

27695

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTUSU  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

VİRAL HASTALIKLARIN İNSAN KROMOZOMLARINDA YAPTIĞI HASARLARIN  
"SİSTER CHROMATİD EXCHANGE" (SCE) TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Ali MATUR

Fuat DİLMEC

ADANA-1993

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

SAGLIK BiLiMLERi ENSTiTUSÜ MÜDÜRLÜGÜNE

Bu çalışma, Jürimiz tarafından, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Master tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Üye

Üye

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

.../.../ 1993  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Müdürü

## TEŞEKKÜR

Tez konumun seçilmesi, yürütülmesi ve tamamlanmasında katkı ve desteği ile yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof.Dr. Ali MATUR'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tezin yazılıp düzenlenmesinde emeği geçen Anabilim Dalımız sekreteri Aysel ASLAN'a ve tüm Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalımızın personeline teşekkür ederim.

## iÇİNDEKİLER

	SAYFA NO
A-GİRİŞ	1
B-GENEL BİLGİLER	3
1-Tarihçe	3
2-Kromozom Yapısı ve Morfolojisi	5
3-Kardeş Kromatid Değişimi	8
4-Amaç	15
C-MATERYAL VE METOD	16
D-SİTOGENETİK ARAŞTIRMA	17
1-Kan Örneklerinin Alınması	17
2-Kültür Ortamının Hazırlanması	17
3-inkübasyon işlemi	18
4-Lamların Temizlenmesi	19
5-Preparasyon işlemi	19
6-Boyama işlemi	19
7-Kültür,Preparasyon ve Boyama sırasında kullanılan solüsyonlar	20
8-Değerlendirme	22
E-İSTATİKSEL DEĞERLENDİRME	23
F-BULGULAR	24
G-TARTIŞMA	40
H-ÖZET VE SONUÇLAR	44
I-SUMMARY	45
i-KAYNAKLAR	46
J-ÖZGEÇMİŞ	52
K-FOTOGRAFLAR	53

## TABLO LİSTESİ

TABLO 1-	Hasta grubu olgularında SCE sıklığının kromozomlara dağılımı ve kromozom başına düşen ortalama SCE değerleri. ....	25-26
TABLO 2-	Kontrol grubu olgularında SCE sıklığının kromozomlara dağılımı ve kromozom başına düşen ortalama SCE değerleri .....	27
TABLO 3-	Takip grubu olgularında SCE sıklığının kromozomlara ve kromozom başına düşen ortalama SCE değerleri.....	28
TABLO 4-	Hasta ile kontrol grubu olgularında SCE sıklığının kromozomlara dağılımı ve kromozom başına düşen ortalama SCE değerlerinin karşılaştırılması.....	29
TABLO 5-	Kontrol ile takip grubu olgularında SCE sıklığının kromozomlara dağılımı ve kromozom başına düşen ortalama SCE değerlerinin karşılaştırılması .....	29
TABLO 6-	Hasta ile takip grubu olgularında SCE sıklığının kromozomlara dağılımı ve kromozom başına düşen ortalama SCE değerlerinin karşılaştırılması.....	30
TABLO 7-	Hasta grubu vakalarında toplam SCE değerleri ve metafaz başına düşen ortalama SCE sayısı .....	31
TABLO 8-	Kontrol grubu olgularında toplam SCE değerleri ve metafaz başına düşen ortalama SCE sayısı .....	32
TABLO 9-	Takip grubu olgularında toplam SCE değerleri ve metafaz başına düşen ortalama SCE sayısı .....	33
TABLO 10-	Hasta ile kontrol grubu olgularının metafaz başına düşen ortalama SCE hızlarının karşılaştırılması.....	33
TABLO 11-	Kontrol ile takip grubu olgularında metafaz başına düşen ortalama SCE değerlerinin karşılaştırılması...	34

TABLO 12-Hasta ile takip grubu olgularında metafaz başına düşen ortalama SCE değerlerinin karşılaştırılması...	34
TABLO 13-Hasta, kontrol ve takip gruplarında cinsiyetin ortalama SCE'ye etkisi ve grup içi karşılaştırmalar.	35
TABLO 14-Hasta, kontrol ve takip gruplarında mitotik indeksin dağılımı .....	37
TABLO 15-Hasta, kontrol ve takip grubu olgularında replikasyon indekslerinin dağılımı .....	38
TABLO 16-Hasta ile kontrol grubu olgularında mitotik indeks ve ortalama replikasyon indeksinin karşılaştırılması.	39
TABLO 17-Hasta ile takip grubu olgularında ortalama mitotik indeks ve replikasyon indeksinin karşılaştırılması..	39
TABLO 18-Kontrol ile takip grubu olgularında ortalama mitotik indeks ve replikasyon indeksinin karşılaştırılması..	39

## A-GİRİŞ

1970 yılından sonra kısa süreli mutajenite ve kanserojenite testleri geliştirilmiştir. Bu testlerden en hassas olanı ve en fazla kabul göreni Kardeş Kromatid Değişimi (Sister Chromatid Exchange veya kısaca "SCE") testidir. Kardeş kromatid değişimi bir kromozomdaki kardeş kromatidler arasında simetrik segment değişimidir (33,60,73).

*in vivo* ve *in vitro* deneylerle insan kromozomlarına alkilenmiş ajanlara benzer bir çok kimyasal maddenin yanı sıra virüslerin ve radyasyonun çok sayıdaki etkilerinin belirlenmesinde SCE testi kullanılır (37,38,57,58,60,73). Kalıtsal hastalıkların teşhisi sırasında da son derece hassas olduğu kabul edilmektedir (23).

Biosferde insan sayısının artmasıyla ihtiyaçları da artmaktadır. Bu problem teknolojinin gelişmesini gerekli kılmıştır. Sanayi artıkları, zirai mücadele ilaçları, nükleer denemeler sırasında oluşan atıklar gün geçtikçe çevreye verilmiş ve bunlarda çevrede birikmeye başlamıştır. Bu atıkların çoğu mikroorganizmalar tarafından kullanılarak zararsız hale getirilebilmektedir. Ancak saprofit mikroorganizmaların belli bir ayrıştırma kapasitesi bulunmaktadır. Çevreye verilen atık madde miktarı bu kapasiteyi aşarsa, biosferde birikim olur ve sonuç olarak doğal denge bozulur. Biriken maddeler kanserojen ve mutajen nitelikte olabilir. Gün geçtikçe insanlardaki hastalıklar da dolaylı olarak çeşitlenip artmaktadır.

Kirlilik yapan faktörlerin hangileri mutajen ve kanserojen özelliktedir? Bunlar ne kadar konsantrasyonda ve ne kadar sürede insan genetiğine etki etmektedir? Daha önemlisi mutajen ve kanserojen maddelerin insan genetiği üzerindeki etkileri nasıl tespit edilebilir?

Bölgemiz Çukurova'da sanayi ve tarım gelişmiş olduğundan biosfere salınan bir hayli mutajen ve kanserojen madde bulunmaktadır. Ayrıca hücre genetiğini kontrol altına alarak metabolizmayı değiştiren virüs kökenli hastalıklar bir hayli

fazladır. Acaba insanda hastalık tablosu meydana getiren virüsler, insan genetiğine etki edebilir mi? Virüsler insan genotipine tesir ediyorsa, SCE testi ile bu etkiler gösterilebilir mi?

Bu çalışmada hepatit (sarılık) virüslerinin insan genetiğine etki edip etmedikleri ve etki ediyorlarsa bu etkinin insanda kalıcı olup olmadığını tespit etmek amaçlanmıştır.





## B-GENEL BİLGİLER

### 1-TARİHÇE

SCE çalışmalarının geçmişi çok geriye gider. İlk çalışma McClintock (1938) tarafından somatik mısır hücrelerinde halka biçimli kromozomlar üzerinde yapılmış ve kardeş kromatidler arasında değişimlerden söz edilmiştir. Bu tip çalışmalar zamanın bilim çevreleri tarafından pek kabul görmemiştir (49). McClintock'un kromozomlar üzerinde yaptığı çalışmalarını hesaba katmazsak, SCE çalışmalarının geçmişi iki döneme ayrılabilir. İlk dönem; <sup>3</sup>H-Timidin ile işaretli kromozomların otoradyografi tekniği kullanılarak izlenmesi, ikincisi ise 5-bromo-2-deoxyuridine'nin (BrdU) kullanılıp kromatidlerde değişiklik kontrastının arttırılması ki bugün kullanılan dönemdir (68).

Taylor ve çalışma arkadaşları (1957) ilk olarak *Vicia faba* (bakla) kromozomlarını replikasyonun ilk basamağı boyunca <sup>3</sup>H-Timidin etkisine bırakmışlar ve ikinci metafazda her bir kromozoma ait kardeş kromatidlerinden birinin işaretlendiğini göstermişlerdir. Bu bulgu bir çok eleştiriye rağmen, birbirini izleyen otoradyografik çalışmalarla destek görmüştür (68,69).

La Cour ve Pelc (1958) yaptıkları çalışmalarla Taylor ve ark.'nın (1958) çalışmalarını desteklemişler, fakat SCE'nin spontan olup olmadığı ve tritiumla teşvik edilip edilmediği konularında doyurucu cevap verememişlerdir. Çünkü DNA bünyesine giren Tritiumdan yayılan  $\beta$  taneciklerinin aldıkları yolun kısa olması nedeniyle metodun ayırma gücünü sınırlandırıyordu. Bu durum, SCE testinin arzu edilen çalışmalarını 1970'li yıllara kadar geciktirmiştir (43,69).

ikinci dönem, hücrelerin BrdU içeren ortamda DNA replikasyonunun iki aşaması için yetiştirilmesine dayanır. Farklı miktarda BrdU bağlayan kardeş kromatidlerin farklı görünüşünü Zakharov ve Egolina (1972) tesbit etmişlerdir. Bu araştırmacılar Çin hamster hücrelerini BrdU'lu ortamda iki döngü boyunca inkübe edip Giemsa ile boyamışlar ve boyanın kromatidin tek ipliğine girmesi ile bu kromatidin koyu, her iki DNA ipliğine girmesi ile açık boyandığını bulmuşlardır (75).

*Rattus natalensis* hücrelerinin BrdU varlığında 26 saat süre ile inkübe edilmeleri sonucunda kromozomlarda kardeş kromatid farkları görülmüştür (29). Bu çalışma diğer araştırmacılar için cazip görülmediği halde, BrdU yerine 5-iododeoxyuridine'nin kullanılabilceğini göstermiştir. SCE çalışmalarında halogenli nükleositlerin (örn., BrdU v.s.) gerekliliği anlaşılmıştır.

Sonradan yapılan çalışmalarda BrdU, DNA replikasyonunun iki aşaması için hücrelerle temas halinde bırakılmıştır. Replikasyonun ilk aşamasında her bir kromozomun kromatidindeki tek DNA ipliğine (unifilary) BrdU yerleşirken, ikinci siklusta bir kromatidin her iki ipliğine (bifilary), diğer kromatidin sadece bir DNA ipliğine (unifilary) girmiştir (34,36). BrdU'nun kromozomlara farklı miktarlarda yerleşmesi kromozomların farklı boyanmasına imkan vermektedir.

Yüksek konsantrasyonlarda BrdU kullanıldığı zaman, kromozom preparasyonları doğrudan Giemsa ile boyanarak kardeş kromatidlerdeki farklılık ortaya konmuştur. Ancak yöntem, mitotik bölünmeyi inhibe ettiğinden başarısız kabul edilmiştir (31,75).

1973-1974 yılları arasında bir çok laboratuvarında birbirinden bağımsız olarak yapılan çalışmalar teknik açıdan bazı gelişmeleri de beraberinde getirmiştir. Floresan boya olan Hoechst 33258 ile insan kromozomlarının boyanması tekniği Latt (1973) tarafından rapor etmiştir. BrdU, kromatidin DNA çift ipliğine girmişse fluorokrom floresansı soluk, tek DNA ipliğine girmişse koyu görünmektedir (45). Bazı laboratuvarlarda floresan boya olarak akridin oranj veya 4',6-diaminophenilindole (DAPI) boyaları kullanılabilir (19,34,44).

Floresan teknikleriyle paralel giden diğer teknikler, ışık mikroskopunun kullanılması ve floresan metodun dezavantajlarının giderilmesi amacı ile kromozomal preparasyonlar sürekli geliştirilmiştir. Perry ve Wolff (1974) floresan+Giemsa (FPG) tekniğini geliştirmişlerdir. Kısa dalga boylu ışın yayan Hoechst 33258 floresan boyası Giemsa boyasından önce kullanılmıştır (61). Günümüzde bu boyama metodu sıkça kullanılmaktadır.

SCE çalışmaları *in vitro* şekilde gelişirken diğer taraftan *in vivo* araştırmalar da hızlanmıştır. Bloom ve Hsu (1977) üç günlük tavuk embriyosuna *in vivo* olarak BrdU vererek DNA'nın farklı etiketlenmesini ve SCE'nin değerlendirilmesini yapmışlardır (11). Bunun yanında, 1976 yılında farklı laboratuvarlarda araştırmacıların *Microtus*, Rat, Balık ve Farelerde *in vivo* olarak kromozomları BrdU ile işaretlediklerine dair raporlar yayınlanmıştır (2,71).

## 2. KROMOZOM YAPISI VE MORFOLOJİSİ

Hücre yaşam çemberinin interfaz safhasında bulunan nükleik asitler "KROMATİN" adını alırken, mitoz ve mayoz sırasında bulunan nükleik asitler ise "KROMOZOM" adını alır. Kromatin veya kromozomların kimyasal içerikleri incelendiğinde DNA (Deoxyribonükleik asit), RNA (Ribonükleik asit), protein ve Mg iyonlarından oluştukları görülür (9,50).

### a. Morfoloji

#### Sentromer :

Kromozom kollarının merkezinde bulunan ve soluk boyanan bir bölgedir. Sentromere ayrıca primer boğumda denir. Mitoz ya da mayoz sırasında iğ ipliklerinin kromozomlara bağlandıkları kinetokor kısmı sentromerde bulunur.

Sentromerin yerleşme yerine göre kromozomlar metasentrik (median), submetasentrik (submedian), Akrosentrik ve Telosentrik adını alırlar.

#### Sekonder boğum :

1,3,9 ve 16 nolu kromozomların kısa kollarında ikincil boğum bulunur. Sentromerden daha soluk boyanır. Nukleolus oluşumu ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

#### Satellit (Peyk):

Uydu da denen bu yapı ince bir bağla bazı kromozomların kısa kollarına bağlı bulunan bir yapıdır. D grubu (13-15) ve G grubu (21-22) kromozomlarda bulunurlar. Telofaz safhasından hemen sonra nukleolusun yapımına katılır.

