

13272

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KARDEŞ KROMATİD DEĞİŞİMİ
(SCE)**

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Tez Yöneticisi Doç.Dr.AYŞE DOĞAN
NİLGÜN TANRIVERDİ

ADANA-1991

İÇİNDEKİLER

KONU	SAYFA
Şekil Listesi	1
Resim Listesi.....	1
Öz.....	2
Abstract.....	2
Giriş.....	3
Önceki Çalışmalar.....	5
1. Tarihçe.....	5
2. DNA ve Kromozomların Oluşumu.....	6
2.1. Gen.....	6
2.2. DNA'nın Kromozomları Oluşturması.....	7
2.2.1. Kromozomların Sınıflandırılması.....	8
2.2.2. Temel Sınıflama.....	9
2.2.3. Bantlama Yöntemleri.....	10
2.2.3.1. Q Bantlama.....	10
2.2.3.2. Giemza Bantlama.....	11
2.2.3.3. Yapısal Heterokromatin Bantlama.....	12
2.2.3.4. Revers Bantlama.....	12
2.2.4. Mutasyonlar.....	13
2.2.4.1. Mutasyonların Sınıflandırılması.....	13
2.2.4.1.1. Kendiliğinden Oluşan Mutasyonlar.....	13
2.2.4.1.2. İndükleyici Mutasyonlar.....	16
2.2.4.2. DNA Onarım Yolları.....	20
2.2.4.2.1. DNA'da Replikasyon Sonrası Onarım Modeli....	21
2.2.5. Kromozom Analizi İçin Gerekli Faktörler.....	22
2.2.5.1. Mitojenler.....	22
2.2.5.2. Kültür Koşulları.....	23
2.2.5.3. Kromozom Preparatlarında Hasat Yöntemleri.....	24
2.2.5.3.1. Mekik İnhibitörleri.....	24
2.2.5.3.2. Hipotonik Çözelti.....	24
2.2.5.3.3. Fiksasyon.....	24

2.2.5.3.4. Lam Hazırlanması ve Boyama.....	25
2.3. Kardeş Kromatid Değişimi (SCE).....	25
2.3.1. Hücre Gelişim Kinetiği ve Hızının Değerlendirilmesinde SCE	25
2.3.2. Kromozomlarda SCE Dağılımı.....	27
2.3.3. İn Vivo Çalışmalarda SCE.....	28
2.3.4. Spontan SCE Düzeyi.....	28
2.3.5. Yaş ve Cinsiyetin Etkisi.....	29
2.3.6. İnsan Genetik Hastalıklarında SCE.....	30
2.3.7. Mutajenik Karsinojen İndikatörlerle Oluşan SCE..	30
2.3.8. UV ile İndüklenen Mutasyonlar ve DNA Onarımı....	31
2.3.9. SCE Formasyonundan Sorumlu Lezyonlar.....	32
2.3.10. Lösemi Lenfoması ve SCE.....	34
Gereç ve Yöntem	35
3.1. Denek Grubu.....	35
3.2. Gereç ve Yöntem.....	35
3.2.1. Kromozom Çalışmalarında Uyulan Kurallar.....	35
3.2.2. Periferik Kan İle Kromozom Çalışma Yöntemi.....	36
3.2.3. SCE Çalışma Yöntemi.....	37
3.2.4. Kullanılan Solüsyonlar.....	37
3.2.5. Giemza Bantlama.....	39
3.2.6. Preparatların Hazırlanması ve Değerlendirilme- sinde Kullanılan Araçlar.....	40
Bulgular.....	41
Tartışma.....	46
Sonuç.....	53
Özet.....	54
Yabancı Dilde Özet.....	55
Kaynaklar.....	56
Fotograflar.....	62
Özgeçmişim.....	68

ŞEKİL LİSTESİ

	SAYFA
Şekil 1. Sentromerin Yerine Göre Kromozom Şekilleri.....	9
Şekil 2. Tautomerik Mutasyonlar: Adenin-Adenin Adenin-Sitozin Arasında Gözlenenler	14
Şekil 3. Metilasyon Tipi Mutasyon.....	15
Şekil 4. A.T—> G.C Tipi Transisyon Mutasyonu.....	17
Şekil 5. a) G.C—> A.T Arasında 5 BrdU'nun Ender Formunda Gözlenen Transisyon Mutasyonu..... b) A.T—> G.C Arasında 5 BrdU Varlığında Gözlenen Transisyon Mutasyonu.....	17
Şekil 6. 5-BrdU ile Gözlenen Mutasyon	18
Şekil 7. DNA Onarım Mekanizmaları Arasındaki İlişkiler	22
Şekil 8. Kromozomlarda SCE Lokalizasyonu.....	27

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Farklı kromozomlarda replikasyon dönemlerinin farklı olması.....	62
Resim 2. İnaktif X kromozomu.....	62
Resim 3. Erişkin grupta, büyük kromozomlarda SCE/hücre sayısının fazla olması.....	63
Resim 4. Büyük gruba ait bir SCE fotoğrafı.....	63
Resim 5. Lab. çalışanlarına ait SCE fotoğrafı.....	64
Resim 6. Lab. çalışmayan personele ait SCE fotoğrafı....	64
Resim 7. Lab. çalışmayan personele ait SCE fotoğrafı....	65
Resim 8. Çocuk grubuna ait SCE fotoğrafı.....	65
Resim 9. Giemza bantlama	66
Resim 10. Giemza bantlama	66

ÖZ

Kardeş kromatid değişimi (SCE), kromozomlarda özdeş segmentlerin simetrik değişimi olup genelde mutajenlerin etkisini gözlemek amacıyla uygulanan bir yöntemdir.

Bu çalışmamızda SCE yöntemi kurularak daha sonra bu konudaki araştırmalara temel oluşturması için spontan SCE/hücre değeri ile, yaşın bu orana etkisi saptanmıştır.

ABSTRACT

Sister chromatid exchange (SCE), which is the symmetrical exchange of identical segments of chromosomes, is generally used to observe the mutagenic effects.

In our study, we established and developed the SCE method in our laboratory; in order to improve the background of our further studies about this subject, we determined the spontaneous SCE/cell values and also the effect of age on this number.

GİRİŞ

Kardeş kromatid değişimi (SCE), kardeş kromatidler arasında özdeş segmentlerin simetrik değişimidir (5,29,48). Bu olay kromozom morfolojisinin tümüyle değişmesi demek değildir. Fiziksel yada kimyasal etkenlerin DNA'da oluşturduğu hasarların çoğu replikasyon sırasında onarılır. Fakat bazen onarım hataları gözlenebilir. Bu durumda kromozom aberasyonları ve SCE 'ler oluşabilir yada sayıca artabilir (1,29).

Mutajen ve karsinojenlerin gerek in vivo gerekse in vitro ortamda DNA da oluşturacağı harabiyetin analizinde kullanılabilen en yaygın metod SCE'dir (19,29,48). SCE analiz yönteminde, tek bir kromozomun iki ayrı kromatidi farklı boyandığından DNA'daki bozukluğun boyutunu daha kesin bir şekilde inceleme olanağı verir (19).

Memeli kromozomlarının farklı bölgeleri farklı hızda replike olduğu otoradyografi yöntemi ile yıllardır bilinmektedir. SCE konusunda ilk çalışan araştırmacı 1958'de Taylor olmuştur (19,27,35,36). Taylor ³H timidin varlığında otoradyografi yöntemini kullanarak ilk kez SCE'i gösterdi. Daha sonra, araştırmacılar 5-Bromodeoksi üridin'li (BrdU) ortamda kromozomlardaki replikasyon rezolüsyonunun daha da arttığını gösterdiler (19,35,36,48). BrdU, DNA'da timin bazının bir analogu olup DNA'ya Adenin-Timin baz çifti düzeyinde bağlanır.

Kromozom boyunca gözlenen resiprokal değişimler, DNA bozukluğunu gösteren duyarlı bir ölçüttür (19). Özellikle, zincirler arasında karşılıklı birleşme yapan kimyasal ajanların verilmesi ile oluşan SCE sıklığı ile DNA'nın bunu tamiri arasındaki ilişki bu yöntemle gösterilmiştir. SCE analizi DNA bozukluğunu ve onarım işlevlerini kromozomal seviyesinde gösterebilen bir testtir (19,46).

Vücuttaki total DNA'nın %1'inden daha azında oluşacak bir kayıp bile SCE analizi ile kolayca gösterilebilir (19).

Doğa çeşitli kimyasal maddeler, tarım ilaçları insektisitler, nükleer denemelerin etkisi ile gün geçtikçe daha da kirlenmektedir. Özellikle tarım ilaçlarının yaygın kullanıldığı Çukurova Bölgesinde bu maddelerin insanların DNA'sında oluşturacağı hasarı gözlemek için SCE kullanılabilir bir yöntemdir. Meslek hastalıklarında ve DNA onarım defekti olan hastalarda DNA defektinin saptanmasında da SCE kullanılabilir.

Bu çalışmadaki amacımız laboratuvarımızda SCE yönteminin kurulması ve bu konuda daha sonra yapılacak çalışmalara temel oluşturması için normalde gözlenen SCE oranının saptanmasıdır. Ayrıca yaşa bağlı olarak bu oranda ne tür bir değişim gözlemlendiği ve çalışma koşullarından ne ölçüde etkilendiği de araştırılmaya çalışıldı.

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

1. TARİHÇE

Kardeş kromatid değişimi (SCE) alanında ilk çalışan araştırmacı Taylor olmuştur. Taylor 1958 yılında otoradyografi yöntemini kullanarak ³H- timidin varlığında memeli kromozomlarının farklı bölgelerinin farklı hızda replike olduğunu göstermiştir (27,35,36,45).

