A., Schurig, J.E., Baca, C., Bradner, W.T., Crooke, S.T.: Pulmonary toxicity studies of bleomycin and talisomycin-Cancer. *Treat. Rep.* 65 (3-4): 291-7, 1981.
- 51- Sezer, E.: Baş yazı sigara alarmı, 4:1-2, 1992.
- 52- Sezer, E.: Sigara kullanımı ve gençler. Sigara alarmı, 4:3-7, 1992.
- 53- Sezgin, İ., Atalay, A: Nitrosopyrxolidin'in insan lenfosit kromozomlarına etkisi. *Biyokimya Dergisi*, XI.Ulusal Biyokimya Kongresi özel sayısı, M. 08, 1992.
- 54- Sinues B., Izquierdo M., Percz JV.: Chromosome aberrations and urinary thiother, in smokers: *Mut. Res.* 240:289-293, 1990.
- 55- Sorsa M., Husgafvel K.P., Törventaus H. Koskimies K., Salo H., Vainis H.: Cytogenetic effects of tabacco exposure among involuntary smokers. *Mutat. Res.* 222:111-116, 1989.
- 56- SPITA, M.R., FUAGER, J.J., BEDDINGFIELD, N.A., ANNEGELS, J.F., HSU, T.C., NEWELL, G.R. And SCHANTA, S.P.: Chromosome sensitivity to bleomycin-induced mutagenesis an independent risk factor for upper aerodigestive track cancer. *Cancer Research*, 49:4626-4628, 1989.
- 57- Spitz M.R., Fueger J.J., Bedding field N .A. Annegers J.F., Hsu T.C., Newell G.R., Schontz S.P.: Chromosome sensitivity to Bleomycin-induced mutagenesis, an independent risk factor for upper acrodigestive track cancer. *Cancer Res*, 49,4626-4628, 1989.

- 58- Sugiyama H., Ehrenfeld, G.M., Shipley, J.B., Hecht, S.M.: DNA strand scission by bleomycin group antibiotics. *J. Nat. Prod.*, 48 (6):869-77, 1985.
- 59- Şaylı B. S.: Medikal Genetik 1.Teorik ve klinik sitogenetik Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi yayını A.Ü.Basımevi, 1975.
- 60- Şaylı B.S.: Medikal Genetik 3.Biyokimyasal Genetik Ankara Üniversitesi Basımevi 2.Baskı, 13-14, Ankara, 1977.
- 61- Tawn E.J., Cortmrl C.L.: The effect of smokers on the frequencies of asymmetrical and symmetrical chromosome exchange in human lymphocytes. *Mut. Res.* 224:151-156, 1989.
- 62- Terasima, T., Yasukawa, M. and Umezawa, H.: Breaks and rejoining of DNA in cultured mammalian cells treated with bleomycin. *Gann.* 61:513-516, 1970.
- 63- Tom, W.M., Montgomery, M.R.: Biochemical and morphological assessments of bleomycin pulmonary toxicity in rats. *Toxicol. Allp. Pharmacol*, 53 (1): 64-74, 1980.
- 64- Tümer, Ö.: Gen kehaneti ile belirlenen insanın kaderi. *Cumhuriyet Bilim Teknik*, 313:4-5, 1993.
- 65- Türk ilaç rehberi Hacettepe yayınları 3.Baskı, 117, 1988-1989.
- 66- Umezawa, H.: Chemistry and mechanism of action of bleomycin, *Fed. Proc.* 33:2296-2301, 1974.
- 67- Umezawa, H.: On the mechanism of action of bleomycin scission of DNA strands in vitro and in vivo. *J. Antibiot.* 22:446-448, 1969.
- 68- Umezawa, H.: Studies on bleomycin: Chemistry and the biological action. *Biomed.* 18:459-475, 1973.
- 69- Umezawa, H., Suhara, Y., Takita, T. and Maeda, K.: Purification of bleomycin.T. *Antibiotics. Tokyo, Ser. A.* 19:210-215 (1966.b)
- 70- Umezawa, H., Takeuchi, T., Horu, S., Sawa, T., Ishizuka, M.: Studies on the mechanism of antitumor effect of bleomycin on squamous cell carcinoma. *J. Antibiot.* 25:409-420, 1972.

- 71- Vagel F., Motulsky A.G.: Human Genetik 12, 2.Baskı, 22-25, 1986.
- 72- Vijayalexmi and Evans, H.J.: In in vivo and in vitro effects of cigarette smoke on chromosomal damage and SCE in human peripheral blood lymphocytes. Mutation Research 92:321-325, 1982.
- 73- Vorechosky I, Zaloudik, J.: Increased breakage chrosomome 1 in lymphocytes of patients with reticuler cancer after bleomycin treatment in vitro. Br.J.Cancer 59 (4):499-502, 1989.
- 74- Wilson D.J., Brounwould E., Kurt J.I., Petersdorf R.G., Martin J.B., Fauci A.S., Root R.K.: Harrison's principles of internal medicine. 2.cilt. 12.Baskı 1591, 1991.
- 75- Zylke, J.W.: Yaşamın (Gen) kodunu incelemek. Jama, 5.cilt, sayı 9, Gen teknolojisi eki, 26-18, 1992.