Eski terimlerden; kromomerler metafaz kromozomların enine bantlarına, kromonema kromozomun paketlenme durumunu açıklamak için kullanılmıştır.

Kromatin kendi içinde normal kromatin (ökromatin) ve heterokromatin olmak üzere iki tiptedir. Heterokromatin, telofaz safhasında DNA-histon yapısı gevşek olmadığından koyu boyanır ve nükleik asit yönünden zengindir. Genetik yönden inaktif olarak kabul edilir. Telofazın sonunda interfaza girilirken gevşeyip çözülen ve nükleik asit yönünden heterokromatinden daha zengin olan bölgeye ökromatin denir. Genetik yönden aktiftir (8,50).

## b. Kromozom Şekilleri

Somatik kromozomların şekilleri metafaz ve anafaz safhalarındaki morfoloji ve görünümüne göre adlandırılır. Denver klasifikasyonuna göre kromozom morfolojileri şöyledir.

- 1- Median (Metasentrik): Sentromer merkezde ve kollar birbirine eşit.
- 2- Submedian (Submetasentrik) : Sentromer merkeze biraz uzak ve telomerlerin boyları birbirine eşit değildir.
- 3- Akrosentrik : Sentromer kromozomun ucuna çok yakın olan kromozomlardır.
- 4- Telosentrik kromozom : Sentromer en uçta bulunur. Sadece kromozomun uzun kolları bulunur. Bu kromozom tipine insanda rastlanmaz.



Metasentrik



Submetasentrik



Akrosentrik



Telosentrik

## c. Kromozomların Adlandırılmaları

1956 yılında Tjio ve Levan tarafından insan kromozomlarının sayısının belirlenmesinden sonra, genetiksel hastalıkların

teşhisi hızlanmıştır. Bulguları standartlaştırmak için 1960'da Denver'de (ABD) genetikçilerin ilk uluslararası toplantısı yapılmıştır. Burada ortaya çıkan sisteme Denver klasifikasyonu denir. Bu sistemin eksiklikleri Londra (1963), Chicago (1966), Paris (1971,1975) ve ISCN (An international system for human cytogenetic nomenclature,1985) konferanslarıyla giderilmeye çalışılmıştır ilerleme sadece band sayısının artışı ve rezolusyonunda görülmüştür (9).

Kabul edilen sisteme göre insan kromozomları yedi gruba ayrılmıştır. A, B, C, D, E, F ve G grubu kromozomları somatik kromozomları (otozom) kapsar. 23'ncü çift kromozom ise cinsiyet kromozomlarıdır. Büyüklüğe göre X kromozomu C-grubunda 12 nolu kromozomdan sonra, Y kromozomun G-grubunda 22 nolu kromozomdan sonra yer alır. Bantlama ile tüm kromozomlar tanımlanabilmektedir. Kromozom tanısında a) Kromozom uzunluğu; toplam ve ayrı ayrı kol uzunlukları, b) Sentromer pozisyonu, c) Sekonder darlığın bulunup bulunmaması varsa yeri, d) Kromozomların bant özellikleri, e) Otoradyografik özellikler, gibi kriterler göz önünde bulundurulur kromozom tanısına gidilir.

Kromozomların Denver klasifikasyonuna göre sıralanmasına karyotip denir. Karyotipin şema şeklinde gösterilmesine idiyogram denilmektedir.

Denver klasifikasyonuna göre :

- A Grubu (1,2,3) kromozomları: 1 ve 3 nolu kromozomlar metasentrik, 2 nolu kromozom ise submetasentrik olup bu grubun üyeleri insanda en büyük kromozom grubunu teşkil eder
- B Grubu (4,5) kromozomları : Birbirinden zorlukla ayırt edilebilen submetasentrik kromozomlardır. 5 nolu kromozom biraz daha küçüktür. Giemsa bantlama ile ayırt edilebilirler.
- C Grubu (6-12 ve X) kromozomları: Orta büyüklükte ve submetasentrik kromozomlardır.
- D Grubu (13,14,15) kromozomları: Orta büyüklükte, satellitli ve akrosentrik kromozomlardır.
- E Grubu (16,17,18) kromozomları: 16 nolu kromozom metasentrik, diğerleri submetasentriktir.
- F Grubu (19,20) kromozomları: Kısa metasentrik kromozomlardır.

G Grubu (21,22 ve Y) kromozomları: Akrosentrik, satellitli en küçük kromozomlardır. Y kromozomunun satelliti yoktur.

1,3,6,9,11 ve 16 nolu kromozomların yapılarında ayrıca sekonder boğumda bulundurlar.

Genel olarak bir kromozomun kısa koluna "p", uzun koluna "q" sembolü verilir (9).

### 3- KARDEŞ KROMATİD DEĞİŞİMİ

SCE formasyonu, DNA replikasyonu sırasında DNA hasar, onarım ve mutajenezise son derece bağlıdır. Proflavin, Mitomycin C (MMC), etilnitrosoure ve Etil methanosulfonat (EMC)'nin değişik dozlarının etkileri Çin Hamster Ovaryum (CHO) hücrelerinde denenmiş ve kromozomların bazı lokuslarında mutasyonun arttığı görülmüştür (60,73).

SCE, bir kromozomda kromatidlerin her iki ipliğini kapsayan bir değişimdir. Kırılan yerlerin yeniden şekillenmesi kromozom polaritesine bağlıdır. Bazı araştırmacılar kırılma sonrasında DNA ipliklerinin by-passı ile SCE'nin meydana geldiğini söylemektedirler (21,40,75). Spontan olarak veya mutajen ve kanserojen maddelerin etkisiyle kromozomların heterokromatik ve ökromatik bölgelerinin birleşme yerlerinde kırılmalar tespit edilmiştir (8). Bu tip yerlerdeki kırılmalar SCE'nin kaynağını teşkil eder. SCE, insanın A, B, C ve D kromozom gruplarında daha sık olurken bu olayın rasgele olmadığı anlaşılmıştır (44-46).

Mutajen ve kanserojen madde aktivitesinin ve kromozomlara olan etkilerinin belirlenmesinde ve kalıtsal hastalıkların teşhisinde çok duyarlı olan SCE testi ökaryotların bir çok hücrelerinde kullanılmaktadır. Günümüzde SCE, en fazla lenfosit hücrelerinde başarıyla uygulanmaktadır. Çünkü lenfositler kolayca elde edilebilir ve spontan kromozom hatalarını son derece az içerir. Ayrıca klastojenlerin insan kromozomlarına *in vivo* olarak etkilerinin açığa çıkarılmasında lenfositler kullanılır. *in vivo* ve *in vitro* deneylerle insan kromozomlarına kimyasal maddeler, virüsler ve radyasyonun çok sayıdaki etkilerinin belirlenmesine rehberlik ederler. Tedavi amaçlı ilaçların etkilerinin açığa çıkarılması, spontan SCE tespiti v.b. çalışmalarda da lenfositler



başarı ile kullanılır. Lenfositler üzerinde yapılan SCE analizleri, genetik hasar, kanserojen ve mutajen madde etkisini çok hassas olarak ortaya koyarlar (30).

Lenfositler doğrudan doğruya SCE çalışmalarında kullanılamazlar. Lenfositler kan dolaşımında her zaman G<sub>0</sub> fazında bulunurlar ve mitozla girmezler. Oysaki SCE için DNA replikasyonu şarttır. Bu dezavantaj *in vitro*'da mitojen madde olan PHA'nın (Phytohaemagglutinin) Nowell (1960) tarafından keşfi ile çözülmüştür. G<sub>0</sub> fazında bulunan lenfositlere PHA'nın verilmesi ile lenfositlerin lenfoblast formasyonuna girmelerine olanak sağlanır (60).

PHA, en yaygın kullanılan mitojen madde olup kırmızı barbunyadan (*Phaseolus vulgaris*) ekstre edilen bir mukoproteindir. Lenfosit kültür ortamına başlangıçta eklenen PHA, 24 saat sonra hücrelerde RNA sentezinin artmasına sebep olduğu bulunmuştur. Sonraki 24 saatte nükleus büyür ve DNA sentezi başlar. İlk mitozlar 24 saat aradan sonra elde edilir. Sonraki 48 saat içinde ise mitoz boldur (41). Lenfosit kültürleri T ve B lenfositlerin bir karışımıdır. PHA genelde T lenfositlerini stimüle eder. SCE ile ilgili bulguların çoğu T lenfositlerinden elde edilmiştir. Pokeweed Mitogen (PWM) sadece B lenfositlerini uyarmaktadır. Aynı dördörden alınan lenfositler ayrı ayrı PHA ve PWM mitojen ile stimüle edilmiş ve benzer SCE oranları elde edilmiştir (57,60). Ancak Santesson ve ark. (1979) tarafından yapılan çalışmalara göre T lenfositlerden elde edilen SCE oranları B lenfositlerine göre daha yüksektir (27,63).

T ve B lenfositlerden alınan SCE oranları, en fazla *Epstein-Barr* (EB) virüsü ile transforme edilen hücreler veya kanserli hücrelerden alınan lenfoblastoid hücre dizileri çalışmalarından elde edilmiştir. EB ile transforme edilen lenfosit kültürleri PHA ile stimüle edildiğinde, ayrı ayrı T ve B lenfositlerde SCE oranları farklılık göstermemiştir (58,79). Lenfoblastoid hücre dizilerinde yapılan çalışmalarda da SCE oranı yönünden T ve B lenfositler açısından bir fark görülememiştir (70). Bazı kanser hücrelerinde ise 10<sup>-4</sup> M BrdU varlığında T hücrelerinden elde edilen SCE oranı B hücrelerine göre beş kat daha yüksek bulunmuştur(38).

Beklenen SCE miktarları üzerine donör yaşının etkileri bir kaç denek grubu üzerinde incelenmiştir. Ancak sonuçlar bir noktada odaklaşmamıştır. Galloway ve Evans (1975), 26-35 yaş arası yetişkinler ile yeni doğanlar arasında SCE oranlarında farklılık görememişler (25). 85 Yaş dolayındaki bireylerle yeni doğanların SCE oranları karşılaştırılmış ve fark bulunmamıştır (51). Schneider ve ark. (1979), SCE oranları üzerine yaşın pek önemli bir etkisi olmadığını, DNA'ya zarar verici ajanlara lenfositlerin duyarlılığının yaştan etkilenmediğini ifade etmişlerdir(66). Ancak Mitomycin C (MMC) ve Asetilaminofluorene (AAF) ile muamele edilen fibroblastlarda yaşın önemli değişimler yaptığını gözlemişlerdir (60).Ayrıca Ardito ve ark. (1980) annelerle bebekleri arasında farklı SCE hızı tesbit etmişlerdir (7).

DNA'ya zarar verici belirli bir madde üzerinde erkek ve dişi gruplarda yapılan çalışmalarda cinsiyetin SCE miktarları üzerinde etkili olmadığı saptanmıştır (5,16,51).

SCE çalışmalarında değişik besiyerleri kullanılmaktadır. Besiyeri içeriklerinin yan etkileri lenfositler üzerinde az, SCE üzerinde fazla olmaktadır. McCoy's 5A besiyerinde kültürü yapılan lenfositler, TC 199'da üretilen lenfositlere göre anlamlı derecede düşük SCE oranı vermiştir (52). Bianchi (1979) ve diğer araştırmacılar Ham's F10 besiyeri ile TC 199 besiyerlerini karşılaştırdıkları zaman TC 199 besiyerinde üretilen lenfositlerde daha yüksek SCE oranı bulmuşlardır (10). Değişimlerden, çeşitli ortamlarda bulunan Timidin miktarları sorumlu tutulmuştur. Kültürde daha düşük SCE oranına yol açan faktör BrdU'in timidin yerine adeninle eşleşmek için timidinle yarışmasıdır. Hangi maddenin konsantrasyonu yüksekse o madde SCE'yi yönlendirmektedir. Çünkü bu iki madde kimyasal olarak benzerdir. Timidin konsantrasyonunu azaltarak BrdU'yu DNA yapısına sevk etmek yeterince etkili olmamıştır. Ortamda endojen timidin sentezinde kullanılır ya da onu stimule eden bir ajan bulunmamalıdır (folik asit gibi). RPMI 1640 ve Dulbecco's MEM ortamlarında timidin yoktur. Ayrıca folik asit son derece azdır. Aynı zamanda kültür ortamının bileşiminde bulunan bazı maddeler lenfosit çoğalmasını etkileyebilir. Obe ve ark. (1975), Ham's F10'da lenfositlerin metafaz sayısının TC 199 besiyerine göre



daha yüksek sayıda ve replikasyon indeksinin daha büyük olduğunu yani mitozun daha erken olduğunu bulmuşlardır (59).

SCE oranı, kültür ortamına katılan serumdan da etkilenebilir. Kendi plazmasında kültürü yapılan lenfositler, spesifiye edilmemiş bir kaynaktan alınan fetal calf serumu veya sıcaklıkla inaktive edilmemiş insan AB serumu içeren bir ortama göre daha düşük SCE oranı gösterir (26). Lenfositler, kendi plazmalarında, sıcaklıkla inaktive edilmiş AB serumunda ve fetal calf serumunda kültürü yapıldığında SCE oranları arasında pek fark olmadığını, SCE'yi teşvik eden faktörlerin sadece serum yığını olmadığını, diğer bazı faktörlerinde işlemde etkili olduğu bilinmektedir (52,56). Serum içinde büyüme faktörleri bulunduğundan hücre bölünme oranlarını ve hücre bölünme siklusunu etkileyebilir (52).

SCE'nin gözlenebilmesi için BrdU gereklidir. Bu maddenin konsantrasyonu SCE oranını, boyamayı ve hücrelerin üremesini etkileyebilir. Ortama 0.3 µg/ml'lik BrdU verildiğinde bile SCE elde edilebilmiştir (64). BrdU konsantrasyonunun 0.03 ile 200 µg/ml değerleri arasında optimum olduğu belirlenmiştir (18). Ortama 10 µg/ml'lik BrdU eklendiği zaman beklenen SCE oranında olağanüstü bir artış olmadığı gibi açık ve farklı boyama verir. Çok düşük BrdU dozu, farklı boyama verememiştir (52). Ortama katılan BrdU, hem DNA'ya girecek kadar yeterli olmalı hem de hücre dışında kalan kısmının hücrelere toksik etkisi olmamalıdır. Yani mitotik indexi düşürmemelidir (17,48). BrdU'nun kültür ortamında iki hücre siklusu boyunca hazır bulunması şarttır. Bazen ortama fluorodeoxyuridine (FdU) ve Deoxysitidin (dCyd) katılabilir. FdU, tahminen endojen timidin sentezini inhibe etmekte olup BrdU'nun Adeninle eşleşmesini kolaylaştırmaktadır. Urd, dCyd ve FdU BrdU'nun lenfositler üzerindeki toksik etkilerini önlerler. dCyd'nin spontan SCE miktarında artışa sebep olabilir (42). Galloway (1975), düşük BrdU varlığında ortama dCyd ve FdU katılmasını gereksiz bulmuştur (22). Işığın, hem BrdU'unun girdiği DNA'da SCE artışına, hem de BrdU'nun bozulmasına sebep olduğu belirlenmiştir (31). *In vitro*'da kültürler özellikle ≤313 nm dalga boylu ışıktan korunmalıdır. *In vivo*'da bu uygulama gereksizdir (12,67,72).