Taylor'dan sonra ki araştırmacılar (Zakharov ve Egoline (1973), Latt (1973), Ikushima ve Wolff (1974), Perry (1974), Korenberg ve arkadaşları (1974)) farklı replikasyon rezolüsyonunu daha da artırmaya çalıştılar (13). Çin hamster hücre kültürüne de

2. replikasyon döneminde 5-Bromo deoksiürüdin (5-BrdU) ilave eden Zakharov ve Egoline (1973) elde ettikleri preparatları giemza ile boyayarak iki kardeş kromatidinin farklı boyandığını gösterdiler (48). Replikasyon sırasında timin yerine BrdU girdiğinde, o kromatid parlak boyanırken diğeri (kardeş kromatidi) daha koyu boyanmaktadır. Kardeş kromatidler arasındaki rezolüsyon farkının, BrdU kullanıldığında otoradyografi yöntemiyle elde edilenden daha fazla olduğu gözlenmiştir. (35,36,48).

SCE alanında çalışan diğer bir araştırmacı olan Latt (1973) insan hücreleri ile çalışıp hazırladığı preparatları bir floresan boya olan bisbenzimidazol (Hoechst 33258) kullanarak boyamış ve preparatlarda SCE'lerdeki rezolüsyonun daha da arttığını göstererek insan kromozomları için floresan tekniğini tanımlamıştır (6,8,26,48). Bu boya deoksi adenin-deoksi timin (dA-dT) baz çiftine bağlandığında şiddetli floresan verirken, dA-BrdU çiftine bağlandığında boyanın floresanı zayıflamaktaydı. Hoechst 33258 ile boyanmayı takiben BrdU varlığında oluşan iki replikasyon döneminden sonra ünifiların yerini alan kromatidler bifilarli olanlardan daha parlaktı (48). Bu yöntemin dezavantajının elde edilen SCE'lerdeki

floresan ışımlarının çabuk sönmesi olduğunu düşünmüşlerdir. Farklı işaretlenen kromatidlerin giemza ile boyanmasıyla kalıcı preparatlar elde edildi (6).

Ikushima ve Wolf (1974) Çin hamster hücreleri ile yaptıkları çalışmada timidin analogu olan BrdU yerine iyododeoksi üridin kullanarak akridin orange ve diğer bir floresan boya olan 4-6 diamidin-2-fenilin ile boyayarak floresan-puls-giemza (FPG) tekniğini geliştirdiler (28,35,36,48). Korenberg ve arkadaşları (1974), yüksek ısıda tuzlarla muamele ettikleri preparatları tekrar giemza ile boyayarak yine SCE elde etmişlerdir (6).

BrdU'ü DNA heliksinin her iki zincirine dahil eden kromatid donuk floresan verirken giemza ile zayıf boyanmış, oysa BrdU'ü sadece bir zincire dahil eden kromatid parlak floresan verirken giemza ile koyu boyanmıştır (8).

Latt, iki kromatid arasındaki farkın DNA'nın 1. yada 2. zincirine dahil olan BrdU floresanının farklı sönmesinden kaynaklandığını öne sürmüştür (19). Ancak Ikushima ve Wolf, BrdU içeren kromatidlere protein bağlanmasındaki farklılıkların giemza ile farklı boyanmanın nedeni olduğunu ifade etmişlerdir (48).

Işık, β -merkaptetanol ve ditiotneidol gibi kimyasal ajanlar proteindeki disülfid bağlarını kopartabildiği, giemza ile boyanmadan önce, bu kimyasallarla hücrelerin inkübasyonunun kardeş kromatidlerin farklı boyanmasına yol açtığı ileri sürülmüştür (36,48).

2. DNA ve KROMOZOMLARIN OLUŞUMU

2.1. Gen.

Bir kuşaktan diğerine aktarılan kalıtsal bilgilere gen denir. Fonksiyonel olarak gen, özgül bir polipeptid zincirinin amino asit sırasını belirleyen nükleotidler dizisidir. Genler DNA sarmalı boyunca sıralanmıştır. DNA, protein matriksle birleşerek nükleoprotein biçimini alır. Hücre çekirdeğinde kendine özgü bir boyama şekli kazanan bu yapılara kromozom denir (3,4,14,40,42).

2.2. DNA'nın Kromozomları Oluşturması.

Dinlenme evresinde hücre çekirdeğinde bulunan genetik maddeye **kromatin** denir. Kromatin yada kromozomların kimyasal analizleri yapıldığında DNA, protein ve az bir miktarda RNA'dan oluştuğu gözlenir. Kromatin yapısında bulunan bu proteinler iki büyük grupta toplanırlar (2,4,40).

1. Histon tipi proteinler (bazik proteinler)
2. Histon olmayan kromozomal proteinler (asidik)

Yüksek yapılı ökaryot organizmalarda ne kadar DNA varsa o kadarda histon tipi protein vardır. Histonlar 5 grubu ayrılır: H1, H2a, H2b, H3, H4. Yüksek yapılı bitki ve hayvanlarda genelde dördü bulunurken spermiumda 5 histon grubu yerine bazik bir protein olan protaminler yer alır.

Histon tipi proteinler DNA molekülü ile özel biçimde birleşerek nükleozomları oluşturur. Boncuk benzeri bu yapılar kromatinin alt birimleridir. Elektron mikroskobu çalışmalarıyla, kromatinin birbirine ince ipliklerle bağlanmış düzgün kenarlı bir dizi boncuk şeklindeki alt birimlerden oluştuğu gözlenir.

Nükleozomlar, histon molekülünün çevresini yaklaşık 140 nükleotid içeren DNA çift sarmalının çevirmesiyle oluşmaktadır. Nükleozomları birbirine bağlayan iplikler ya da bağlayıcılar, hücre tipine göre 15-100 nükleotid çifti uzunluğundadır. Bağlayıcı kesimler, nükleozomları birbirinden koparan nükleaz enzimlerinin etkisi altındadır (2).

İnsan kromozomlarının her birisi bir DNA çift sarmalından oluşur. Ancak DNA molekülü aşırı düzeyde kangallaşarak metrelerce uzunluk mikronlara kadar iner. Bu küçülme yada kangallaşma olgusu birden bire olmamaktadır; 4 evreyi kapsar. İlk evrede DNA molekülü çift sarmal durumunu alır yada kendini katı kadar artırır. İkinci evrede histon boncuklarının çevresi DNA çift sarmalıyla sarılır. Bir nükleozom oluşur. Üçüncü evrede birbiri ile birleşip tesbihe benzer bir oluşum yapar. DNA molekülünün bu tür kangallaşmasına bobin modeli denir. 4. evrede ise ilmikler oluşarak kromozomlar ortaya çıkar (2,3).

Nükleozomlar ile genlerin fenotipik etkisi olan protein

sentezinin yapılması ve düzenlenmesi arasında ilişki gözlenemedi. Kromozomlarda aktif ve inaktif olan kesimlerdeki nükleozomların yapıları birbirinden değişiktir. Nükleozomların ince yapısındaki farklılığın moleküler temelinde giz vardır (2).

Sonuç olarak ökaryotlara ilişkin her kromozom dev bir DNA molekülünden oluşur. Hücrenin interfaz dönemindeki kromatini, tesbih benzeri bir yapı görünümündedir. Çapları 10 nm olan bu nükleozomların her biri, histon moleküllerinin yaptığı bir okto-merin çevresini yaklaşık 140 baz çifti içeren DNA molekülünün çevirmesiyle oluşmuştur. Mitoz yada mayozdaki kromatin materyali kalınlaşıp kangallaşarak 25 nm çapında ipliklere dönüşür. Metafaz evresinde ise, kangallaşarak katlanmış olan bu 25 nm çaplı iplikler histon olmayan kromozomal proteinlerle birlikte kromozomu oluşturmaktadır. Bu olayın nasıl olduğu açıklığa kavuşmamıştır (2).

2.2.1. Kromozomların Sınıflandırılması.

Metafaz kromozomları :

Metafaz plağında görülen kromozomlar sıkıca paketlenmiş DNA ve proteinden oluşmaktadır. Bunlar birbirinin aynı olan iki kardeş kromatidden meydana gelmiş olup bu kardeşler anafazda birbirlerinden ayrılır ve bağımsız kardeş çekirdeklere giderler. Dolayısı ile bunlar bir çift çubuk görünümünde olup bu çubuklar en az bir noktadan (primer konstraksiyon) birbirlerine bağlıdırlar. Bu bağlanma noktası kromozomun iç iplikciklerine bağlanma bölgesi olan sentromerin pozisyonunu belirler. Sentromer kromozomu bir kısa ve bir de uzun kola ayırmakta olup kolların serbest uçlarına telomer adı verilir. Sentromerin merkezde yer aldığı kromozomlara metasentrik kromozomlar denir. Sentromer kromozomun en ucunda yer almış ise buna telosentrik kromozom denir. İnsan hücrelerinde normalde telosentrik kromozom bulunmaz. Sentromerin çok kısa bir kol kalacak şekilde uca yakın olduğu kromozomlara akrosentrik kromozomlar denir. Normal insan hücrelerinde iki grup akrosentrik kromozom vardır. Bunların kısa kollarında genelde satellit bulunur. Satellit küçük bir kromatin kütlesi olup kromatidin geri kalan parçasına antene çok benzeyen ince bir sapla bağlanmıştır. Bu

tiplerin dışında kalan diğer bütün kromozomlar submetasentrik kromozom adını alır (Şekil 1) (4,17,36,38).

a) Metafazda



b) Anafazda



Şekil 1. Sentromerin yerine göre kromozom şekilleri.

2.2.2. Temel Sınıflama.

İnsan kromozomlarının klasik sınıflandırılması 1960'ların başında yapıldı. Bu sınıflandırma 1978'de International System for Human Cytogenetic Nomenclature de özetlendi (20,38).

İnsan kromozomları bant oluşturmeyen herhangi bir yöntemle boyandığında boyları ve sentromerin pozisyonuna göre 7 gruba ayrılır.

A Grubu.

(1-3) Kromozomlar birbirinden boyları ve sentromer pozisyonları ile ayırd edilen büyük metasentrik (No 1 ve 3) ve submetasentrik (No 2) kromozomlardır.

B Grubu.

(4-5) Kromozomlar birbirlerinden ayırd edilmeleri zor olan submetasentrik büyük kromozomlardır.

C Grubu.

(6-12) Kromozomlar orta boyda submetasentrik kromozomlardır. X kromozomu bu grupta yer alan kromozomların uzun tiplerine benzer. Bantlama olmaksızın bu grubun identifikasyonu zordur.

D Grubu.

(13-15) Kromozomlar orta boyda akrosentrik bir kromozom olup satellitlere sahiptir.

E Grubu.

(16-18) Kromozomlar nisbeten kısa metasentrik (No:16) veya submetasentrik (No:17, 18) kromozomlardır.

F Grubu.

(19-20) Kromozomlar kısa metasentrik kromozomlardır.

G Grubu.

(21-22-Y) Kısa akrosentrik kromozomlar olup satellitleri vardır. Y kromozomu bu gruba benzersedede satelliti bulunmaz.

2.2.3. Bantlama Yöntemleri.

Kromozomları daha iyi identifiye edebilmek amacı ile geliştirilen bantlama yöntemleri sayesinde kromozomlarda grup içi dağılım, insersiyon, translokasyon, transversiyon v.s. gibi bozukluklar daha kolay tanımlanabilir olmuştur. "Bant değişik yöntemler ile boyanabilen daha açık yada daha koyu görünerek komşu segmentlerden ayırt edilebilen bir kromozom parçası olarak tanımlanır (Paris konferansı 1971).

2.2.3.1. Q Bantlama.

Bantlama alanında ilk uygulanan yöntemlerden birisi kinakrin

bantlama (Q bant) dır. Sitolojide kullanılan bazı boyalar fluoresans verirlerken bunlara "Fluorochrome" denir. Fluoresans boyası olarak en çok kullanılan kinakrin dihidroklorür ve atebrindir. Özellikle kinakrin kullanan araştırıcılar bazı kromozomlarla, kromozomların belirli kesimlerinde kuvvetli fluoresans saptamışlardır. Bu konuda çalışan araştırıcılara göre kinakrin hetero ve ökromatine farklı bağlanmaktadır. Bunu farklı iki mekanizma ile açıklarlar; 1. Fluorochromun alkilleyici grubu DNA'nın özellikle guanin bazlarına bağlanarak kuvvetli fluoresans verdiği görüşündedirler. 2. Kinakrin grubu DNA sarmalları arasına sokulmaktadır. Böylece Q bantları hem kromozomun çeşitli kesimlerindeki DNA miktarlarına hemde kromozomun değişik bölgelerindeki DNA'nın kinakrin ile bağlanma yeteneğine göre farklı bağlanırlar. Bununla beraber bağlanmanın mekanizması ve biyokimyası belli değildir.

İnsan kromozomlarında bantlama örüntüsü G bantlarına ileri derecede benzemekte olup 1, 9, 16 kromozomların sentromer bölgelerinde ve akrosentrik kromozomların satellit bölgelerinde istisnai farklı bölgeler bulunur. Bu bölgelerdeki polimorfik varyasyonlar ve Y kromozomu bu yöntemin kullanılması ile saptanabilir(2,5,36).

Q bantlama basit, hızlı, güvenilir bir yöntem olup, lamların yaşlandırılmasına ve ön işleme gerek yoktur. Yöntemin dezavantajı floresanın çabuk sönmesi ve o yüzden hemen resim çekilmesinin gerekmesidir(2).

2.2.3.2. Giemsa Bantlama.

Memeli kromozomlarının rutin boyanmasında en yaygın biçimde kullanılan yöntem Giemsa bantlama (G bantlama) dır. Bu boyamanın uygulanmasında en sık kullanılan yöntemler ise preparatların tripsin gibi bir proteazla muamele edilmeleri veya lamların sıcak salin-sitrat ile enkübe edilmeleridir. Ancak bu amaçla kullanılan daha başka yöntemler de bulunmaktadır. Bantlama yöntemi ile elde edilen kromozom örüntüsü kromozomların hem yapısal ve hemde işlevsel kompozisyonlarını yansıtır. Koyu boyanan bantlar pakiten kromomerlerine karşılık olmakta, DNA'larını genellikle geç S-fazında replike etmekte, Adenin-Timin (A-T)'den zengin DNA

içermekte, nisbeten az sayıda aktif gen kapsamakta ve protein içerikleri açısından açık boyanan bant bölgelerinden farklılık göstermektedir. Kromozomların farklı bölgelerinden fiksasyon veya bantlama ön işlemleri esnasında farklı protein ekstraksiyonu olması G-bantlamalarının eldesinden önemli işlerge olabilir. G-bantlamada optimum sonuç almak için 3-5 gün oda ısısında yaşlandırılan veya 56-60°C da bir gece (16-18 saat) yaşlandırılan preparatlar kullanılır(2,4,5,36,38).

2.2.3.3. Yapısal Heterokromatin Bantlama.

Yapısal (konstitütif) heterokromatin kromozom çatı materyali olup gerek mitoz ve gerek interfazda koyu boyanan materyel olarak görülür. Bu grubun içerisinde tekrarlanan (repetitif) DNA, satellit DNA (sentrifügal gradientle saptanmış) ve non-repetitif DNA bulunur. Satellit DNA'nın in situ hibridizasyonda koyu boyanan C-bandı bölgelerine lokalize olmasından dolayı C bandının yapısal heterokromatin gösterdiği bilinir.

İnsan kromozomlarında koyu boyanan C bandları kromozomların sentromerlerine lokalizedir. Bunun tek istisnası Y kromozomudur. Koyu bant bu kromozomda uzun kolun distal bölgesine lokalizedir. C-bandlarının genişliğinde belirgin bir polimorfizm bulunmakta olup, polimorfizmin araştırılmasında ve kromozomal yeniden düzenlenmelerin (rearanjmanlarının) araştırılmasında C-bandları yararlı olur.

İn situ hibridizasyonda kullanılan işlemler arasında asit, alkali ve sıcak salin sitratla muamele bulunmaktadır. Bu preparatlar daha sonra giemsa ile boyandıklarında C-bantları vizüalize olmakta ve buda C-bantlarının oluşumunda DNA denatürasyonunun sorumlu olduğunu düşündürmektedir. Tüm bu işlemler DNA yitirilmesine de neden olmakta ve kayıp C-bantlamadaki farklı boyanmaya yol açmaktadır(2,5,36).

2.2.3.4. Revers Bantlama.

Dutrillaux ve Lejeune (1971) Giemsa boyasının kullanıldığı yöntemlerin biriyle boyanma özelliği bakımından G bantlarına tam ters durum saptamışlardır. Bu bantlamaya G-bandının tersi anlamına

"reverse" R-bant denilmiştir. Q ve G bant bölgeleri birbirine çok uyarken, R tersi bant kalıpları alır.

R bantlarındaki DNA'nın erken, G bantlarındakinin ise geç sentezlenen DNA olduğu anlaşılmıştır(2,5,36).

2.2.4. Mutasyonlar.

Doğa, kromozomları yetenekleri oranında dış etkilerinden korumağa çalışır. Bu amaçla nükleus içinde tutup, zar ve sitoplazma ile çevrenin zararlı etkilerinden korumayı amaçlar. Kromozomların temel bileşimi ve biyolojik sistemlerin en büyük ve en önemli molekülü olan DNA'nın çevresel şartlardan etkilenmesi hem kaçınılmaz hemde çok önemli sonuçlar doğurabilen bir olgudur. DNA hem çevreden (mutajenik ajanlarca) hemde kendi molekül yapısındaki kararsızlıktan dolayı kendiliğinden etkilenecek bozulmaya uğrayabilir (24).

Genetik materyali oluşturan nükleotidlerin sıralanması, sayısı yada çeşidinde ortaya çıkan kalıtsal değişikliklere mutasyon, mutasyona uğrayan bireylere de mutant denir (3).

2.2.4.1. Mutasyonların Sınıflandırılması.

Mutasyonlar iki grupta incelenir (3,24).

- a) Kendiliğinden oluşan mutasyonlar
- b) İndükte mutasyonlar

2.2.4.1.1. Kendiliğinden Oluşan Mutasyonlar.

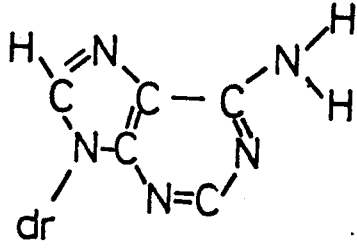
Normal koşullarda kendiliğinden oluşan mutasyon frekansı her jenerasyondan 10^{-5} - 10^{-10} gibi çok düşük orandadır. Aynı anda iki ayrı mutasyonun aynı gende oluşma olasılığı ise, 10^{-10} - 10^{-20} gibi daha da düşüktür. Bununla beraber vücudumuzda 10^{14} hücre olduğu göz önüne alınırsa kendiliğinden oluşan mutasyon sayısının değeri oldukça yüksek boyutlara ulaşır.

Spontan Olarak Oluşan Mutasyonların Nedenleri.