Araştırmacıların büyük bir kısmı *in vivo* ve *in vitro* kültürlerde SCE oranının BrdU konsantrasyonuna göre değişim gösterdiğini, SCE fraksiyonunun bir bölümünün spontan olduğunu ifade etmişlerdir. Spontan SCE, hücrede bilinmeyen faktörlerin iş görmesi ile teşvik olmaktadır (32-34).

SCE oranlarına kişilerin mesleğinde etkili olmaktadır. Mutajen maddelerle uğraşan kişilerde SCE oranı, bu işlerle uğraşmayanlara göre yüksek bulunmuştur(20). Ayrıca sigara içenlerle sigara içmeyenler karşılaştırıldığında sigara içenlerde SCE artışı gözlenmiştir(39,53). Pestisit ve herbisitlerle ilgilenen kişilerde SCE oranı normale göre düşük bulunmuştur (15).

SCE'yi teşvik eden tedavi edici ilaçların *in vitro* etkileri üzerinde bilginin fazlalığına rağmen, *in vivo*'da da bilgi azdır. Bulunan bilginin çoğu sitostatik ajanlara aittir. Sitostatik ilaçları alan hastalarda SCE'de artış görülmüştür. Özellikle Mitomycin C (MMC), Adriamycin, Bisulphan ve Siklofosfamid alan hastalarda artış belirgindir (55,62). Aynı zamanda sitostatik olmayan ilaçları alan hastalarda da SCE yaygınlığı araştırılmıştır. Ağız yolu ile gebeliği önleyici hap kullananlar, kontrol grubu kadınlarla karşılaştırılarak SCE'de %75'lik artış gösterdiğinin bulunması en önemli sonuçtur (54).

*Rauscher leukemia* virüsü ile enfekte edilen fare embriyo fibroblast hücrelerinde SCE normale göre iki kat artmıştır. Son zamanlarda aşılansmış kişilerden alınan periferel lenfositlerde SCE oranları veya diğer çeşitli virüs enfeksiyonlu kişilerin lenfositleri alındığı zaman, örneğin *Herpes simplex*, griplerde ve hepatitiste en tutarlı SCE yükselişi bulunmuştur (37,38). *Herpes simplex* virüsü yaşam çemberinin S'i sonunda insan fibroblastlarına verilmesi SCE'de bir artışa sebep olmamaktadır. Bu sonuç S'in sonunda hücrelerin virüse duyarsızlığından ileri gelmekte olup S'in başında virüsler inoküle edilince durumun farklı olduğu görülmüştür (35). Virüslerin bir kısmı SCE'yi teşvik ederler. İnsan diploid fibroblastlarında SV40 ile transformasyon yapıldığı zaman SCE'nin normale göre üç kat arttığı görülmüştür (57). Aynı virüs insan vücudunun değişik doku hücrelerini transforme ettiği zaman SCE oranları farklı çıkmıştır

(74). *Epstein-Barr* virüsü ile transforme edilen hücrelerde SCE artışı zayıf görülmüştür (58,70).

SCE metodu ile kalıtsal hastalıkların teşhisi mümkündür. Kalıtsal hastalıklar kapsamına giren Bloom's sendromu, Fanconi's anemi, *Ataxia telangiectasia* ve *Xeroderma pigmentosum* gibi hastalıklar DNA onarımı sırasında meydana gelen defektlerden kaynak alırlar. Otozomal resesif şekilde, kişilerde etkilerini gösterirler. İnsan popülasyonunda %1-2 oranında heterozigot şekilde bulunurlar. Bazı özel mutajen maddeler verilerek SCE artış ve azalışına, kısaca değişimine bakılarak böyle hastalıklara doğru teşhis konulabilmektedir. Fanconi's anemili hastalardan alınan lenfositler BrdU varlığında normal SCE değerleri gösterirken, Mitomycin C (MMC) ile muamele edildikleri zaman anormal bir SCE azalışı gösterirlerki bu sonuç böyle bir hastalığa özeldir (42). Bloom's sendromlu hastalardan alınan lenfositlerde BrdU varlığında doğrudan doğruya SCE'ye bakıldığında yüksek SCE, oysa etil metil sülfonat (EMS) ile muamele edilen hasta hücrelerde SCE'nin yükseldiği görülmektedir (24). *Ataxia telangiectasia* hastalıklı kişilerden alınan lenfositlerde BrdU varlığında normal SCE oranı elde edilirken, X-ışını ile yine normal olmaktadır (25), *Xeroderma pigmentosum*'lu kişilerin lenfositleri BrdU varlığında normal SCE gösterirken, UV ve alkilleyici ajanlarla yüksek SCE göstermektedir (74).

SCE çalışmaları hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak yaygınlık kazanmıştır. Ancak SCE için BrdU gerekli olduğundan insanda veya diğer hayvanlarda istenen konsantrasyonları sürekli sağlamak zordur. Ayrıca bazı kanserojen ve mutajen maddelerin aktiviteleri belirlenirken karaciğer engelinden geçmeleri ve aktivitelerini devam ettirmeleri son derece zordur. *in vivo* çalışmalar en fazla civciv (3 günlük) embriyosuna yönelik olmuştur. BrdU civciv embriyosuna verildikten sonra mutajen ve karsinojen maddelerin SCE yapıp yapmadıklarına bakılmaktadır. Son zamanlarda yenilenen (rejenere) fare karaciğerinde SCE sonucunun alınması için bir sistem geliştirmiştir. Bilindiği gibi karaciğerde mutajen ve klastojen maddeleri yıkan Aril hidrokarbon hidroksilaz enzim aktivitesi ve bazı benzer enzim kompleksleri bulunmaktadır. *In vivo* çalışmalarda temel metodolojik güçlük, multipl enjeksiyonlar ve devamlı BrdU infuzyonu olmuştur. BrdU'nun konaktaki

metabolizması hızlıdır. BrdU tablet haline getirildikten sonra deri altına yerleştirilmekte ve vücutta istenen BrdU miktarları elde edilmektedir (4). *In vivo* SCE için fareler bir gün öncesinden hepatektomi edilmiş ve multipl BrdU enjeksiyonu yapılmıştır. Son BrdU enjeksiyonundan tam bir saat sonra siklofosfamid (5mg/kg) intraperitoneal enjekte edilmiştir. Hayvan kesilerek bir gün sonra hücreler toplanıp kromozom preparatları elde edilmiştir. Hücre başına elde edilen SCE normal hücrelere göre dört misli yüksek bulunmuştur. Ancak hayvana verilen BrdU ve mutajen madde karaciğerde aril hidrokarbon hidroksilaz aktivitesi ile etki edecekleri hücrelere gelmeden yıkılırlar. Bunu engellemek için multipl enjeksiyonlar ve devamlı BrdU infüzyonu şart görülmüştür(28).

Modern tekniklerde ise DNA'da hasar yaptığı düşünülen madde uzun bir süre tavşana verilmektedir. SCE analizinden önce alınan periferik lenfositler iki siklus boyunca BrdU ile muamele edilmektedir. Özellikle bu tip denemeler kemoterapi sırasında hastalara uygulanan klastojenik ajanların sitogenetik etkisinin saptanması amacıyla yapılır. Örneğin tavşana 4 ay boyunca Adriamycin verilmiş ve bu şekilde bu maddenin SCE artışına sebep olduğu bulunmuştur(61,65). Mutajen maddelerin etkileri saptanırken *in vivo* ve *in vitro* sonuçları karşılaştırmak son derece önemlidir(22).

Mayotik hücrelerde Crossing-over olayı, bir tetratta kardeş olmayan kromozomların kromatidleri arasında parça değiş tokuşu şeklinde olurken, SCE bir kromozomun kardeş kromatidleri arasında parça değiş tokuşudur(47).

DNA sentezi sırasında BrdU iki siklus boyunca yüksek konsantrasyonlarda tatbik edildiği zaman geç replike olan yerler soluk boyanır(61). Bir fluoresan boya olan 33258 Hoechst boyası; Akridin oranj veya proflavin boyalarından daha iyi kontrast sağlamaktadır(46). 33258 Hoechst boyasının fluoresansı BrdU'nun ağır atomu nedeniyle yaydığı fluoresan azalır(40). Bundan dolayı BrdU'nun girdiği kromatid soluk olarak görünür. BrdU olan DNA'nın Giemsa boyasına hassasiyeti azalır. 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) boyası pH 11'de çok iyi işlev görürken, nötral pH'ta ise aynı işlevi görememektedir (44).

#### 4-AMAÇ

Mutajenite,kanserojenite ve kalıtsal hastalıkların teşhisinde SCE testinin çok duyarlı olduğunu biliyoruz. insanda Hepatit yapan virüsler DNA virüsleridir. Virüsler girdikleri hücrenin genetik yapısını kontrol altına alarak etkili olurlar.

O halde hepatit virüsleri hastalık semptomlarını verdikleri gibi insanın genetiğinde defekt yapabilecekleri düşünülür.

Bu çerçevede, amacımız hepatit virüslerinin insan kromozomlarında hasar yapıp yapmadıklarını SCE metodu ile duyarlı bir şekilde belirlemek ve yapıyorlarsa hastalığın sağıtımından sonra kromozomlardaki hasarın devam edip etmediğini saptamaktır.



## C-MATERYAL VE METOD

Hepatitli hastalarda hepatit virüsünün sitogenetik etkilerinin *in vitro* araştırılmasını ön gören bu çalışma, Kasım 1992-Kasım 1993 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Pediatrik Enfeksiyon Bölümünde izlenen çocuklar üzerinde ve Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışma, hepatit nedeniyle tedavi için gelen 49 çocukta yapılmış olup, araştırmaya alınan vakaların Merkez laboratuvarında HbsAg yönünden pozitif olmaları aranmıştır. Araştırma grubunu oluşturan hepatitli gruptan hastalığın aktif olduğu dönemde ve hastalık geçtikten sonra kan alınmıştır.

Yine Merkez laboratuvarında Hepatit yönünden negatif olan 0-12 yaş arası 39 çocuktan kan alınarak kontrol grubu oluşturulmuştur.

Araştırma grubu olarak incelenen hasta grubunda aranan diğer özellikler:

- a) 12 yaşını geçmemiş olmak,
- b) Hepatitten dolayı hastaneye başvurduğunda, hastaneye gelmeden önce bilinçli veya bilinçsiz antibiyotik almamış ya da alınmışsa en az 3 ay önce bunu terketmiş olmak.
- c) En az 6 aylık süre içerisinde radyasyon (Röntgen ışını vb) almamış olmak.
- d) Hepatitle beraber ikincil bir hastalık tablosu göstermemek.

Kontrol grubunda aranan özellikler:

- a) 12 yaşını geçmemiş olmak
- b) Hepatit'e karşı aşılanmamış olmak
- c) Radyasyon ve Antibiyotik almamış olmak
- d) Sağlıklı olmak.



Araştırmaya alınan hasta ve kontrol grubundaki tüm bireylerin yaşları, cinsiyetleri ve HbsAg yönünden durumları anında kaydedilmiştir.

## D-SİTOGENETİK ARAŞTIRMA

### 1- Kan Örneklerinin Alınması

Her olgudan steril heparinli (Li veya Na) tüplere steril şartlar altında 1 ml. venöz kanı alınmıştır. Bu kan tüplerinden, daha önceden hazırlanmış özel kültür tüplerine steril UV kabininde bek alevi önünde ekimleri yapılmıştır. Kan örneklerinin işlem görmeden önce uzun süre dış ortamda beklemelerine izin verilmemiştir.

### 2- Kültür Ortamının Hazırlanması

- 100 ml. RPMI 1640 mediumu (Sigma) L-Glutaminli ve Sodyum bikarbonatlı
- 20 ml. Fetal Calf serum (Seromed)
- 4 ml. Phytohaemagglutinin M (Seromed)
- 1 ml. Penicillin-Streptomycin (10.000 IU/ml) (Sigma)

Steril UV kabininde steril şartlarda hazırlanan yukarıdaki ortam, yine steril şartlar altında 10 ml'lik ağzı kapaklı, konik tabanlı plastik tüplere (Greiner Labotechnik-Almanya) 2.5 ml. şeklinde dağıtımı yapılmıştır. Bu durumdaki tüplerde CO<sub>2</sub> kaçağını önlemek amacıyla ağızları ayrıca parafilmlenmiş ve kullanılıncaya kadar +4°C'da muhafaza edilmişlerdir.

Kültür ortamına inokülasyon yapılmadan önce, ortam 37°C sıcaklığa getirilmiş, bu sıcaklığa gelinceye dek beklenmiş ve her bir tüp steril şartlar altında enjektörle heparinli kan örneğinden alınan 5 damla örnek ile inoküle edilmiştir. Eğer işlem yavaş yapılmazsa kan hücrelerinin lizisi söz konusu olabilmektedir. Hemen sonra 10 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde her kültür tüpüne 50 µl BrdU (Sigma) aktarılmıştır. Bu şekilde kültür tüplerinin içeriği homojen olana kadar hafifçe karıştırılmıştır. Işığın etkisi, kültür tüplerinin alimünyum

folyo ile sarılmasıyla yok edilmiştir. Karanlıkta bekletme 72 saat boyunca sürmüştür. Tüpler numaralanarak ilgili bilgiler ayrıca tutulmuştur.