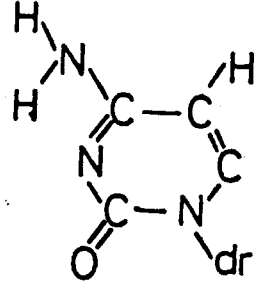
a) Tautomerik değişimler: 10^{-4} oranında gözlenir. Proton kaymaları şeklinde gözlenir. Adenin-Sitozin (A.C) arasında gözlenen durum (Şekil 2)'de gösterilmiştir. Benzer olay Adenin-Adenin (A.A)

arasındada oluşabilir (3,24).

(a)

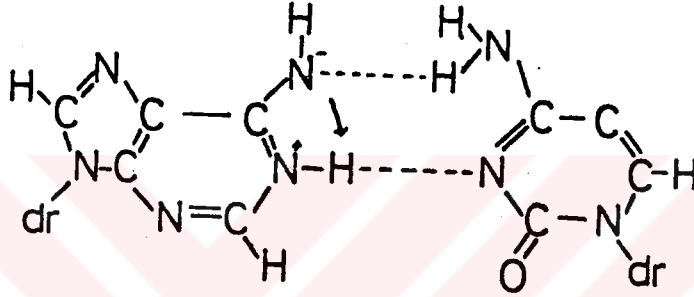


Adenin



Sitozin

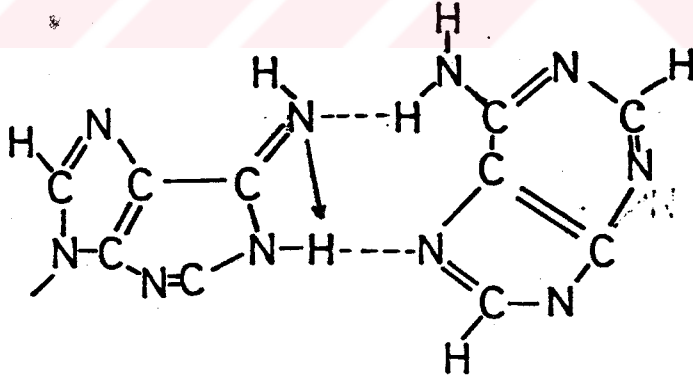
(b)



Adenin

Sitozin

(c)

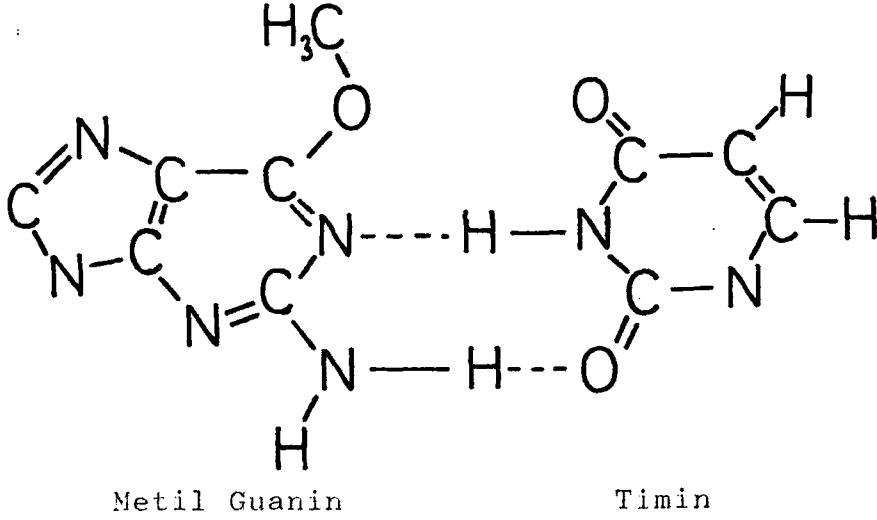


Adenin

Adenin

Şekil 2. Tautomerik mutasyonlar; a) Adenin ve Sitozin bazları, b) Adenin-Sitozin arasında proton kaymaları şeklinde gözlenen mutasyon, c) Adenin-Adenin arasında gözlenen mutasyon.

b) Metilasyon: Hücrelerde bulunan S-adenosilmetionin gibi metil donörleri bazıları metilleyebilir (Şekil.3). Metillenen bazların yanlış eşleşmeleri sonucu mutasyon olabilir (3,24).



Şekil 3. Metilasyon tipi mutasyon.

c) Pürin ve Pirimidin bazlarının DNA'dan kopması: DNA bazlarından bazıları kendiliğinden koparak DNA 'dan ayrılabilir. Pürin bazlarının ayrılma hızı pirimidin bazlarından 20 kat fazladır. DNA dan kopan pürin bazları ya normal haliyle tekrar pürinsiz bölgeye girer yada birbaşka atomu aracılığıyla glikosilik bağ yaparak DNA'da baz çiftleri oluşumuna neden olur (3).

d) Polimerisasyon hatası: DNA replikasyonu sırasında eğer polimeraz hata yaparsa ve bunu düzeltemez ise kendiliğinden mutasyonlar ortaya çıkabilir (3).

e) Hareketli elementler: Transpozan, yada sıçrayıcı genlerde denen hareketli elementler kendiliğinden mutasyona yol açar(3).

f) Palindromlar: DNA zincirlerinden her ikisinde de birbirlerine ters yönde — — benzer nükleotid dizilerin olduğu bölgelere palindrom denir. Tekrarlanan dizilerin olduğu bu DNA bölgeleri delesyon, duplikasyonların yoğun olarak görüldüğü mutasyon alanları olarak bulunmuş ve bunun nedeni olarakta yanlış eşleşme olayları ortaya atılmıştır (3).

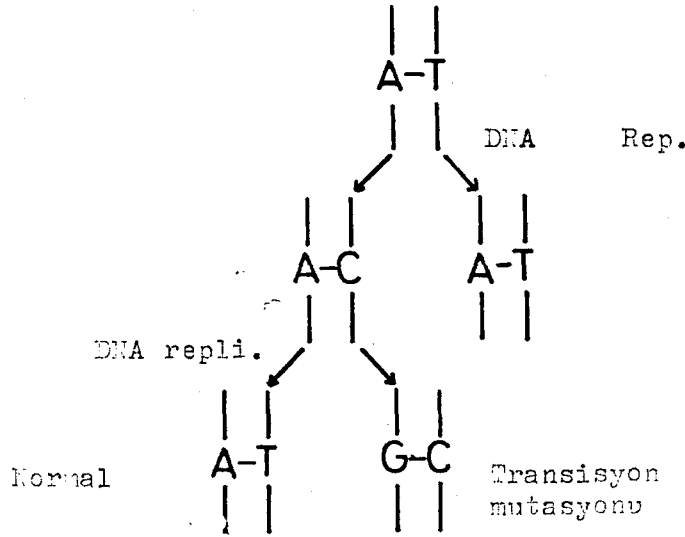
2.2.4.1.2. İndükleyici Mutasyonlar.

Mutajenik ajanların büyük bir çoğunluğu DNA bazlarını etkileyerek, bazların reaktif kısımlarına bazı yan gruplar (etil, metil, hidroksil gibi) eklenmesine neden olur. Bazıları aynı iplik üzerinde veya iki iplik arasında kovalan bağların (=crosslinks) oluşmasına neden olur (nitrous asit, UV, mitomicine). Bazı alkilleyiciler de omurgadaki fosfatları etkileyerek fosfo triesterlerin oluşmasına neden olurlar (metil metan sülfonat gibi) X-ışını, γ -ışınları gibi iyonlaşmaya neden olan ajanlar diğer etkilerinin yanı sıra tek veya çift DNA iplik kırılmalarına da neden olurlar.

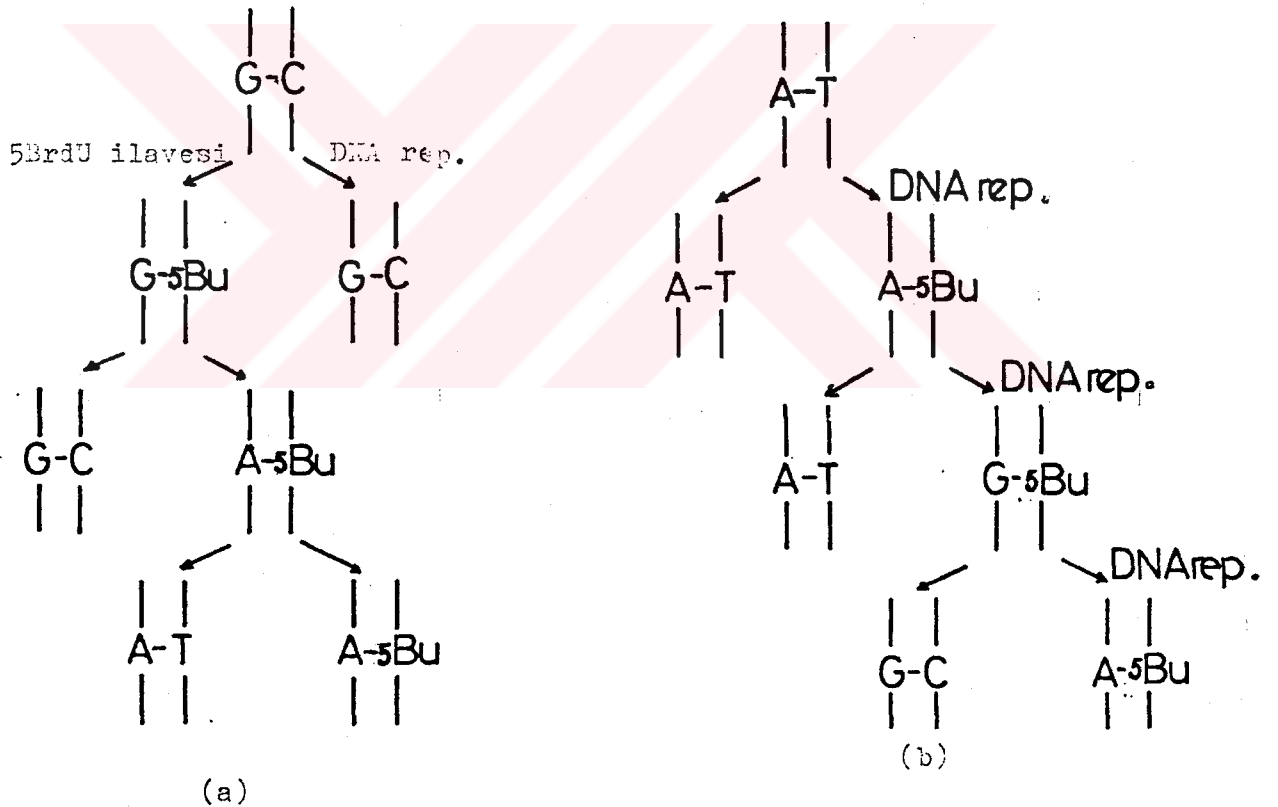
İndükleyici Mutasyonların Oluşum Mekanizması.

1) Mutajenik maddenin DNA bazlarından birinin yerine girmesi durumunda: Mutasyonlar genelde DNA zincirindeki bazların sırasında bir değişim olarak yada DNA bazı analoglarının bazların yerine geçmesi ile oluşabilir. Baz analoglarına örnek olarak adenin analogu olan 2 amino pürin ile timin analogu olan 5 BrdU sayılabilir.

Timin analogu olan 5 BrdU daha çok A.T. \rightarrow G.C. tipi transisyon mutasyonlarına neden olur (Şekil 4). Lamda bakteriyofajı tarafından yapılan deneylerde cI geninde 5 BrdU ile elde edilen 83 mutasyondan 80 tanesi A.T. \rightarrow G.C. tipinde 3 tanesi ise G.C. \rightarrow A.T; tipinde değişim yapar. BrdU'nun keto durumu timin'e benzer özellik gösterir. Böylece DNA'da adenin ile çiftleşir. Nadiren enol durumuna dönen BrdU, bu formda iken guaninle çiftleşecektir (Şekil 5).



Şekil.4: A.T. —> G.C. tipi transisyon mutasyonu

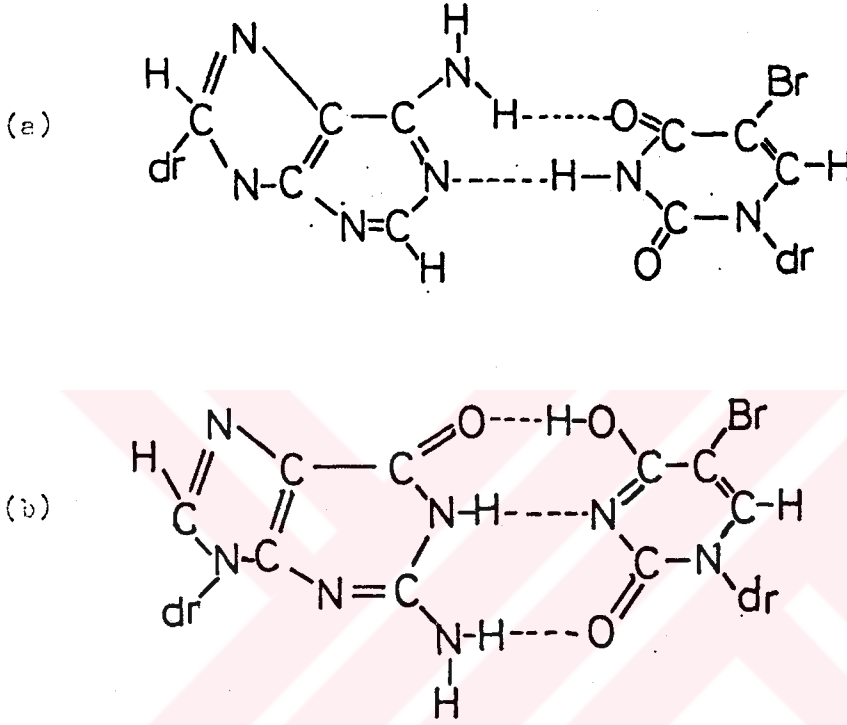


Şekil.5: a) G.C —> A.T arasında 5 BrdU'nun ender formunda gözlenen transisyon mutasyonu.

b) A.T —> G.C arasında 5 BrdU varlığında gözlenen transisyon mutasyonu

5-BrdU ile mutasyon iki şekilde olur; a) DNA replikasyonu sırasında 5-BrdU genelde birincil birleşmeye neden olur. Eğer nadiren enol durumunda ise bir sonraki replikasyonda döner. Bunun sonucu bir transisyon mutasyonudur (24).

b) DNA baz analogu ile birleşmiş ise bu durumda da 5-BrdU mutasyonu olabilir (Şekil.6).



Şekil 6. 5 BrdU varlığında: a) Adenin-5 BrdU'nun genel formu

b) Guanin-5 BrdU'nun genel formunda gözlenen mutasyon.

2. Mutasyon yolu, mutajenin DNA yapısına girmeden, bazıları modifiye ederek onların yanlış eşleşmelerine neden olan mutasyonlar: Bazı alkilleyici maddeler, örneğin etil metan sülfonat (EMS) ve N-metil-N-nitro- N-nitrosoguanidin (NG) bu şekilde etki gösterirler. Sonuçta G.C. → A.T. tipi transisyonlara neden olur.

Nitröz asit (NA) (O=N-O-H) amino grubu içeren bazlarla reaksiyona girerek deaminasyona sebep olur (3,24).

3. Mutajen bir veya daha fazla bazı etkileyerek spesifik eşleşmeyi engeller. Bu durumda ortaya çıkan replikasyon engelini

aşılabilmesi için S.O.S. sisteminin uyarılması gerekmektedir. S.O.S. yolu normal onarım sistemlerine oranla daha fazla hata yapar ve mutasyona neden olur. Karsinojenlerin çoğu S.O.S. bağımlı mutajenlerdir. Bunlar benzopiren, UV ışığı, aflatoksin, N-asetoksi asetil amino fluoren (AAAF) ve 4-nitrokuinolin -N-oksit (NQO) sayılabilir (3).

Her üç mutajen, karsinojen maddede G.C → A.T tipi transversiyonlara neden olur. Bu maddelerin mutajenik etkilerini gösterebilmeleri için DNA bazlarına bağlanmaları, daha sonra yapılarının çok büyük oluşu nedeniyle baz kopmalarına neden olabilecekleri ileri sürülür (3,21,24).

Özetle büyük aromatik maddeler bazlarda nereye bağlanırsa bağlansın hacimleri itibariyle replikasyon kompleksini durdurabilmektedir (3).

DNA da spontan olarak bozulmalar meydana gelir. Bunların en önemlisi pürin bazlarının kopması ve deaminasyonlardır. Bir memeli hücresinde 24 saatte ortalama 10.000 pürin bazının glikozidik bağ kopması ile DNA dan ayrıldığı hesaplanmıştır. Daha az miktarda olmakla beraber pirimidin bazlarında kendiliğinden DNA'dan ayrıldığı gösterilmiştir. Pürin ve pirimidin bazlarının DNA'dan kopması sonucu apürinik ve apirimidinik noktalar ortaya çıkar. Böyle noktalar replikasyon ve transkripsiyonu durdurabildiğinden hücrel hayatin devamı için mutlaka onarılmaları gerekir(3).

Yeni genotiplerin birden bire ortaya çıkması toplumda mevcut olmayan bir karakterin bir propositus ailesinde değerlendirilmesinden doğmaktadır. Oysa aynı karakterin hangi şartlarda doğduğu bilinmediğinden, önceki kuşaklarda görülen minör değişiklikleri bulmanın güçlüğünden dolayı olayın ani geliştiği şeklinde yorumlanır. Çevresel şartların etkisi letal olabileceği gibi tanınmayacak karakterde bir genotip ve fenotip'de oluşturabilir (3,24).

Mutasyonlar spontan olarak görülebileceği gibi dış etkilere de oluşabilir. Spontan mutasyonlar ilk kez mikroorganizmalarda gözlenmiştir. Yüksek sınıf organizmalarda mutasyon etkeninin tesbiti güçtür. Spontan mutasyonların oluşumundan hiçbir mutajen

sorumlu değildir. Spontan mutasyonların frekansı düşük olduğundan, genetik araştırmalarda mutasyon hızını artırmak gerekir (3).

Diğer bir sınıflandırmaya göre mutasyonlar somatik ve gametik olarak iki grupta değerlendirilebilir. Letal olmayan gametik mutasyonlar sonraki kuşağa aktarılabilir. Somatik mutasyonlar ise yaşamın herhangi bir devresinde ortaya çıkabilir. Fakat gelecek kuşaklara hiçbir zaman aktarılamaz (3).

2.2.4.2. DNA Onarım Yolları.

Canlı organizmaların evrimi sırasında çevrede bulunan mutajenik ajanların etkilerinden korunmak için çeşitli onarım mekanizmalarını geliştirdikleri son 25-30 yıldır yapılan çalışmalarla saptanmıştır. Onarım yollarının bazılarında biyokimyasal mekanizmalar ve genetik kontrolleri yeterli denilebilecek düzeyde açıklanırken, bazıları hakkında henüz yeni bilgi sahibi olmaktayız. Genellikle biyolojik sistemlerde özgün enzimlerin rollerini anlamamızı sağlayan mutantların izolasyonu prokaryotik sistemlerde daha kolay olduğundan prokaryotlarda yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılan onarım mekanizmaları, DNA onarım yollarının gözlenmesinde önemli bir yer tutar.