### 3-inkübasyon işlemi

- a) Kültür besiyerine kan örnekleri inoküle edildikten sonra 37°C'lik etüvde 72 saat süre ile inkübasyona alınmıştır.
- b) 72 saatlik süre dolmadan 2 saat önce, yani inkübasyonun 70. saatinde, lenfositlerin mitoz bölünmelerini Metafaz safhasında durdurmak amacıyla 0.1 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde stok colcemid'den (10 µl/ml Demecolcine, Seromed-Almanya) 25 µl eklenmiş ve kültür tüpleri iki parmak arasında yavaş bir şekilde çalkalanmıştır.
- c) 72 saatlik sürenin bitiminde kültür tüplerinin kapakları açılmış ve santrifuj makinasına (Sorvall GLC-1 General Laboratory centrifuge-USA) dengeli bir şekilde konduktan sonra 1000 rpm'de 8 dakika süre ile santrifuj edilmiştir.
- d) Hücre pelletinin üzerinde kalan supernatant sıvısı pastör pipeti ile uzaklaştırılmıştır.
- e) Önceden 0.075 M olacak şekilde ve 37°C'ye getirilmiş KCl çözeltisinden, girdap karıştırıcı (Elektro Mag-TM) üzerinde dikkatlice karıştırılan hücre pelletine damla damla 2.5 ml. hipotonik solüsyon katılmıştır. Ardından hipotonik sıvı katılan tüpler 37°C'lik etüve alınarak 10 dakika inkübe edilmiştir. Bu aşamada amaç eritrositleri patlatmak fakat lenfositleri şişirmektir.
- f) Tüpler inkübasyon sonunda santrifuj makinasına yerleştirilerek 1000 rpm'de 8 dakika süre ile santrifüj edilmişlerdir. Üstteki süpernatant sıvısı pastör pipeti ile atılmıştır.
- g) Yaklaşık 2 saat önce 3:1 oranında (3 kısım metanol, 1 kısım Asetik asit) hazırlanan ve buzdolabında soğutulan fiksatiften damla damla ve vortex üzerinde karıştırma yapılarak 2.5 ml katılmıştır.
- h) Fiksasyon işlemine en az 3 defa devam edilmiş olup, kirlilik varsa buradaki işlem sayısı artırılmıştır.
- i) Üstteki süpernatant kısmı dipte 0.5 ml. kalacak şekilde pastör pipeti ile atılmıştır. Lenfosit peleti 0.5 ml'lik fiksatifte homojen olacak şekilde hafifçe pastör pipeti ile



karıştırılmıştır. Her hasta için pastör pipetleri ayrı ayrı tutulmuştur.

#### 4- Lamların Temizlenmesi

- a) Çizilmemiş ve bir ucu rodajlı lamlar (süper frost) bir gün önceden deterjanlı su içinde bırakılmıştır. Ertesi gün bir bez aracılığıyla alt ve üstten iyice yıkanmıştır. Bu işlemde geçen tüm lamlar metal şalelere dizilerek musluk suyunun altına konmuş ve deterjanın uzaklaşması sağlanmıştır.
- b) Lamların bulunduğu şaleler 10 dakika süre ile saf suda bekletilmişlerdir.
- c) Saf sudan alınan lamlar 30 dakika süre ile metanol içinde bırakılmışlardır.
- d) Süre bitiminde şalelere saf su konarak bir gece veya daha fazla buz dolabında bekletilmişlerdir.
- e) Lamlar saf sudan çıkarılarak birer birer kuru tülbent bezi ile iyice silinmiş, yine şalelere yerleştirilerek buzdolabına kaldırılmışlardır.

#### 5- Preparasyon işlemi

Fiksasyonun son safhasında konik tabanlı tüpte bırakılan 0.5 ml'lik lenfosit örneği homojen hale getirildikten sonra, pastör pipetine alınır ve 10-15 cm yüksekten temiz, soğuk ve hafif nemlendirilmiş 45° eğimli lamlara 2-3 damla bırakılır. Her olgu için 7-8 preparat hazırlanır. Nemlendirmenin amacı metafaz plaklarının kolay yayılmasını sağlamaktır. Hasta preparatlarının birbirine karışmasını önlemek için lamların altına hastalara göre etiketlenmiş süzgeç kağıtları konmuştur. Kurutmanın ardından preparatların rodajlı kısmına hastanın adı soyadı, tarihi yazılır ve preparatlar lam kutularına yerleştirilerek karanlıkta 15 gün süre ile eskitmeye bırakılırlar.

#### 6- Boyama işlemi

- a) Cam şaleye 100 ml. 2xSSC (Sodyum Salin Citrat) tamponu konduktan sonra bunun üzerine karanlıkta 100 ml stok 33258 Hoechst boyasından 100 µl konmuş ve bagetle karıştırılmıştır. Preparatlar cam şaleye yerleştirilerek 20

dakika süreyle bırakılmışlardır. BrdU'nun ve Hoechst'in bozulmaması için cam şale teneke kutunun içine alınmış ayrıca oda önceden karartılmıştır.

- b) Buradan alınan preparatlar McBouilene tamponu (pH 7.1) içinde çalkalanmışlardır. Sonra kromozomların yayıldığı preparat yüzeyi yukarı gelecek şekilde geniş yüzeyli kutulara dizilmişlerdir. Bunların üzerine pH 7.1 olan McBouilene tamponundan ilave edilir. Tamponun lam üzerindeki seviyesi 1-1.5 mm'yi aşmamasına dikkat edilmiştir.
- c) 40 Wattlık UV lambası altına ve lambadan 25 cm mesafede yerleştirilerek UV lambası çalıştırılmıştır. Bu işlemin süresi 1 saattir.
- d) Sürenin bitiminde preparatlar çıkarılarak pH 7.2'lik 2xSSC tamponunda hafifçe yıkanmışlardır. Önceden cam şalelere 100'er ml 2xSSC tamponu konmuş ve 60°C'a getirilmiş benmarideki 2xSSC şalelerine preparatlar dizilmiştir. 60°C temperatürde 1 saat süre ile inkubasyon sağlanmıştır. Burada amaç kromozomların şişmesi ve histon proteinlerinin denatürasyonunu sağlamaktır.
- e) 100 ml'lik şalelere Soransan tamponda (pH 6.8) hazırlanmış % 5'lik Giemsa boyasına yerleştirilen preparatlar 7 dakika bekletilmişlerdir. Preparatları boyanın içine koymadan önce üstteki partikül filmi süzgeç kağıdıyla alınmıştır.
- f) Süre bitiminde lamalar hafifçe musluk suyunda yıkanmışlardır. Süzgeç kağıdı üzerine dizilerek kurumaları sağlanmıştır.
- g) Fazla boyanın giderilmesi için preparatlar ksilol içinde 10'ar dakika bekletilmişlerdir. Bu arada preparatlardaki artefaktlar azaltılmıştır.
- h) Daha sonra preparatlar entellanlanarak lamelle kapatılmışlardır. Değerlendirmeye kadar muhafaza için preparat kutularına yerleştirilmişlerdir.

#### 7- Kültür, preparasyon ve boyama sırasında kullanılan solüsyonlar:

##### a) BrdU (5-Bromo-2-deoksiüridin)

5 mg Toz BrdU tartılarak 10 ml. bidistile su içinde eritilir. Bu işlem karanlıkta yapılır. Sterilizasyon için 0.2 µm por çaplı tip filtre ile BrdU solüsyonu sterilize edilmiş ve önceden steril hale getirilen (otoklavda 120°C, 15 dak, 1.5 Atm)

Eppendorf tüplerine steril şartlar altında 1'er ml şeklinde katılıp stok BrdU preparatları hazırlanmıştır. Eppendorf tüpleri Aliminyum folya ile kapatıldıktan sonra bunlar derin dondurucuya konmuşlardır. Ekimden önce 1 ml'lik eppendorf tüpünün sıcaklığı 37°C'ye getirilmiştir.

#### b) 33258 Hoechst Stok Boyası

1 mg 33258 Hoechst boyası tartıldıktan sonra 10 ml bidistile suda eritilmiş ve renkli şişeye alındıktan sonra Aliminyum folyo ile kapatılarak stok 33258 Hoechst boyası hazırlanmıştır.

#### c) Colcemid Sölüsyonu

Elimizde ticari olarak 10 µg/ml konsantrasyonlu solüsyon bulunmaktaydı (Seromed-Almanya). 2.5 ml kültür tüpüne bu solusyondan 25 µl alınmıştır.

#### d) 2xSSC tamponu

- |   |           |
|---|-----------|
| 1) 0.3 M NaCl (58.44 gr/mol)  | 17.53 gr. |
| 2) 0.03 M Na-sitrat (357.16 gr/mol)   | 10.71 gr. |
| (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> x 5.5 H <sub>2</sub> O) |           |

Tartılan bu maddeler biraz distile suda eritildikten sonra 1000 ml'ye distile su ile tamamlanırlar. 2xSSC tamponun pH 7.2'ye 0.1 N HCl veya 0.1 N NaOH ile ayarlanır. Bozulmaması için hemen buzdolabına alınmıştır.

#### e) McBouiline Tamponu (pH 7.1)

- 1) 0.1 M Sitrik asit monohidrat (210.14 gr/mol) 500 ml. için 10.5 gr. tartılmış ve 500 ml. distile su ile çözülerek bu tampon hazırlanmıştır (pH 2.3).
- 2) 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12H<sub>2</sub>O (358.14 gr/mol) 500 ml tampon için 35.81 gr. tartılmış ve 500 ml. distile suda eritilerek tampon hazırlanmıştır (pH 9.5).

Dereceli silindire 500 ml. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tamponu ve bir manyetik bar konmuştur. Sonra manyetik karıştırıcı üzerine bırakılmıştır.

pH metre kalibre edildikten sonra elektrot tampona daldırılmıştır. McBouiline tamponun pH 7.1 oluncaya dek damla damla 0.1 M'lik sitrik asit monohidrattan katılmıştır. Bu tampon hemen buzdolabına alınır ve 24 saat içinde kullanılır.

**f) Soransan Tamponu (pH 6.8)**

- 1) 0.06674072 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$  (358.14 gr/mol) 200 ml için 4.78 gr. tartılarak 200 ml'ye distile su ile tamamlanır. Manyetik karıştırıcıda karıştırılır.
- 2) 0.066721533 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (136.09 gr/mol) 200 ml için 1.81 gr. tartılıp 200 ml'ye distile su ile tamamlanıp ve manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.

Dereceli silindire 200 ml.  $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \times 12\text{H}_2\text{O}$  tamponu konur ve manyetik karıştırıcı üzerine konduktan sonra pH metre aracılığıyla pH 6.8 olana kadar  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tamponu ile damla damla titre edilir. Hemen kullanılmayacaksa bu tamponlar titre edilmeden ayrı ayrı buzdolabına kaldırılır. Kullanılacakları zaman sıcaklıkları oda sıcaklığına getirilmiştir.

**g) PHA (Phytohaemagglutinin) solüsyonu**

1.2 mg liyofilize toz PHA üzerine steril olarak 5 ml steril bidistile su konup karıştırılır. Stok hazırlanmış olur.

**h) Penicillin/Streptomycin Stok Solüsyonu**

Steril şartlar altında liyofilize toz antibiyotiğe 20 ml steril bidistile su katılır.

**8- Değerlendirme**

Teknik bakımdan analize uygun kromozomları içeren metafaz plakları, ışık mikroskobunda immersiyon objektifinde (10x100 Nikon marka mikroskop) SCE yönünden incelenmiştir. Bir kromozomun koyu veya soluk boyanan kromatidlerinin biri dikkate alınmıştır. Örneğin koyu boyalı kromatidin ucunda bir kırık varsa 1 SCE, ortada bir parça değiş tokusu varsa 2 SCE, parça değişimi yoksa

(-) şeklinde değerlendirilmiştir. SCE için her preparatta 25 metafaz plağı sayılmıştır ve özel formlara işlenmiştir.

Mitotik index içinde 10x40 büyütmeye 1000 hücre sayılmış ve 1000 hücre'de tespit edilen mitoz (profaz, metafaz,anafaz)'lar kaydedilmiştir. Sonra yüzde olarak hesap yapılmıştır.

Replikasyon indexi için 100 metafaz plağı sayılmış ve yüz metafazda M<sub>1</sub> (Metafaz 1), M<sub>2</sub> (Metafaz 2) ve M<sub>3</sub> (Metafaz 3) sayıları tespit edilerek kaydedilmiş ve aşağıdaki formül uygulanmıştır.

$$\text{Replikasyon indexi} = \frac{(1 \times M_1) + (2 \times M_2) + (3 \times M_3)}{100}$$

#### **E-İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME**

Elde edilen bulgular Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Bioistatistik bölümünün desteği ile bölümümüzde yapılmıştır. Kullanılan testler ise,

1- Student's t testi (Ortalamalar arası farklılık testi)

2- Mann Whitney U testi (Verilerimiz parametrik olmalarına rağmen gruptaki denek sayımız eşit olmadığından bu teste başvurulmuştur.

Veriler Üniversitemize bağlı Bilgi İşlem merkezinde bilgisayara girilmiş ve paket SPSSX programları ile analiz edilmiştir.

## F-BULGULAR

### SCE Bulguları

Araştırmamızda 39 kontrol olgusunda 975, 49 hepatit hastası olguda 1225 ve 11 takip (iyileşme sonrası) olgusunda 275 metafaz plağı incelenmiştir. Toplam olarak 113.850 kromozom üzerinde oluşan SCE'ler tespit edilerek özel kartlara işlenmiştir. Kontrol, hasta ve takip gruplarında oluşan Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) hızları karşılaştırılmıştır. Ayrıca her olgu için 100 metafaz plağında replikasyon indeksi ve 1000 hücrede mitotik indeksi tespit edilerek gruplar arası gerekli karşılaştırmalar yapılmıştır.

Kontrol, hasta ve takip gurubu olgularında tespit edilen kromozom başına düşen ortalama SCE dağılımı TABLO 1,2,3'de verilmiştir.

Tablolar dikkatle incelendiğinde her üç grupta da büyük kromozomlarda büyüklükle doğru orantılı olarak SCE, diğer kromozomlara oranla yüksek bulunmuştur. Büyük kromozomlarda SCE'nin daha yüksek sıklıkta meydana gelmiş olması, olgular arasında dağılımın homojen olduğunu ve kromozomların BrdU'ya olan yanıtlarının benzer olduğunu göstermektedir.

Hasta grubu olgularında tespit edilen SCE sıklığı kontrol ve takip grubu olgularına göre daha yüksek bulunmuştur. Oysa takip grubunda (iyileşme döneminde) görülen SCE sıklığı kontrol grubu olgularına göre farklı bulunmuş ise de bu sonuç istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

Hasta grubu olgularınının 1,2,3,4-5 ve 6-12 (A,B,C grubu) nolu kromozomlarında kromozom başına tespit edilen SCE sayısı, kontrol ve takip grubu olgularındakinden daha yüksek ve anlamlı bulunmuştur. Diğer kromozom grupları arasında SCE sayısı bakımından fark pek önemli görülmemiştir. ilgili karşılaştırma istatistiksel olarak TABLO 4-6'da gösterilmiştir.

TABLO 1. HASTA GRUBU OLGULARINDA SCE SIKLIGININ KROMOZOMLARA DAGILIMI VE KROMOZOM BAŞINA DÜŞEN ORTALAMA SCE DEGERLERİ (Her olgu için 25 metafaz sayılmıştır).