Bozulan zarar gören DNA'nın onarımı için en basit mekanizma DNA'yı fazla değiştirmeksizin doğrudan hasarın giderilmesidir. Hasarın doğrudan giderilmesinin birkaç yolu vardır (Şekil.7) (3).

1. Fotoreaktivasyon.

Fotolayz enzimi pirimidin dimerlerinin bulunduğu bölgelerde DNA'ya bağlanmakta (bağlanma karanlıkta da olabilmekte) 340-400 nm dalga boylu ışık eşliğinde enzim dimerleri monomer haline getirilebilmektedir. Bu enzim Xeroderma pigmentosum (XP) hastalarında bulunmamaktadır (3)

2. Metil transferaz ile reaksiyon.

Bu reaksiyonda metil (O^6 -metil guanidin) veya etil (O^6 -etil guanidin) grupları metil transferaz enziminin katalizliğinde özgül bir akseptör protein'e transfer edilmektedir. Protein alkillenme

ile inaktif hale geldiğinden diğer enzimlerin aksine, yeniden kullanılamamaktadır. Bu nedenle hücrede bulunan akseptör protein sayısı kadar sayıda transfer reaksiyonu yapılacaktır; tüm akseptör proteinler alkilenince onarımda yapılamaz hale gelecektir (3).

3. DNA glikozilaz yolu.

Bu enzim ile hasarlı baz ve bu bazın bağlı olduğu deoksiriboz şekeri arasındaki glikozidik bağ kırılır. Kırılma sonucu ortaya çıkan apürinik veya apirimidinik (pürinsiz ve pirimidinsiz) bölgenin onarılması için daha başka reaksiyonlar gerekmektedir. 9 çeşit DNA glikozilaz enzimi tanımlanmıştır (3).

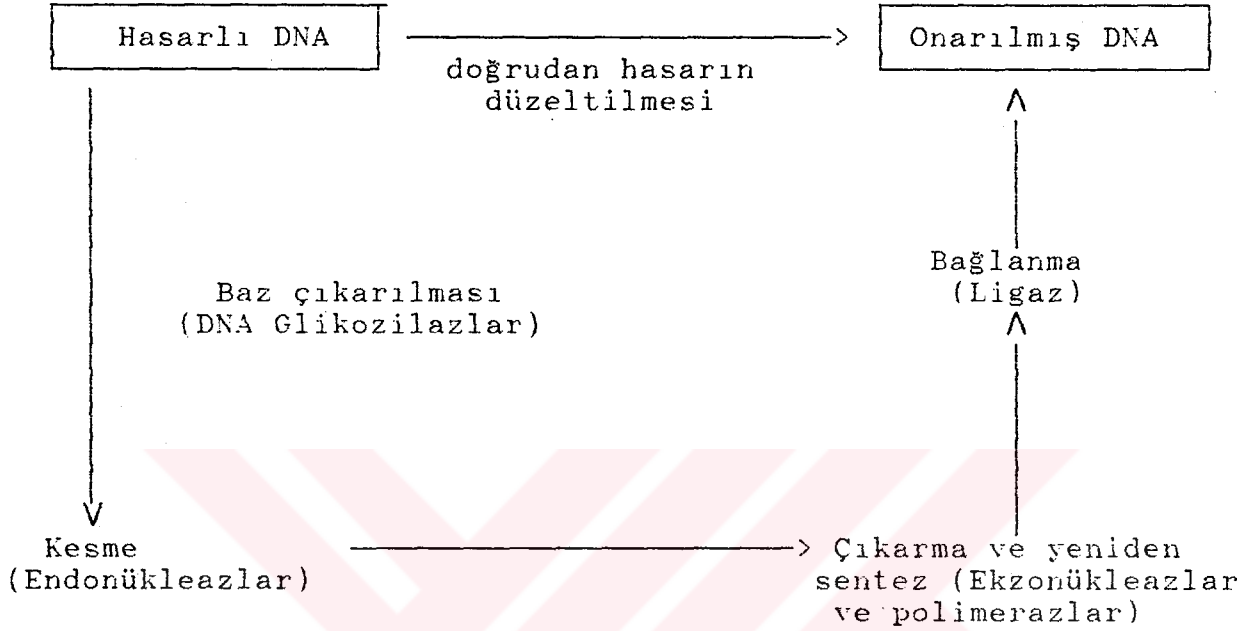
Glikozilazlarla assosiyeye olmuş olan apirimidinik (AP) endonükleazlar AP yerine 3' tarafından kesme yapmaktadır. Bu durum enzim pirimidin dimerini 5' taraftan 3' tarafa iki kesme işlemi yapar. Kesme; 5' tarafta dimerden 7 nükleotid uzakta, 3' tarafta ise, 3 veya 4 nükleotid uzaktan yapılır (Şekil 7).

II) DNA onarım sistemlerine ilaveten hücreler DNA'daki bozulmaları tolere edebilmek için sistemler geliştirmiştir. E.coli de benzer iki sistem vardır.

2.2.4.2.1. DNA'da Replikasyon Sonrası Onarım Modeli.

DNA iplikleri arasında değişimi gerektiren "replikasyon sonrası onarım" bu onarım sistemi şöyle çalışır. Replikasyon sırasında kalıp DNA ipliği üzerinde primidin dimerleri bulunmaktadır. DNA sentezi bu dimerlerin olduğu noktalara kadar normal devam etmekte fakat DNA polimeraz dimerleri kopye yapmadığından sentez duraksamaya girmektedir. DNA sentezi kalıp DNA üzerinde ve dimerlerin daha ilerisindeki okazaki fragmentlerinin sentezini başlatan RNA primerlerinin uzantıları halinde devam eder. Replikasyon bittiğinde dimerlerin karşısına gelen bölgelerde yeni sentezlenen iplikte boşluklar yer alır. Replikasyonu hemen takip eden devrede aynı hücrede iki benzer DNA dubleks bulduğundan bu boşlukların doldurulması recA proteinine bağlı bir rekombinasyon olayı sonucu olur. Bu olayda boşluklar diğer DNA molekülünde bulunan komplementer ipliklerinin transferi ve yeniden sentez

işlemleri, bağlanma (ligation) yoluyla doldurularak DNA ipliklerinin devamlılığı sağlanır. Sonuçta hasar giderilememiştir. Fakat replikasyon ve hücre bölünmesinin durdurulması önlemediğinden canlılığın devamı sağlanabilmiştir (3).



Şekil 7. DNA onarım mekanizmaları arasındaki ilişkiler.

Canlı türlerinin kendilerine özgün bilgileri DNA'da kayıtlıdır. Bu bilgiler üreme ile dölden döle aktarılır. Üreme; atasal soya benzer yeni bir dölün oluşturulması olayıdır. İnsan fertilize olmuş tek bir hücreden, ovundan meydana gelir. Zigotun arka arkaya geçirdiği mitoz bölünmelerle hücre sayısı yetişkin bir insandan ortalama 10^{14} lere ulaşır. Mitoz hücre siklusunda bölünmenin olduğu mekanik bir dönemdir. Asıl önemli dönem; hücrenin genetik materyali olan DNA'nın replikasyonunun olduğu interfazdır- (3).

2.2.5. Kromozom Analizi İçin Gerekli Faktörler.

2.2.5.1. Mitojenler.

Kromozom analizinde kullanılan kanda yeterince lenfosit

(özellikle T lenfosit) bulunması gerekir. Kanda lenfosit sayısı veya immün olgunluk ne kadar düşük ise mitotik index o kadar az olur. Bu durum lösemi, Hodgkin gibi hastalıklar da, enfeksiyonlarda yada ilaç kullanılmasında (kemoterapi, gebelik önleyici haplar) önemli derecede etkili olabilir. In vitro koşullarda mitotik ajanlar kullanılarak mitoz artırılabilir. Günümüzde kullanılan mitotik ajanlar; TPP (tüberkülin pürifiye protein), tetanoz ekstresi, konkanavalin A, PWM (Pokeweed mitojen) ve PHA (Fito hemaglutinin) olup en çok kullanılan PHA transformasyonunun gerçek işlergesi bilinmemekte ve indüksiyon süresinin sadece ilk 24 saatinde gereklidir. PHA, barbunya fasulyesi (Phaseolus vulgaris) ekstraktesi olan bir mukoproteindir. Kültürde 24 saatlik bir aradan sonra RNA sentezini artırır. İkinci 24 saat boyunca çekirdek genişlemekte ve DNA sentezi başlamaktadır. İlk mitoz 48. saatte gözlenir. Her 24 saatte bir mitoz dalgası gözlenir. Bu yüzden hasat 72. veya 96. saatte yapılır.

2.2.5.2. Kültür Koşulları.

Tam kan mikrokültüründe lenfositlerin mitoz başlama süresi örnekten örneğe değişmekle birlikte lenfosit hücre döngüsü genelde 24. saatte başlar. İnsan lenfositlerinde DNA sentez fazının (S fazı) ortalama süresi yaklaşık 9 saat, G2 ise 3 saattir. Mitoz 1,5 saat sürer. Rutin amaçlı, senkronize olmayan kültürlerde önerilen kültür süresi 72 saattir.

Vasatın doğru seçimi ve kontaminasyon riskinin giderilmiş olması gerekmektedir.

Kültürde diğer dikkat edilecek husus pH ve sıcaklıktır. En ideal ısı 37°C olup 36-38°C aralığına tahammül edilir. 39°C nin üzerindeki ısılarda kültürdeki hücreler ölür. Sıcaklığın geçici düşmesi hücreleri öldürmez ise de preparatların kalitesini düşürür. Kültürleri duraklatarak hasat zamanında yeterli mitotik indeks eldesini önler.

pH vücut sıvılarının nötral pH'sına yakın olmalı ve 7,0-7,4 arasında bulunmalıdır.

2.2.5.3. Kromozom Preparatlarında Hasat Yöntemleri.

2.2.5.3.1. Mekik inhibitörleri.

Senkronize olmayan kültürlerde 2 metafaz arasında bir blok oluşturmak için mitotik mekik inhibitörlerinin kullanılması gerekir. Çeşitli kimyasal maddeler mekik liflerinin oluşmasını engeller. Bu mekik liflerinin görevi mitoz bölünmesinden önce sentromerleri aracılığı ile kendilerine bağlanan kromozomların kromatidlerini birbirinden ayırmaktır. Bu kimyasal maddeler arasında kolşisin, vinblastin, kolşisin analogu olan kolşemid sayılabilir. Tijo ve Levin bu yöntemi bitki sitogenetiğinden tıba aktarmıştır.

Kolşemid 10 µg/ml olacak şekilde hazırlanır. Kolşemide bırakma süresi ile metafaz indeksinin sayısı birbiri ile orantılıdır. Fakat uzun süre bırakmalarda kromozom boylarında kısalma gözlenir. O yüzden yeterli sayıda mitoza ve gerekli tanımın tam konulabileceği boya sahip kromozomlar elde etmek için kolşemiddeki süre iyi ayarlanmalıdır.

2.2.5.3.2. Hipotonik Çözelti.

Hipotonik çözeltilerde tuz yoğunluğu sitoplazmik tuz yoğunluğundan daha düşük olduğundan çözelti içindeki su hücre zarını aşip hücreye girer. Hücreyi şişirir ve eritrositlerin çoğunu patlatır. Hipotonik çözelti uygulanması kritik bir zamanlama gerektirmektedir. Kolşemid'in etkisini sonlandırıp kromozomların dağılmasını sağlar. Hipotonik çözelti olarak; %1 sodyum sitrat veya 0,075 M. KCl kullanılabilir. Kromozomlarda en az hasar yaptığından en çok kullanılan hipotonik çözelti KCl'dür.

2.2.5.3.3. Fiksasyon.

Kromozom preparatlarında fiksasyon amacı ile taze hazırlanmış 3 kısım alkol (mutlak etanol veya metanol) 1 kısım glisial asetik asit kullanılır. Alkol ve asidin su almamış olması gerekir. Bu amaçla ağzı kapalı şişelerde tutmak gerekir. 3:1 oranının değiştirilmesi kromozom morfolojisini olumsuz yönde etkiler. Asetik asidin bu orandan fazla olması erken hücre zarı yırtılmasına neden

olur. Bu da kromozom kayıplarına yol açar.

Tam kan kültürlerini ilk fiksasyon sırasında sürekli karıştırmak gerekir. İlk fiksasyonla ortamda geriye kalan eritrositler hemoliz olur. Kırmızı renkli hemoglobin koyukahve renkli hematine döner. Yeterli ve dikkatli karıştırma yapılmamışsa koyu kahverenkli çökelti gözlenirken mitotik index düşer ve kalitesiz preparatlar elde edilir. Çökelti gözleendiğinde bu bir pipetle alınmalı ve fiksasyon işlem sayısı artırılmalıdır.

Lama yaymadan önce az bir miktar taze fiksatif ilave edilmelidir. Fiksasyonun yetersiz ve kötü olduğunun kanıtı faz kontrast mikroskopta buzlu görünümde üç boyutlu alanlar ve "tavada yumurta" manzarasının gözlenmesidir. Bu durumda kromozomların sınırları kesinliklerini yitirir.

2.2.5.3.4. Lam Hazırlanması ve Boyama.

Lamların hazırlanması laboratuvarından laboratuvara farklılık gösterir. Lamlar ya alkol, fiksatif, eter v.s. ile bir ön işlemden geçirilerek yada deterjanla yıkanarak kullanılabilir. Bu tür işlemler genelde boyamada zemini de boyayacağından bazı laboratuvarlarda tercih edilmez. Daha sonra, genelde saf su da bekletilen lamlara ıslak olarak yada cilalanmış olarak (kuru) kullanılabilir. Kullanılan boyalar Giemsa, Romanowsky, Orsein'dir.

2.3. KARDEŞ KROMATİD DEĞİŞİMİ (SCE)

2.3.1. Hücre Gelişim Kinetiği ve Hızının Değerlendirilmesinde SCE.

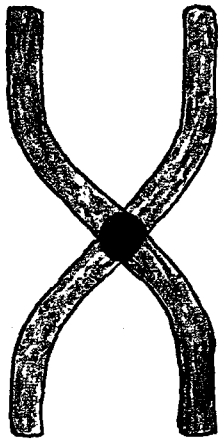
Sister kromatid exchange (SCE), replikasyonun farklı döngülerini saptama veya tek bir hücre döngüsünde erken yada geç replikasyon arasında ayırım yapmada kullanılabilir. SCE yöntemi ile tüm genomun replikasyon takvimi öğrenilmiştir (19). Homolog kromozomlar replikasyon açısından genelde benzer örüntü gösterirken X-kromozomları ayrıcalık gösterirler (19,38). Kromozomların bazı bölgelerinin geç replike olmasının nedeninin spirilizasyon olduğu düşünülmektedir (19).

BrdU varlığında tek bir hücre döngüsüne uğrayan hücreler bazı bantlar için kromatidler arasında farklı boyanma özelliği gösterirler. Bu lateral asimetri diğer kromatide oranla daha fazla timidin içeren kromatid bölgelerini yansıtır. Diferansiyel replikasyon boyası olan SCE, kromozom replikasyonunun daha ayrıntılı analizi için yüksek rezolüsyonlu kromozom analiz yöntemi ile kombine edilebilir. BrdU'in iki tam döngü boyunca ortamda bulunması halinde BrdU'li DNA içeren bir kromatid bir polinükleotid zincirinde BrdU bulundururken kardeş kromatidde her iki zincir BrdU içerir. Oluşan farklı boyanma SCE saptanmasının temelini oluşturur (Şekil 8) (30).

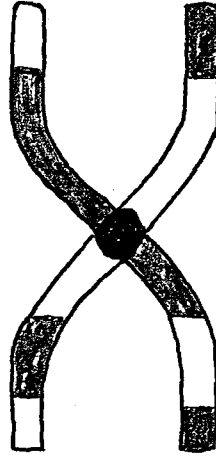
SCE'nin gerçek mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte DNA'nın sentez ve onarım işlevleri ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (26,27,34). Eğer hücreler bir DNA sentezi boyunca BrdU ortamında tutulursa, DNA'nın semikonservatif sentez mekanizmasına göre DNA zincirlerinden sadece birine BrdU girer (mitoz I). Bu durumda SCE değerlendirilemez. Hücreler 2 mitoz süresince BrdU bulunan ortamda tutulursa normal ve BrdU'lu DNA zincirleri gözlenir. Eğer bu zincirler arasında kromatid değişimi meydana gelmiş ise kromozomlarda karşılıklı aralanmalar oluşur. İn vitro ortamda BrdU varlığında hücre bölünme safhalarına göre BrdU ile değişik bağlanma şekilleri gösterir (38).

BrdU, DNA'ya DNA'nın replikasyonu sırasında girer. Timidin metil grubunun BrdU ile yer değiştirmesi DNA da bazı fiziko-kimyasal değişmelere neden olur. Kromozomlar, iki replikasyon dönemi süresince BrdU ile işleme sokulur ve sonra giemza ile boyanırsa kardeş kromatidler farklı olarak boyanır. Replikasyonun iki siklusundan sonra BrdU kardeş kromatidlerden sadece birinde bir polinükleotid zincirinde yer aldığı görülmüştür (Şekil 8).

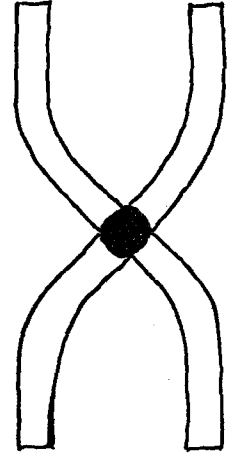
Ünifilar olarak yer değiştirmiş kromatidlerin soluk boyandığı görülür. Farklı boyanmanın nedeni, kromatidler içinde DNA zincirlerine bağlanan BrdU'nun miktarı ve bağlanma hızının farklılığındandır (6,47). Bu özelliğinden dolayı SCE hücre gelişim kinetiği ve hızının değerlendirilmesinde kullanılan iyi bir test yöntemidir (36,38).



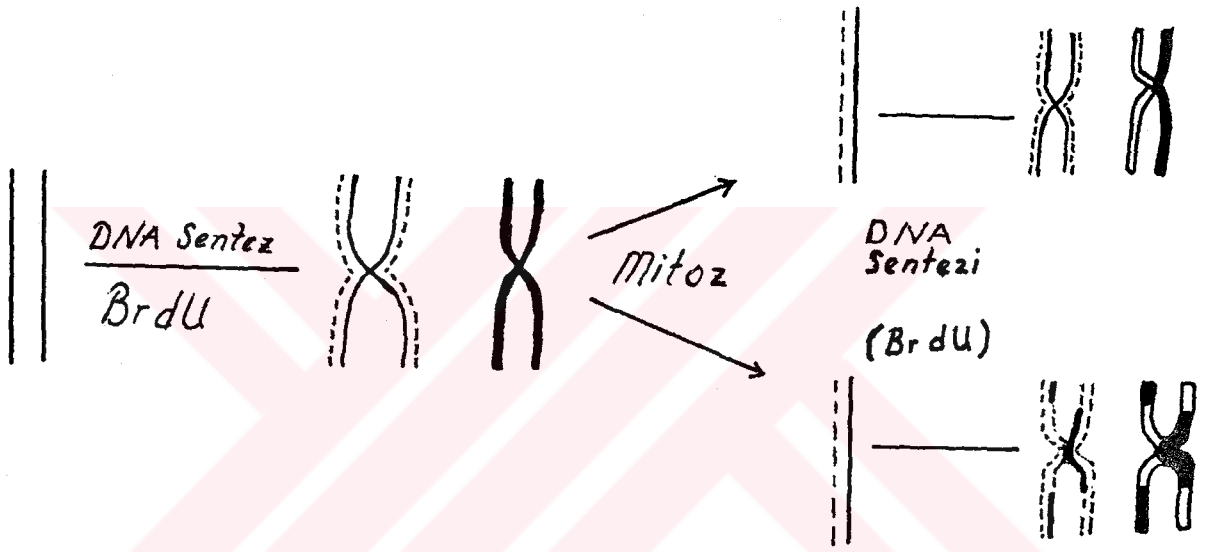
M I mitozu



M II



M III



Şekil 8. Kromozomlarda SCE lokalizasyonu.