OLGU	AD SOYAD	CİNS	YAS	1	2	3	4-5	6-12	13-15	16-18	19-20	21-22
1	AK	♂	6	30	22	15	58	82	17	5	-	-
2	iÖ	♂	2.5	25	22	11	57	62	19	7	3	3
3	UA	♂	11	30	24	15	61	82	25	10	-	-
4	NÖ	♂	10	27	19	12	45	61	25	16	7	2
5	GH	♂	9	35	25	11	65	78	29	19	4	-
6	iA	♂	7	26	18	15	45	50	20	10	2	-
7	RK	♂	5	31	23	20	55	93	25	9	10	-
8	EO	♀	7	30	27	20	62	83	25	7	-	-
9	EK	♀	5	25	22	7	77	101	26	5	-	-
10	OÇ	♂	1.5	31	26	23	52	87	23	3	1	-
11	EM	♀	3	29	21	17	69	78	25	6	3	-
12	DK	♀	3	32	27	21	39	95	25	3	-	-
13	MK	♂	9	31	26	25	71	94	20	4	-	-
14	ŞK	♀	12	29	27	20	40	84	20	15	3	-
15	EC	♂	8	31	21	20	59	75	13	4	-	-
16	MV	♂	7	29	22	15	53	100	17	-	-	-
17	AV	♀	8	31	21	16	57	91	18	6	-	-
18	ED	♂	11	28	23	16	61	82	20	3	-	-
19	AA	♂	7	27	22	21	64	72	19	4	-	-
20	SS	♂	12	28	24	17	60	87	21	14	-	-
21	SS	♀	6	29	24	16	57	82	22	7	1	-
22	HY	♀	12	25	19	12	58	71	23	11	-	-
23	iT	♂	4	36	27	20	65	88	26	15	6	-
24	VŞ	♂	12	27	23	13	62	77	18	8	-	-
25	ZB	♂	1.5	25	22	18	64	89	19	10	1	-
26	SA	♂	7	25	20	10	55	73	20	5	2	-
27	AE	♂	6	27	22	17	61	83	22	9	1	-
28	BY	♂	9	24	19	11	60	83	22	9	5	-
29	ED	♂	11	25	20	12	60	81	14	6	1	-

Tablo 1 (devamı)

<u>OLGU AD SOYAD</u>	<u>CİNS</u>	<u>YAS</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4-5</u>	<u>6-12</u>	<u>13-15</u>	<u>16-18</u>	<u>19-20</u>	<u>21-22</u>	
30	ŞA	♀	12	25	24	15	54	72	18	3	1	-
31	iKA	♂	5.5	26	21	9	54	70	19	8	-	-
32	VG	♂	8	28	24	19	65	87	23	5	-	-
33	UŞ	♂	4	29	21	13	65	78	26	13	3	-
34	ZÇ	♀	6	28	25	18	51	87	17	4	-	-
35	MH	♂	1.5	26	23	11	64	90	20	6	-	-
36	FS	♀	9	40	30	21	63	78	31	15	9	3
37	SM	♀	11	32	18	16	55	61	20	24	4	3
38	iB	♂	6	37	22	12	48	78	14	9	2	1
39	TG	♂	5	39	17	12	39	76	29	28	6	3
40	MY	♂	7	26	22	12	53	71	24	23	7	3
41	BA	♀	2	25	25	21	59	95	15	2	1	-
42	CK	♂	5	27	12	10	28	68	20	20	15	8
43	CD	♀	7	31	17	8	47	61	22	14	5	-
44	SÖ	♂	3	27	14	14	60	69	28	21	4	2
45	EK	♂	5	27	25	19	64	95	24	5	-	-
46	RÖ	♂	9	27	23	22	57	92	21	4	-	-
47	BC	♀	5	28	24	12	58	79	22	10	1	-
48	SA	♂	5	26	24	16	58	88	21	8	-	-
49	GB	♀	5.5	35	24	11	67	85	27	13	7	3



TABLO 2 . KONTROL GRUBU OLGULARINDA SCE SIKLIGININ KROMOZOMLARA DAGILIMI VE KROMOZOM BAŞINA DÜŞEN ORTALAMA SCE DEĞERLERİ  
(Her olgu için 25 Metafaz sayılmıştır)

OLGU	AD SOYAD	CİNS	YAS	1	2	3	4-5	6-12	13-15	16-18	19-20	21-22
1	SÖ	♂	5	26	21	9	43	34	16	-	-	-
2	MR	♂	12	22	23	8	38	45	17	-	-	-
3	SA	♂	10	21	9	13	47	43	13	7	1	-
4	LA	♀	9	16	22	15	42	45	19	-	-	-
5	BCS	♂	5	25	21	8	37	42	18	1	-	-
6	SY	♀	8	26	21	6	39	46	15	-	-	-
7	YK	♂	8	22	20	10	31	47	18	-	-	-
8	MD	♂	11	24	23	5	37	44	16	-	-	-
9	SP	♀	12	25	17	6	33	48	16	1	-	-
10	EH	♀	5	24	21	7	31	47	17	-	-	-
11	OG	♂	2	23	21	6	45	47	17	-	-	-
12	VK	♂	4	24	25	9	43	39	18	-	-	-
13	RE	♀	6	26	20	6	33	44	16	-	-	-
14	TU	♀	8	25	25	7	42	42	19	-	-	-
15	MY	♂	4	23	22	3	44	43	18	-	-	-
16	EG	♀	11	24	25	3	33	49	14	-	-	-
17	YSS	♂	3	26	19	5	45	42	15	2	-	-
18	EE	♀	7	22	23	6	40	38	20	-	-	-
19	DA	♂	12	21	21	8	39	41	18	3	-	-
20	PK	♀	9	24	26	5	35	38	20	-	-	-
21	GS	♀	3	22	23	8	39	43	18	-	-	-
22	EK	♀	1	22	16	10	42	49	17	4	-	-
23	CK	♂	12	22	19	9	40	50	20	5	-	-
24	MU	♂	12	21	18	13	43	41	18	3	-	-
25	ARG	♂	7	22	19	7	29	43	16	3	-	-
26	iP	♂	8	20	17	13	38	40	15	4	-	-
27	AS	♀	5	22	23	12	38	39	16	5	3	-
28	NS	♀	10	22	21	12	43	43	15	2	-	-
29	BD	♀	10	21	24	11	34	33	12	2	-	-
30	HÇ	♂	8	20	24	10	35	51	14	4	-	-
31	HG	♂	5	22	21	14	44	36	12	3	-	-
32	AKC	♂	9	21	21	11	44	39	14	5	-	-
33	HÇ	♂	8	21	12	18	38	38	12	3	-	-
34	MD	♀	6	26	15	9	43	45	18	5	1	-
35	BH	♂	6	20	18	12	43	45	11	3	1	-
36	ED	♂	7	18	22	12	46	35	15	3	-	-
37	SG	♀	2	24	19	11	42	39	12	4	2	-
38	UÇ	♂	2	22	24	8	38	43	14	8	3	-
39	KOB	♀	5	23	19	8	39	37	12	3	-	-

**TABLO 3. TAKİP GRUBU OLGULARINDA SCE SIKLIGININ KROMOZOMLARA DAGILIMI VE KROMOZOM BAŞINA DÜŞEN ORTALAMA SCE DEĞERLERİ**  
(Her olgu için 25 Metafaz sayılmıştır)

<b>OLGU</b>	<b>AD SOYAD</b>	<b>CİNS</b>	<b>YAŞ</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4-5</b>	<b>6-12</b>	<b>13-15</b>	<b>16-18</b>	<b>19-20</b>	<b>21-22</b>
11	BM	♀	3	24	21	7	41	56	9	-	-	-
33	UŞ	♂	4	24	17	8	49	55	15	3	-	-
35	MH	♂	2.5	22	22	7	36	46	15	-	-	-
36	FS	♀	9	24	17	4	48	57	15	1	-	-
38	iB	♂	6	26	21	8	37	42	14	-	-	-
39	TG	♂	5	27	19	8	52	53	17	-	-	-
40	MY	♂	7	24	23	4	43	51	16	-	-	-
41	BA	♀	2	28	22	2	40	52	14	-	-	-
47	BC	♀	5	26	20	4	43	50	15	-	-	-
48	SA	♂	5	27	22	4	41	43	12	-	-	-
49	GB	♀	5.5	26	22	9	33	46	13	-	-	-

**TABLO 4. HASTA GRUBU İLE KONTROL GRUBU OLGULARINDA SCE SIKLIGININ KROMOZOMLARA DAGILIMI VE KROMOZOM BAŞINA DÜŞEN ORTALAMA SCE DEĞERLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

HASTA GRUBU	1	2	3	4-5	6-12	13-15	16-18	19-20	21-22
KONTROL GRUBU	28.91	22.30	15.44	57.16	80.48	21.61	9.68	4.10	3.1
ORTALAMA FARK	6.36	1.79	6.36	18.0	38.1	5.56	6.08	2.27	
t DEĞERİ	9.27	2.42	7.63	11.30	20.32	7.45	4.59	4.54	
P	0.0001 <0.05	0.017 <0.05	0.0001 <0.05	0.0001 <0.05	0.0001 <0.05	0.0001 <0.05	0.0001 <0.05	0.001 <0.05	
U DEĞERİ	75.5	406.5	239	184	1.5	220	117	520	
P	0.0001 <0.05	0.0001 <0.05	0.0001 <0.05	0.0001 <0.05	0.0001 <0.05	0.0001 <0.05	0.0001 <0.05	0.0001 <0.05	

**TABLO 5. KONTROL GRUBU İLE TAKİP GRUBU OLGULARINDA SCE SIKLIGININ KROMOZOMLARA DAGILIMI VE KROMOZOM BAŞINA DÜŞEN ORTALAMA SCE DEĞERLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

KONTROL GRUBU	1	2	3	4-5	6-12	13-15	16-18	19-20	21-22
TAKİP GRUBU	22.56	20.51	9.05	39.35	42.38	16.05	3.60	1.83	
ORTALAMA FARK	-3	-0.03	+3.15	-2.74	-7.71	+1.96	+1.6	-	-
t DEĞERİ	-3.67	-0.03	2.91	-1.65	- 4.88	2.34	2.92	-	-
P	0.001 <0.05	0.077 >0.05	0.005 <0.05	0.106 >0.05	0.001 <0.05	0.023 <0.05	0.004 <0.05	-	-
U DEĞERİ	74	205	100	165.5	59.5	118	114	-	-
P	0.008 <0.05	0.8224 >0.05	0.0070 <0.05	0.2494 >0.05	0.0003 <0.05	0.0227 <0.05	0.007 >0.05		

TABLO 6. HASTA GRUBU OLGULARI İLE TAKİP GRUBU OLGULARINDA SCE SIKLIĞININ KROMOZOMLARA DAĞILIMI VE KROMOZOM BAŞINA DÜŞEN ORTALAMA SCE DEĞERLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

	1	2	3	4-5	6-12	13-15	16-18	19-20	21-22
HASTA GRUBU	28.91	22.30	15.44	57.16	80.48	21.61	9.48	4.10	3.10
TAKİP GRUBU	25.17	20.54	5.90	42.09	50.09	14.09	0.36	-	-
ORTALAMA FARK	3.74	1.76	9.54	15.07	30.39	7.52	9.12	4.10	3.10
t DEĞERİ	3.11	1.65	7.08	5.32	8.90	5.91	9.72	-	-
P	0.003 <0.05	0.004 <0.05	0.0001 <0.05	0.0001 <0.05	0.0001 <0.05	0.0001 <0.05	0.0001 <0.05	-	-
U DEĞERİ	97	160	8	47.5	6.5	28	3.0	-	-
P	0.0009 <0.05	0.0349 <0.05	0.0001 <0.05	0.0001 <0.05	0.0001 <0.05	0.0001 <0.05	0.0255 <0.05	-	-

Ortalama SCE hızının saptanması amacıyla her olgu için 25 metafaz plağı incelenmiş olup, toplam SCE sayısı metafaz plağına bölünerek sonuç elde edilmiştir. Hasta, kontrol ve takip grubu olgularını gösteren tablolar incelendiği zaman ortalama SCE sıklığının hasta grubu olgularında diğer grup olgularına göre yüksek olduğu görülmektedir. Gerçekten hasta grubu olgularında ortalama SCE sıklığı, takip ve kontrol grubu olgularına göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Hasta grubu olgularında ortalama SCE sıklığı  $9.53 \pm 0.12$ , kontrol grubu olgularında  $6.09 \pm 0.042$  ve takip grubu olgularında  $6.33 \pm 0.116$  olarak bulunmuştur. Bulgulara göre kontrol grubu ile takip grubu olguları arasında ortalama SCE sıklığı yönünden fark görülmüş bu fark istatistiksel olarak anlamsız görülmüştür. TABLO 7-9'da hasta, kontrol ve takip grubu olgularda görülen toplam ve ortalama SCE değerleri görülmüyor. TABLO 10-12'de ortalama SCE değerleri karşılaştırılmıştır.

TABLO 7. HASTA GRUBU VAKALARINDA TOPLAM SCE DEGERLERİ VE METAFAZ BAŞINA DÜŞEN ORTALAMA SCE SAYISI

<u>OLGU NO</u>	<u>METAFAZ SAYISI</u>	<u>SCE DEGERİ</u>	<u>SCE/METAFAZ</u>
1	25	229	9.16
2	25	209	8.36
3	25	247	9.88
4	25	214	8.56
5	25	266	10.64
6	25	186	7.44
7	25	266	10.64
8	25	254	10.16
9	25	263	10.52
10	25	246	9.84
11	25	248	9.92
12	25	242	9.68
13	25	271	10.84
14	25	238	9.52
15	25	223	8.92
16	25	236	9.44
17	25	240	9.60
18	25	233	9.32
19	25	229	9.16
20	25	251	10.04
21	25	238	9.52
22	25	219	8.76
23	25	283	11.32
24	25	228	9.12
25	25	248	9.92
26	25	210	8.40
27	25	242	9.68
28	25	233	9.32
29	25	219	8.76
30	25	212	8.48
31	25	207	8.28
32	25	251	10.04
33	25	248	9.92
34	25	230	9.20
35	25	240	9.60
36	25	290	11.60
37	25	233	9.32
38	25	223	8.92
39	25	249	9.96
40	25	241	9.64
41	25	243	9.72
42	25	208	8.32
43	25	205	8.20
44	25	239	9.56
45	25	259	10.36
46	25	246	9.84
47	25	234	9.36
48	25	241	9.64
49	25	272	10.88
Ortalama SCE/Metafaz			9.53
Standart sapma (XQn-1)			0.837
Standart hata			0.12

TABLO 8. KONTROL GRUBU OLGULARINDA TOPLAM SCE DEĞERİ VE METAFAZ BAŞINA DÜŞEN ORTALAMA SCE SAYISI

<u>OLGU NO</u>	<u>METAFAZ SAYISI</u>	<u>SCE DEĞERİ</u>	<u>SCE/METAFAZ</u>
1	25	149	5.96
2	25	153	6.12
3	25	154	6.16
4	25	159	6.36
5	25	152	6.08
6	25	154	6.12
7	25	148	5.92
8	25	149	5.96
9	25	146	5.84
10	25	147	5.88
11	25	159	6.36
12	25	158	6.32
13	25	145	5.80
14	25	160	6.40
15	25	153	6.12
16	25	148	5.92
17	25	154	6.16
18	25	149	5.96
19	25	151	6.04
20	25	148	5.92
21	25	153	6.12
22	25	160	6.40
23	25	165	6.60
24	25	157	6.28
25	25	139	5.56
26	25	147	5.88
27	25	158	6.32
28	25	158	6.32
29	25	137	5.48
30	25	163	6.52
31	25	152	6.08
32	25	155	6.20
33	25	142	5.69
34	25	162	6.48
35	25	153	6.12
36	25	151	6.04
37	25	153	6.12
38	25	160	6.40
39	25	141	5.64
Ortalama SCE/Metafaz			6.08
Standart sapma (X <sub>Qn-1</sub> )			0.261
Standart hata			0.042

TABLO 9. TAKİP GRUBU OLGULARINDA TOPLAM SCE SAYISI VE METAFAZ BAŞINA DÜŞEN SCE DEĞERİ

OLGU NO	Metafaz Sayısı	Toplam SCE	Ort. SCE/Metafaz
1	25	158	6.32
2	25	171	6.84
3	25	148	5.92
4	25	166	6.64
5	25	148	5.92
6	25	176	7.04
7	25	161	6.44
8	25	158	6.32
9	25	158	6.32
10	25	149	5.96
11	25	149	5.96

Ortalama SCE/Metafaz : 6.33  
XQn-1 : 0.385  
Standart hata : ± 0.105

TABLO 10. HASTA GRUBU İLE KONTROL GRUBU OLGULARININ METAFAZ BAŞINA DÜŞEN ORTALAMA SCE HIZLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

		SCE/METAFAZ
HASTA GRUBU OLGULARINDA METAFAZ BAŞINA DÜŞEN ORTALAMA SCE DEĞERİ		9.53 ± 0.120
KONTROL GRUBU OLGULARINDA METAFAZ BAŞINA DÜŞEN ORTALAMA SCE DEĞERİ		6.09 ± 0.042
ORTALAMA FARK		3.44
STUDENT t-TESTİ	t DEĞERİ	24.69
	P	0.0001<0.05
MANN WHITNEY U TESTİ	U DEĞERİ	0.01
	P	0.0001<0.05

TABLO 11. KONTROL GRUBU İLE TAKİP GRUBU OLGULARINDA METAFAZ BAŞINA DÜŞEN ORTALAMA SCE DEĞERLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

		SCE/METAFAZ
KONTROL GRUBU OLGULARINDA METAFAZ BAŞINA DÜŞEN ORTALAMA SCE DEĞERİ		6.09 ± 0.042
TAKİP GRUBU OLGULARINDA METAFAZ BAŞINA DÜŞEN ORTALAMA SCE DEĞERİ		6.33 ± 0.116
ORTALAMA FARK		0.24
STUDENT t-TESTİ	t DEĞERİ	- 2.41
	P	0.2>0.05
MANN WHITNEY U TESTİ	U DEĞERİ	143.5
	P	0.0954>0.05

TABLO 12. HASTA GRUBU İLE TAKİP GRUBU OLGULARINDA METAFAZ BAŞINA DÜŞEN ORTALAMA SCE DEĞERLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

		SCE/METAFAZ
HASTA GRUBU OLGULARINDA METAFAZ BAŞINA DÜŞEN ORTALAMA SCE DEĞERİ		9.53 ± 0.120
TAKİP GRUBU OLGULARINDA METAFAZ BAŞINA DÜŞEN ORTALAMA SCE DEĞERİ		6.33 ± 0.116
ORTALAMA FARK		3.2
STUDENT t-TESTİ	t DEĞERİ	12.33
	P	0.0001<0.05
MANN WHITNEY U TESTİ	U DEĞERİ	0.01
	P	0.0001<0.05



Bulgularımızdan, ortalama SCE dağılımının cinsiyet tarafından etkilenip etkilenmediği bulunmak istenmiş ve bu özelliğe göre TABLO 13 hazırlanmıştır. Her grup kendi içinde erkek ve kız olarak değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır. Buna göre cinsiyet grupları arasında SCE sıklığına etki önemsiz bulunmuştur (TABLO 13).

TABLO 13. HASTA, KONTROL VE TAKİP GRUPLARINDA CİNSİYETİN ORTALAMA SCE'YE ETKİSİ VE GRUP İÇİ KARŞILAŞTIRMALAR

		FREKANS	SCE/METEFAZ
HASTA GRUBU	KIZ	16	9.65±0.215
	ERKEK	33	9.48±0.145
	ORTALAMA FARK		0.17
	t-DEGERİ		0.67
	P		0.505>0.05
KONTROL GRUBU	KIZ	17	6.06±0.071
	ERKEK	22	6.11±0.052
	ORTALAMA FARK		0.05
	t-DEGERİ		-0.61
	P		0.543>0.05
TAKİP GRUBU	KIZ	5	6.31±0.108
	ERKEK	6	6.35±0.204
	ORTALAMA FARK		0.04
	t-DEGERİ		-0.17
	P		0.87>0.05

Hasta, kontrol ve takip grubu olgularında 1000 adet mitoz giren ve girmeyen hücre sayılmış, 1000 hücrede kaç adedinin mitoz girdiği tespit edilmiştir. Buna göre mitotik indexi "%" olarak hesaplanmış ve tablolar düzenlenmiştir. Hasta grubu olgularında bulunan mitotik index değeri kontrol ve takip grubu olgularına göre istatistiksel olarak yüksek ve önemli bulunmuştur. Oysaki kontrol ve takip grubu olgularında bu durum anlamsız bulunmuştur (TABLO 14,15).

Ayrıca, üç araştırma grubu olgularının her birinde mitoz safhasında olan 100 adet metafaz plağı incelemeye alınmıştır. Her plaktaki tüm kromozomların kromatidleri koyu boyanmışsa böyle bir plak M<sub>1</sub> (Metafaz 1), her kromozomun bir kromatidi koyu diğeri açık ise böyle bir plak M<sub>2</sub>, kromozomları heterojen olarak görülmüşse M<sub>3</sub> olarak değerlendirilmiştir (TABLO 14,15).

$$R I = \frac{(1 \times M_1) + (2 \times M_2) + (3 \times M_3)}{100}$$

formülüne göre Replikasyon indeksi (RI) tespit edilmiştir. Replikasyon indeksi tablosuna bakıldığı zaman hasta grubu olgularında bu indeksin yüksek, istatistiksel olarak kontrol ve takip grubuna göre anlamlı bulunmuştur. Fakat kontrol ile takip grubu olgularında replikasyon indeksi yönünden bir fark görülmemiştir (TABLO 16-18).

Belli yaş gruplarının ortalama SCE sıklığına etkilerinin olup olmadığı araştırılmış ve her grup içinde yaşın SCE sıklığına bir etki yapmadığı saptanmıştır.

TABLO 14. HASTA, KONTROL VE TAKİP GRUPLARINDA MİTOTİK İNDEKSİN DAĞILIMI (Her olgu için 1000 hücre sayılmıştır)

<u>OLGU NO</u>	<u>HASTA GRUBU</u>	<u>KONTROL GRUBU</u>	<u>TAKİB GRUBU</u>
1	4.45	4.38	3.94
2	4.86	4.29	3.74
3	4.71	4.14	4.10
4	4.54	4.08	4.47
5	4.91	4.07	4.27
6	5.39	4.43	3.9
7	6.18	4.21	4.13
8	5.48	4.17	4.16
9	4.96	3.99	4.44
10	5.12	4.37	4.09
11	5.04	4.17	4.34
12	4.15	4.34	
13	4.45	3.98	
14	4.12	4.27	
15	4.4	4.16	
16	4.4	4.2	
17	4.5	3.89	
18	4.41	4.29	
19	4.75	4.17	
20	4.56	3.88	
21	5.05	4.16	
22	4.97	4.37	
23	4.73	4.3	
24	4.55	4.19	
25	4.83	4.39	
26	4.58	4.49	
27	5.04	4.34	
28	4.97	4.49	
29	4.82	4.05	
30	4.98	4.27	
31	4.58	4.57	
32	5.49	4.28	
33	4.82	3.88	
34	4.79	4.4	
35	4.66	4.13	
36	4.85	4.29	
37	5.78	4.14	
38	4.86	4.04	
39	5.19	4.47	
40	4.87		
41	5.05		
42	5.34		
43	4.94		
44	5.74		
45	5.5		
46	5.53		
47	4.84		
48	4.86		
49	4.89		

TABLO 15. HASTA, KONTROL VE TAKİP GRUBU OLGULARINDA REPLİKASYON İNDEKSLERİNİN DAGILIMI (Her olgu için 100 metafaz )

<u>OLGU NO</u>	<u>HASTA GRUBU</u>	<u>KONTROL GRUBU</u>	<u>TAKİP GRUBU</u>
1	2.16	2.11	2.00
2	2.17	2.12	2.03
3	2.26	2.02	2.13
4	2.32	2.03	2.11
5	2.21	2.1	2.13
6	2.18	2.09	2.1
7	2.19	2.07	2.0
8	2.21	2.11	2.15
9	2.12	2.11	2.01
10	2.21	2.08	2.07
11	2.35	1.99	2.04
12	2.22	2.12	
13	2.21	2.04	
14	2.21	2.12	
15	2.15	2.07	
16	2.17	2.11	
17	2.28	2.10	
18	2.24	2.14	
19	2.24	2.14	
20	2.25	2.06	
21	2.12	2.14	
22	2.36	2.13	
23	2.18	2.1	
24	2.16	2.08	
25	2.15	2.13	
26	2.17	2.1	
27	2.18	2.02	
28	2.25	2.06	
29	2.20	2.04	
30	2.23	2.07	
31	2.16	2.13	
32	2.33	2.13	
33	2.21	2.01	
34	2.22	2.11	
35	2.19	2.12	
36	2.30	2.1	
37	2.52	2.16	
38	2.20	2.02	
39	2.20	2.08	
40	2.19		
41	2.27		
42	2.29		
43	2.28		
44	2.46		
45	2.34		
46	2.32		
47	2.17		
48	2.16		
49	2.19		

TABLO 16. HASTA GRUBU İLE KONTROL GRUBU OLGULARINDA ORTALAMA MİTOTİK İNDEKS VE ORTALAMA REPLİKASYON İNDEKSİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

	MİTOTİK İNDEKS	REPLİKASYON İNDEKSİ
HASTA GRUBU	4.62	2.23
KONTROL GRUBU	3.92	1.94
ORTALAMA FARK	0.7	0.29
t DEĞERİ	2.97	3.91
P	0.004 P<0.05	0.0001 P<0.05

TABLO 17. HASTA GRUBU İLE TAKİP GRUBU OLGULARINDA ORTALAMA MİTOTİK İNDEKS VE ORTALAMA REPLİKASYON İNDEKSLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

	MİTOTİK İNDEKS	REPLİKASYON İNDEKSİ
HASTA GRUBU	4.62	2.23
TAKİP GRUBU	3.82	1.73
ORTALAMA FARK	0.8	0.5
t DEĞERİ	2.11	4.61
P	0.039 P<0.05	0.0001 P<0.05

TABLO 18. KONTROL GRUBU İLE TAKİP GRUBU OLGULARINDA ORTALAMA MİTOTİK İNDEKSİ VE ORTALAMA REPLİKASYON İNDEKSLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

	MİTOTİK İNDEKS	REPLİKASYON İNDEKSİ
KONTROL GRUBU	3.92	1.94
TAKİP GRUBU	3.82	1.73
ORTALAMA FARK	0.1	0.21
t DEĞERİ	0.28	1.07
P	0.781 P>0.05	0.288 P>0.05

## G-TARTIŞMA

Virüslerin insanlarda hastalık tabloları oluşturdukları, insanlarda bilinen tahribatlar yaptıkları uzun zamandan beri bilinmektedir. Hastalık yapan virüslerin insan genetiğinde hasar yapıp yapmadıkları merak konusu olmuş, bu merak 1960'lı yıllardan sonra sitogenetik alanında kaydedilen ilerlemeler ışığında cevap görmeye başlamıştır. Sitogenetikte SCE analizinin duyarlı bir test olarak kullanılması, virüslerin insan genetiğine etkilerinin araştırılmasına olanak sağlamıştır. İnsanlarda hepatit yapan virüsler, bilinen semptomları yanında, kromozomlarda zarar yapıp yapmadıkları ve kromozomlarda zarar yapıyorlarsa bu zararın araştırılması çalışmamızın ana amacını teşkil etmektedir.

Araştırmamızda hasta, kontrol ve takip grubu olgularının hemen hepsinde kromozom veya kromozom grupları arasında SCE dağılımı yönünden homojenlik görülmüştür. Ayrıca kromozomların BrdU'ya olan duyarlılıkları arasında benzerlik tesbit edilmiştir. Bu bulgular daha önce yapılan çalışmalarla uyum içindedir (1,33,73).

Olgularımızın SCE hızları genellikle, 1,2,3,4-5 ve 6-12 gibi kromozom gruplarında yüksek, diğer kromozom gruplarında düşük saptanmıştır. Bu farklılığın kromozom uzunluğuyla doğru orantılı olduğu belirlenmiştir (44-46) (TABLO 1-6). Hasta, kontrol ve takip gruplarının tüm kromozomlarında saptanan, kromozom başına düşen ortalama SCE değeri bakımından farklılık ve benzerlik görülmüştür. Hasta grubu olgularında tesbit edilen SCE değeri  $9.53 \pm 0.12$ , kontrol grubu olgularında  $6.09 \pm 0.042$  ve takip grubu olgularında  $6.33 \pm 0.116$ 'dır. Hasta grubu olgularında tespit edilen ortalama SCE değeri, kontrol ve takip grubu olgularında elde edilen ortalama SCE değerleriyle karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu görülmektedir. Bu bulgu, bu konuda yapılmış daha önceki çalışmalarla uyum içindedir (38). Bu sonuçtan hepatit virüslerinin insan kromozomlarında kardeş kromatid değişikliklerini artış yönünde stimüle ettiğini söyleyebiliriz. Konu ile ilgili önceden yapılan çalışmalara ek olarak çalışmamızda, hastalık sırasında artan SCE'nin iyileşme döneminde durumunun ne olduğunu araştırdık. 49 hastanın tamamını izlemek istedik. Ancak iyileştikten sonra temas sağlayabildiğimiz 11

olguda çalışmamızı devam ettirdik. Bulduğumuz ortalama SCE sıklığı, hasta grubuna oranla düşük idi. Bu fark istatistiksel olarak önemli görülmüştür ( $P < 0.05$ ). Hasta grubu ortalama SCE değeri takip ve kontrol grubuna göre yüksektir. Takip grubu olgularında bulunan SCE değeri kontrol grubu olgularına göre biraz farklı görülmüş ise de istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $P > 0.05$ ). Bundan da iyileşme döneminde virüs etkisinin kalkması nedeniyle hücrelerde DNA tamir mekanizması sonucu DNA'nın onarıldığını göstermektedir. Sonuçlar (TABLO 7-12) görülmektedir.

Ortalama SCE artışında ya da azalışında cinsiyetin önemli bir faktör olup olmadığını araştırmak istedik. Bunun için her üç araştırma grubunu kendi içinde ayrı ayrı erkek ve dişi gruplara ayırdık. Gerekli tablolar düzenlendikten sonra her grubu kendi içinde erkekli ve dişili şekilde istatistiksel olarak karşılaştırdık. Hasta grubunda kızlarda görülen ortalama SCE değeri  $9.65 \pm 0.215$ , erkeklerde  $9.48 \pm 0.145$ 'tür. Bu iki ortalama arasında fark görünüyorsa da (TABLO 13) istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ( $P > 0.05$ ).

Kontrol grubunda kızlarda ortalama SCE değeri  $6.06 \pm 0.071$ , erkeklerde ise  $6.11 \pm 0.052$ 'dir. Bu farkta istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur (TABLO 13) ( $p > 0.05$ ).

Takip grubunda kızlarda ortalama SCE değeri  $6.31 \pm 0.108$  ve erkeklerde SCE değeri  $6.35 \pm 0.204$ 'dür (TABLO 13). Karşılaştırma yapıldığında farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu görülmüştür ( $P > 0.05$ ). Böylece cinsiyet etkisinin belirlenmesi yönündeki çalışmamızda cinsiyetin SCE değeri üzerinde bir etkisi olmadığını bulmuş olduk. Daha önceki çalışmalarda bu konuda SCE üzerindeki çalışmaların sonuçları birbirine uygun bulunmuştur. Gruplar arası bir farklılık görülmemiştir (5,16,51).

Tüm gruplardaki olguların her birinden 1000 adet hücre değerlendirilmiş ve bu hücrelerin kaç tanesinin mitoza (profaz, metafaz, anafaz ve telofaz) girdiği tespit edilmiştir. Bu hücrelerden mitoza girenlerin %'si mitotik indeksi olarak kabul edilmiştir (TABLO 14). Hasta grubu olgularında ortalama mitotik indeks 4.62, kontrol grubu olgularında 3.92 ve takip grubu



olgularında ise 3.82 dolayındadır. Hasta grubunda mitotik indeks; kontrol ve takip grubuna göre yüksek bulunmuştur. Bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $P < 0.05$ )(TABLO 16). Ancak takip grubu ile kontrol grubu olgularında mitotik index yönünden istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir ( $P > 0.05$ )(Tablo 17-18). Viral hastalıklarda sitogenetik çalışmalarla mitotik indeks çalışılmamıştır. Gerçekten virüs ökaryot hücrelerini penetre ettikten kısa bir zaman sonra onun DNA'sını kontrol altına alır ve bölünme siklusunu bozar. Bölünme siklusu artık konak hücrenin ihtiyacına göre değil, virüsün ihtiyacına göre yapılır. Böylece hücre bölünmesi hızlanır. Bizim bulduğumuz sonuca göre hepatit virüsleri hücrelerin mitoza girmesini stimüle etmektedir. Diğer bir deyimle hücre bölünmesi hızlanmaktadır.

Virütik hastalıkların daha önceki sitogenetik çalışmalarında replikasyon indexi üzerinde çalışma yapılmamıştır. Biz kendi çalışmamızda tüm gruplarda her bir olgudan mitoza giren ve metafaz safhasında olan 100 metafaz plağı üzerinde çalışma yaptık. FPG (Fluoresan Plus Giemsa) boyama sonuçlarına göre bir metafaz plağındaki tüm kromozom kromatidleri koyu renkli ise metafaz 1 ( $M_1$ ), Plaktaki her bir kromozomun bir kromatidi koyu, diğer kromatidi açık boyanmışsa buna metafaz 2 ( $M_2$ ), plaktaki kromozomların bir kısmı  $M_2$  kromozomlarına bir kısmı tamamen açık boyanmışsa böyle bir plak  $M_3$  olarak değerlendirilmiştir. SCE değerleri sadece  $M_2$ 'den alınmıştır. Bulgularımıza göre hasta grubu olgularında ortalama replikasyon indeksi 2,23, kontrol grubu olgularında 1.94 ve takip grubu olgularında 1.73 olarak bulunmuştur (TABLO 15). Hasta grubu olgularındaki replikasyon indeksi, kontrol ve takip grubu olgularında elde edilen replikasyon indeksi sonuçlarıyla karşılaştırıldığında farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ( $P < 0.05$ ). Kontrol grubu olgularında bulunan replikasyon indeksi takip grubu olgularındaki replikasyon indeksi ile karşılaştırıldığında ise farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur ( $P > 0.05$ ). Bu şu demektir. Aynı zaman süresi içinde ve aynı şartlarda kültüre alınan hücreler  $M_1$ ,  $M_2$  ve  $M_3$ 'e giriş süreleri farklı olmuştur. Hasta grubu olgularında  $M_3$ 'e girme zamanı oldukça kısa yani bölünme süreleri, diğer grup olgularına göre daha kısadır. Nitekim de virütik hastalıklar bir enfeksiyon hastalığıdır.



Enfeksiyon sırasında lenfosit hücrelerinin sayısı artar. Bizim bulgularımız bu sonucu tamamen desteklemektedir. Diğer bir söyleyiş ile, M<sub>1</sub>'den M<sub>2</sub>'ye ve M<sub>2</sub>'den M<sub>3</sub>'e geçiş süresi kısadır. Kısaca, generasyon süresi virütik hastalıklı lenfositlerde azalır. Bundan dolayı lenfosit sayısı artmış olur.

Üç grubun olguları arasında görülen ortalama SCE değerlerine yaşın etkili olup olmadığı ayrı bir bakış açısidir. Bu durum araştırılırken her grup kendi içinde 0-3, 4-7, 8-11 yaş gruplarına ayrılmış ve bu gruplardaki ortalama SCE değerleri tespit edilmiştir. Hasta grubunda;0-3 yaş grubunda ortalama SCE değeri 9.57, 4-7 yaş grubunda;9.48, 8-11 yaş grubunda;9.58'tir. Yaş grupları arasında karşılaştırma yapıldığında sonucun istatistiksel olarak anlamsız olduğu bulunmuştur (P>0.05).

Kontrol grubunda;0-3 yaş arası kişilerde ortalama SCE değeri 6.26, 4-7 yaş grubunda 6.02 ve 8-11 yaş grubunda 6.09'dur. Karşılaştırma sonucu farkın istatistiksel olarak anlamsız olduğu görülmüştür (P>0.05).

Takip grubunda;0-3 yaş arası bireylerde ortalama SCE değeri 6.18,4-7 yaş arası bireylerde 6.35 ve 8-11 yaş arası bireylerde 6.64'tür. Burada da farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur(P>0.05). Sonuç olarak yaşın ortalama SCE değerine etkisi görülememiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda tek yönlü sonuç elde edilememiştir. Daha önceki çalışmalardan bir tanesi, 26-35 yaş grubunda oluşan kişilerle (yetişkin) yeni doğanlar grubu üzerinde yapılmış ve SCE'de farklılık görülmemiştir (25). Başka bir çalışmada 85 yaşlarında olan bireylerle yeni doğanları kapsayan bir araştırmadır. Burada da yaşın SCE değerini etkilemediği bulunmuştur (51). Ayrıca Schneider ve ark. (1979) benzer bir bulgu elde etmişlerdir (66). Bizim bulgularımız bu araştırmacıların bulgularıyla eş güdüm içindedir. Ancak bizim çalışma gruplarımızın tamamı 0-12 yaş arası çocuklardan oluşmaktadır. Bir farkın olması biraz zordur. Funes-Craviota ve ark. (1977) çocuklardan oluşan bir kontrol grubu (ortalama yaş 2.4), yetişkinlerden oluşan bir kontrol grubundan (ort. yaş 23,5) daha düşük SCE gösterdiğini bulmuşlardır (20). Ayrıca Ardito ve ark. (1980) bebeklerin annelerinden daha düşük bir SCE değeri verdiklerini ifade etmişlerdir (7). Bizim sonuçlarımız 7 ve 20

nolu çalışma sonuçlarına uyum göstermemektedir. Yaşın SCE sıklığına etkisi tam olarak kanıtlanmamış olmasına rağmen kişiye ait bünyesel faktörlerle çevreye ait çevresel faktörlerin bu konuda etkin olduğunu söyleyebiliriz.

## H-ÖZET VE SONUÇLAR

Araştırmamızda 49 Hepatitli hasta ve 11 takip olgusunda viral hepatitin kromozomlara etkisi SCE testi ile araştırıldı. Bu gruplardan alınan ortalama SCE değerleri 39 çocuktan oluşan kontrol grubu ile karşılaştırılarak değerlendirildi.

Tüm gruplardaki olgularda toplam 113850 kromozom sayıldı. Hasta grubu, kontrol grubu ve takip grubu olguları SCE sıklıklarını yönünden karşılaştırıldı ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

1. Bütün bu olgularda SCE sıklığı kromozomların büyüklüğü ile doğru orantılı olarak, arttığı gözlemlendi. Özellikle A,B,C grubu kromozomlarda diğerlerine oranla yüksek SCE bulundu.
2. Hasta grubunda 1225 metafaz plağı araştırılarak metafaz başına düşen ortalama SCE değeri  $9.53 \pm 0.120$  olarak saptandı.
3. Kontrol grubunda toplam 975 metafaz plağı incelenerek metafaz başına düşen ortalama SCE değeri  $6.09 \pm 0.42$  olarak bulundu.
4. Takip grubunda toplam 275 metafaz plağı incelenerek metafaz başına düşen ortalama SCE değeri  $6.33 \pm 0.116$  olarak belirlendi.
5. Hasta grubu ortalama SCE değeri ile kontrol grubu ortalama SCE değeri karşılaştırıldığında farkın önemli olduğu bulundu ( $P < 0.05$ ).
6. Hasta grubu ortalama SCE değeri ile takip grubu ortalama SCE değerleri yönünden karşılaştırıldığında farkın önemli olduğu görüldü ( $P < 0.05$ ).
7. Kontrol grubu ortalama SCE değerleri ile takip grubu ortalama SCE değerleri yönünden karşılaştırıldığında farkın önemsiz olduğu saptandı ( $P > 0.05$ ).
8. Cinsiyetin SCE sıklığına etki etmediği tesbit edildi.
9. Yaşın SCE sıklığına etki etmediği bulundu.
10. Mitotik ve Replikasyon indexin hasta grubunda yüksek oysaki kontrol ve takip grubunda düşük olduğu saptandı. Kontrol ile takip grubu arasında fark görülmedi.
11. Hastada yükselen SCE, iyileşme döneminde onarım mekanizmasının çalışmasıyla düştü.

## I-SUMMARY

In this study, we have attempted to evaluate the effects of hepatitis viruses on SCE. The SCE technique has been studied for the effect of industrial agents and for the appearance of genetical diseases and some viral infections. The ability of viral diseases to induce sister chromatid exchanges (SCEs) in vitro was studied by three different age groups between 1 to 12.

This study covers 99 individuals divided into three groups. In the first group, we had 49 patients with hepatitis viruses, 11 post-illness individuals in second group and 39 healthy people in third group. In addition, the activity of viruses (viral hepatitis) was studied on both group 1 and 2 to determine the effect on the cycle of T lymphocytes and SCE. It was found that the control and post-illness groups of individuals had a lower SCE rate than the first group of patient. The mean rates of SCE for the patient group was  $9.53 \pm 0.12$  and for post-illness group was  $6.33 \pm 0.105$  and for control group was  $6.08 \pm 0.042$ . We observed no difference in SCE, mitotic index and replication index between the control and post-illness groups. This study has also shown that there was no effect of sex and age on SCE.

Present results were in accordance with the results obtained with known mutagens, carcinogens and viruses. It was once more shown that SCE study can be used as a potent and sensitive study in assessing mutagenity and carcinogenity.

## İ-KAYNAKLAR

- 1- Acar, A., Bağcı G., Lüleci G.: Sitogenetik Uygulama Yöntemleri, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Cilt III Sayı 2-3, 1986.
- 2- Allen JW., Latt SA.: in vivo BrdU-33258 Hoechst analysis of DNA replication kinetics and sister chromatid exchange formations in mouse somatic and meiotic cells. Chromosoma 58:325, 1976.
- 3- Allen, JW., Shuler CF., Mendes RW., Latt SA.: A simplified technique for in vivo analysis of sister chromatid exchanges using 5-bromodeoxyuridine tablets. Cytogenet Cell Genet 18:231, 1977.
- 4- Allen JW., Shuler CF., and Latt SA.: BrdU tablet methodology for in vivo studies of DNA synthesis. Somat cell Genet 4: 393-405, 1978.
- 5- Alhadeff B., Cohen MM.: Frequency and distribution of sister chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes. Israel.J.Med. Sci 12:1440,1976.
- 6- Arce MA,: The effect of donor sex and age on the number of sister chromatid exchanges in human lymphocytes, growing in vitro. Human Gen 57(1): 83, 1981.
- 7- Ardito G., Lamberti L., Ansaldi, E., Ponzetto P.: Sister chromatid exchanges in cigarette smoking human females and their newborns. Mutat Res 78:209. 1980.
- 8- Babu A., Verma RS.: Chromosoma structure euchromatin and heterochromatin. International Review of cytology vol 108 (1-60),1987.
- 9- Başaran N.: Tıbbi Genetik, bilim teknik yayınevi, 1985.
- 10- Bianchi NO., Bianchi MS., Larramendy M.: Kinetics of human lymphocyte division and chromosomal radiosensitivity. Mutant Res 63: 317, 1979,
- 11- Bloom SE., Hsu TC.: Differential fluorescence of sister chromatids in chicken embryos exposed to 5-bromodeoxyuridine. Chromosoma 51:261-267,1977.
- 12- Bradley MO., Sharkey NA.: Mutagenicity and toxicity of visible fluorescent light to cultured mammalian cells. Nature 266:724, 1977.
- 13- Brewen JG., Peacock WJ.: The effect of tritiated thymidine on sister chromatid exchange in a ring chromosome. Mutat Res 7:433, 1969.

- 14-Brown RL., and Crossen PE : Increased incidence of sister chromatid exchanges in Rauscher Leukemia virus infected mouse embryo fibroblasts. *Exp Cell Res* 103:418-420,1976.
- 15-Crossen PE., Morgan WF., Horan JJ., Stewart J.: Cytogenetic studies of pesticide and herbicide sprayers. *NZ Med J* 88:192,1978.
- 16-Crossen PE., Drets ME., Arrighi FE., Johnston DA.: Analysis of the frequency and distribution of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Hum Genet* 35:345,1977.
- 17-Davidson RL., Kaufman ER., Dougherty CP., Ouellette AM., DiFolco CM., Latt SA.: Induction of sister chromatid exchanges by BrdU is largely independent of the BrdU content of the DNA, *Nature* 284: 74, 1980.
- 18-Dutrillaux B., Fosse AM., Prieur M., LeJeune J.: Analysis des échanges de chromatides dans les cellules somatiques humaines *Chromosoma* 48:327,1974.
- 19-Dutrillaux B., Fosse AM., Prieur M., LeJeune J.: Analysis des échanges de chromatides dans les cellules somatiques humaines traitement au BrdU (5-bromododeoxyuridine) et fluorescence bicolor par l'acridine orange. *Chromosoma* 48:327,1974.
- 20-Funes-Cravioto F., Zapata-Gayon C., Kilmodin-Hedman B., Lambert B., Linsten J., Norberg E., Nordenskjold M., Olin R., Swensson A.: Chromosome aberrations and sister chromatid exchange in workers in chemical laboratories and a rototyping factory and in children of women laboratory workers, *Lancet* II: 322, 1977.
- 21-Furukawa M., Sirianni SR., Tan JC., Huang CC.: Sister chromatid exchanges and growth inhibition by the flame retardant Tris (2,3 dibromopropyl phosphate) in Chinese hamster cells, *J. Nat. Canc. Inst.* 60:1179-1181, 1978.
- 22-Galloway SM.: Ataxia telangiectasia : The effects of chemical mutagens and X-rays on sister chromatid exchanges in blood lymphocytes. *Mutat Res* 45:343, 1977,
- 23-German J.: Genes which increase chromosomal instability in somatic cells and predispose to cancer. *Prog. Med. Genet* 8:61-101, 1972.
- 24-German J., Schonberg S., Loue E., and Chaganti RSK.: Blooms's syndrome IV sister chromatid exchanges in lymphocytes. *Am. J. Hum Genet* 29: 248-255, 1977.

- 25-Galloway SM., Evans HJ.: Sister chromatid exchange in human chromosomes from normal individuals and patients with ataxia telangiectasia. *Cytogenet Cell Genet* 15:17,1975.
- 26-Gosh PK., Nand R.: Reduced frequencies of sister chromatid exchanges in human lymphocytes cultured in autologous serum. *Hum Genet* 51:167, 1979.
- 27-Greaves M., Jannossy G., Doenhoff M.: Selective triggering of human T and B lymphocytes in vitro by polyclonal Mitogen. *J. Exp. Med* 140:1, 1974.
- 28-Henderson PT., and Kersten KJ.: Metabolism of drugs during rat liver regeneration. *Biochem. Pharmacol* 19:2343-2351, 1970.
- 29-Huang CC.: Induction of a high incidence of damage to the X chromosomes of *Rattus (Mastomys) natalensis* by base analogues viruses and carcinogens. *Chromosoma* 23:162, 1967.
- 30-Hsu TC., and Pathak S.: Differential rates of sister chromatid exchanges between euchromatin and heterochromatin chromosoma 58:269-273,1976
- 31-Ikushima T.,Wolff S.: Sister chromatid exchanges induced by light flashes to 5-bromodeoxyuridine and 5-iododeoxyruridine substituted Chinese hamster chromosomes. *Exp. Cell. Res.* 87:15,1974
- 32-Jian-Bin L., Bao-Xiang O.: An improved method for the analysis of SCE in vivo. *Mutation. Research* 144:243-245,1985.
- 33-Jonasson JA.: Analysis and interpretation of human chromosoma preparations. Roonay DE., Czepulkowski BH., (Ed) *Human Cytogenetics*. Oir press Oxford-Washington DC.,1986
- 34-Kato H.: Spontaneous sister chromatid exchanges detected by BrdU-labelling method. *Nature* 251:70,1974.
- 35-Kato H., and Sandberg AA.: Effects of herpes simplex virus on sister chromatid exchange and chromosome abnormalities in human diploid fibroblasts. *Exp. Cell. Res.* 109:423-427, 1977.
- 36-Kihlman BA.,Kronberg D.: Sister chromatid exchanges in *Vicia faba*. I. Demonstration by a modified fluorescence plus Giemsa (FPG) technique. *Chromosoma* 51:1,1975.
- 37-Knuutila S., Maki-Paakkanen J., Kahkonen M., and Hookanen G.: An increased frequency of chromosomal changes and SCEs in cultured blood lymphocytes of 12 subjects vaccinated against smallpox. *Hum. Genet* 41:89-96, 1978.



- 38-Kurvink K., Bloomfield CD., and Cervenka J.: Sister chromatid exchange in patients with viral disease. *Exp. Cell. Res.* 113:450, 1978.
- 39-Lambert B., Linblad A., Nordenskjold M., Werellus B.: Increased frequency of sister chromatid exchanges in cigarette smokers. *Hereditas* 88:147,1978.
- 40-Latt SA., George YS., and Gray JW.: Flow cytometric analysis of BrdU-substituted cells stained with 33258 Hoechst. *J. Histochem. Cytochem* 25:927-934, 1977.
- 41-Lambert B., Hansson K., Lindsen J., Sten M., and Werellus B.: BrdU-induced sister chromatid exchanges in human lymphocytes. *Hereditas* 83:163-174,1976.
- 42-Latt SA., Stetten G., Juergens LA., Buchanan GR., and Gerald PS.: Induction by alkylating agents of sister chromatid exchanges and chromatid breaks in Fanconi's anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:4066, 1975.
- 43-La Cour LF., Pelc SR.: Effect of colchicine on the utilization of labelled thymidine during chromosomal reproduction. *Nature* 182: 506, 1958.
- 44-Lin MS., Comings DE., and Alfi OS.: Optical studies of the interaction of 4'-6-diamidino-2-phenylindole with DNA and metaphase chromosomes. *Chromosoma* 60:15-25,1977.
- 45-Latt SA.: Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:3395-3399, 1973.
- 46-Lin MS., and Alfi OS.: Detection of sister chromatid exchanges by 4'-6-diamidino-2-phenylindole fluorescence. *Chromosoma* 57:219-225,1976.
- 47-Lavappa KS., and Yerganian G.: Spermatogonial and meiotic chromosomes of the Armenian hamster *Cricetulus migratius*. *Exp. Cell. Res.* 61:159-172, 1970.
- 48-Mazrimas JA., Stetka DG.: Direct evidence for the role of incorporated BrdU in the induction of sister chromatid exchanges, *Exp Cell Res* 117:23, 1978.
- 49-McClintock B.: The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes. *Genetics* 23:315,1938.
- 50-McGhee JD., Felsenfeld G.: Nucleosome structure. *Annu. Rev. Biochem* 49:1115,1980.

- 51-Morgan WF., and Crossen PE.: The incidence of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.* 42:305, 1977.
- 52-Morgan WF., Crossen PE.: Factors influencing sister chromatid exchange rate in cultured human lymphocytes. *Mutat. Res.* 81:395, 1981.
- 53-Murthy PBK.: Frequency of sister chromatid exchanges in cigarette smokers. *Hum. Genet.* 52:343, 1979.
- 54-Murthy PBK., Prema K.: Sister chromatid exchanges in oral contraceptive users. *Mutat Res* 68:149, 1979.
- 55-Mukilova J., Michalova K., Urban J.: Sister chromatid exchanges and chromosomal breakage in patients treated with cytostatics. *Mutat Res.* 67:289, 1979.
- 56-Mutchinick O., Ruz L., Casas L.: Time of first generation metaphases I. The effect of various culture media and of fetal calf serum in human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 72:127, 1980
- 57-Nichols WW., Bradt CI., Toji LH., Godley M., and Sagawa M.: Induction of sister chromatid exchanges by transformation with simian virus 40. *Cancer Res.* 38:906-964, 1978.
- 58-Nilsson K., and Ponten J.: Clasification and biological nature of established human hematopoietic cell lines. *Int. J. Cancer* 15:321-341, 1975.
- 59-Obe G., Beek B., Dudin G.: The human leukocyte test system. V. DNA synthesis and mitosis in PHA-stimulated 3-day cultures. *Human Genetic* 28:295, 1975.
- 60-Perry P., Evans HJ.: Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature Vol.* 258: 121-124, 1975.
- 61-Perry P., Wolff S.: New Giemsa method for differential staining of sister chromatids. *Nature* 261: 156, 1974.
- 62-Raposa T.: Sister chromatid exchange studies for monitoring DNA damage and repair capacity after cytostatics in vitro and lymphocytes of leukaemic patients under cytostatic therapy. *Mutat Res.* 57:241, 1978.
- 63-Santesson B., Lindahl-Kiessling K., Mattsson A.: SCE in B and T lymphocytes. Possible implications for Bloom's syndrome. *Clin Genet* 16: 133, 1979.



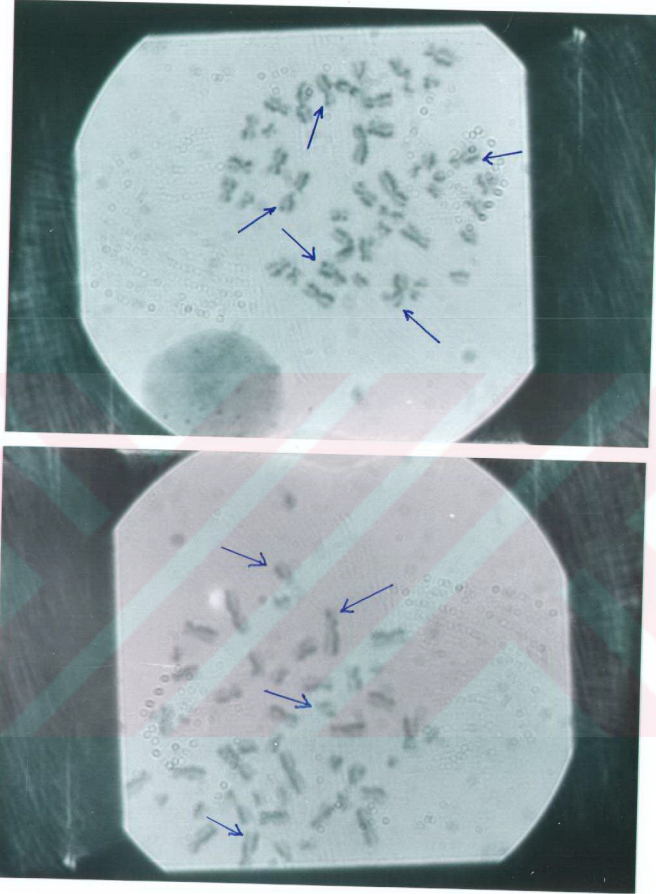
- 64-Shiraishi Y., Weinfeld H., Minowada J., Sandberg AA.:  
Dependency of sister chromatid exchange in T-and B-cells on  
the incorporation of deoxyribonucleosides in to chromosomal  
DNA. J. Natl Cancer inst 57:1217, 1976.
- 65-Stetka DG., Minkler J., and Carrano AV.: Induction of long-  
lived chromosome damage as manifested by sister  
chromatid exchange in lymphocytes of animal exposed to  
mitomycin C. Mutat. Res 51:383-396, 1978.
- 66-Schneider EL., Kram D., Nakanishi Y., Monticone RE., Tice RR.,  
Gilman GA, Nieder ML.: The effect of aging on sister chromatid  
exchange. Mech Ageing Dev. 9:303, 1979.
- 67-Stoien JD., Wang RJ.: Effect of near ultraviolet and visible  
light on mammalian cells in culture. II. Formation of toxic  
photoproducts in tissue culture medium by black light. Proc.  
Natl Acad Sci. USA 71:3961, 1974.
- 68-Taylor JH., Woods PS., Hughes WL.: The organization and  
duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic  
studies using tritium-labelled thymidine. Proc. Natl.  
Acad. Sci. USA 43:122, 1957.
- 69-Taylor JH.: Sister chromatid exchanges in tritium labelled  
chromosomes. Genetics 43:515, 1958.
- 70-Tohoda H., Horaguichi K., Takahashi K., Oikava A.,: Matsushima  
T.: Epstein-Barr virüs transformed human lymphoblastoid cells  
for study of sister chromatid exchange and their evaluation as  
a test system. Cancer Res 40:4775, 1980.
- 71-Vogel W., Bauknecht T.: Differential chromatid staining by in  
vivo treatment as a mutagenicity test system. Nature 260:448,  
1976.
- 72-Wang RJ.: Lethal effect of "daylight" fluorescent light on  
human cells in tissue culture medium. Photochem Photobiol.  
21:372, 1975.
- 73-Wolff S.: Sister chromatid exchange. Annual Review of Genetics  
11:183-201, 1977.
- 74-Wolff S., Bodycote J., Thomas GH., and Cleaver JE.: Sister  
chromatid exchanges in xeroderma pigmentosum cell that are  
defective in DNA excision repair or postreplication Genetics  
81:349-355, 1975.
- 75-Zakharov AF., and Egolina NA.: Differential spiralization along  
mammalian mitotic chromosomes. I. BrdU revealed differentiates  
in Chinese hamster chromosomes. Chromosoma 38:341, 1972.

## J- ÖZGEÇMİŞ

1960 yılında Hatay iline bağlı Altınözü ilçesinde doğdum. İlk öğrenimimi köyde, Ortaokulu ise Altınözü ilçesinde tamamladım. Lise öğrenimimi Antakya'da tamamladıktan sonra 1979 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalına kaydoldum. 1984 yılında bu bölümden mezun oldum. 1985 yılında Öğretmenliğe başladım. Türkiye'nin değişik yerlerinde Biyoloji Öğretmenliği yaptım. Şu anda Adana İl Çevre Müdürlüğünde Biyolog olarak çalışmaktayım.

Evli ve iki çocuk babasıyım.

K-FOTOGRAFLAR



Metafaz plağında SCE. SCE'nin daha çok uzun kromozomlarda olduğuna dikkat ediniz. Olympus (10x100)