2.3.2. Kromozomlarda SCE Dağılımı.

Kromozomlarda SCE'lerin lokalizasyonu rastgele olarak görülmesine rağmen aslında poisson dağılımına uygun bir yayılım gösterir. SCE frekansı genelde kromozomların uzunluğu ile doğru orantılıdır. Büyük kromozomlarda SCE'lerin sayısı daha fazladır (1,47). Oysa G grubu kromozomları bu ilkeye uymaz. Çin hamster kromozomu ile çalışan araştırmacılar bunun büyük bir kromozomunda diğerlerinden çok fazla sayıda SCE gözlediler (46).

BrdU varlığında 3. replikasyon döneminden sonra kromatidin sadece 1/4'ü koyu boyanır. 3. bölünmede oluşanların birinci ve

ikinci bölünmede oluşanalara oranı Tice ve arkadaşları tarafından araştırıldı (46); sonuçta SCE hızı üç dönemde de aynı bulundu. Dutrillaux ve arkadaşları (48) ise, 3. dönemde elde edilen SCE'leri daha az buldular ve bunun nedenini ortamda kalan BrdU miktarının 3. dönemde azalmış olmasına bağladılar.

2.3.3. in Vivo Çalışmalarda SCE.

SCE çalışmaları in vitro ve in vivo şartlarda yapılabilir. İnsanda in vivo çalışmalar çok yaygın değildir. Yapılması zordur. Herhangi bir mutajenin in vivo etkisini gözlemek için insana bunu vermektan çok, özellikle bir ilacın etkisini gözlemek amacıyla kullanılır. in vivo çalışmalar fare, sıçan, Çin hamster (CHO) gibi memelilerin veya vicia fabanın kromozomlarında yapılmıştır. in vivo olarak fareye yer fıstığı halojenatı veren araştırmacılar halojenatın toksik etkisini gözleyememiş, fakat uygulanan her dozda SCE indüksiyonunda artış kaydetmişlerdir. Bu artış bazal seviyeden yaklaşık iki kat fazladır (18).

2.3.4. Spontan SCE Düzeyi.

SCE eldesinde kullanılan timidin analogları herhangi bir radyasyon yapmadığından bu metodla elde edilen SCE'lerin spontan SCE olacağı düşünülür. Oysa durum bu kadar basit değildir. Memeli kromozomlarına BrdU'nun girmesi kromozom kırıklarına ve yeniden düzenlemelerine yol açar. BrdU'nun kendisi de bir SCE indükleyicisidir. Bu nedenle mutajenlerin kromozomlara etkisini gözlemede kullanılacak BrdU dozunun minimum olması önerilmiştir (45). Tice ve arkadaşları raporlarında (1976) BrdU'nun belirli bir konsantrasyonunun altında insan kromozomlarının boyanmaya cevap vermediğini gösterdiler (46).

Çin hamster hücreleri ve insan hücreleri ile çalışan araştırmacılar, BrdU'nun yüksek konsantrasyonlarında SCE 'nin arttığını, BrdU'nun düşük konsantrasyonlarında ise hafifçe düştüğünü gösterdiler (35,45,48). Fare, sıçan, balık, zehirli yılan, tavuk embriyosu gibi birçok canlıda spontan ve indükte SCE değerleri saptandı. Bir grup araştırmacı da vicia faba ile çalıştı-

lar. *Vicia faba*'nın DNA içeriği, memeli hücrelerinden 6-8 kat daha fazla bulundu. Toplam 12 kromozomu olan *vicia faba*'da hücre başına ortalama 20 SCE gözlemlendi. Buna göre kromozom başına düşen SCE sayısı memeliden daha fazlaydı. Hindistan muntjac (bir maymun türü) kromozomlarında ise hücre başına ortalama 7.25 SCE gözlemlendi. Toplam 6 kromozomu olduğundan kromozom başına düşen SCE oranı 1.25 olarak bulunmuştur (31,48).

Spontan SCE düzeyinin insanda da belirlenmesi önemlidir. Özellikle mutajenlerin etkisini inceleyebilmek için spontan SCE düzeyini bilmek gerekir. BrdU'nin değişen konsantrasyonlarında bir grup araştırmacı spontan SCE düzeylerini saptamıştır (1, 7, 16, 20, 25, 37, 47, 50). Wulf ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; 1,4-19,2 yaşlarındaki kız çocuklarında 3,8-10,33 SCE/hücre 2,6-18,7 yaşlarındaki erkek çocuklarında 3,7-8,7 SCE/hücre değerlerini gözlediler (50). Tucker ve arkadaşları 10 µM/L dozda BrdU ile çalışmış ve 8,36 ± 0,99 SCE/hücre oranını gözlediler (47). Sinha ve arkadaşları 10 µg/ml dozda BrdU kullanarak sigara içmeyenlerde 7,53, içenlerde ise 9,14 SCE/hücre oranını gözlediler (37). Nagaya ve arkadaşları 10 µg/ml BrdU çalışıp spontan SCE oranı olarak 9,8 ± 1,4 SCE/hücre, kültüre 5 ng/ml dozda mitomisin C koyduklarında indükte SCE oranını ise 11,9 ± 2 olarak gözlediler (25). Carrano ve arkadaşları 10 µM/ml BrdU dozajında 7,03 ± 0,24 SCE/hücre olarak saptadılar (7). Kadam ve arkadaşları 1 µg/ml dozda BrdU kullanarak periferel kanda yaptıkları çalışmada 5,16 ± 1,3 SCE/hücre oranını gözlediler (20). Hedner ve arkadaşları 10 µM/L BrdU kullanarak kronik alkoliklerde yaptıkları çalışmada 11,3, kontrol grubunda ise 8,5 SCE/hücre değerini gözlediler (16). Türkiye'de yapılan bir araştırmada bu oran 10µg/ml BrdU konsantrasyonu için 8.18 bulunmuştur (1).

2.3.5. Yaş ve Cinsiyetin Etkisi.

Yaşın SCE'e etkisi üzerinde çalışan bazı araştırmacılar (Galloway ve Evans, 1975; Cabert ve Lindblad, 1980; Carrano ve Moore, 1982) önemli bir etki gözlenmediğini bildirirken (10), buna

karşılık Soper ve arkadaşları (1984) anlamlı bir fark olduğunu bildirmişlerdir (50). Wulf ve arkadaşları ise küçük çocuklarda SCE oranının yetişkinlerden daha düşük olduğunu belirtmişlerdir (50).

Cinsiyete göre SCE frekansının değiştiği konusunda genelde araştırmacılar aynı görüşte olup dişilerde daha yüksek olduğunu gözlediler (10,50). Wulf ve arkadaşları özellikle 10-14 yaşlarında dişilerde gözlenen SCE frekansındaki fazlalığın o dönemde salgılanan hormonlardan kaynaklanabileceğini bildirdiler (50). Spontan SCE/hücre oranı kızlarda 3.8-10.33, erkeklerde 3.7-8.7 arasında olduğu saptanmıştır (50).

2.3.6. İnsan Genetik Hastalıklarında SCE.

Fanconi anemisi, Bloom sendromu ve Ataxia Telanjektazi; kromozom aberasyonlarının olması ve kansere hassasiyetin artması ile karakterize genetik hastalıklardandır. Bloom sendromlu hastalarda SCE sayısının normalin 10-13 katı olduğu gösterilmiştir (16,20,21,27,47).

Bir DNA onarım eksikliği olan Kseroderma Pigmentosumda SCE normal iken, SCE indüksiyonu yapan kimyasal ajanların etkisi bu grupta normalden fazla olduğu saptanmıştır. Fanconi anemisinde ise mitojen bir ajan olan mitomisin C'nin etkisi daha az olup, bu vakalarda kromatid kırıklarının arttığı bildirilmiştir (20,48).

Frajil X ve frajil bölgeler konusunda çalışan araştırmacılar DNA polimeraz α 'nın spesifik bir inhibitörü olan aphidicolin ile çalıştılar (12). Aphidicolin, genel frajil bölgeleri fazla indüklerken frajil X'i zayıf indükler. Frajil bölgelerdeki SCE anlamlılığı bilinmemektedir. Frajil bölgelerdeki kırılmalar sonucu ekspresyonun tek mi yoksa çift zincir DNA'da mı olduğu yoksa lider kromozomlardaki delesyonların, yeniden düzenlenmelerin kromozom kondensasyonundaki arızadan mı olduğu bilinmemektedir (27).

2.3.7. Mutajenik Karsinojen İndikatörlerle Oluşan SCE'ler.

Bu konuda ilk çalışma Latt tarafından yapılmıştır. Latt DNA'da Crosslink yapan biyofonksiyonel alkali edici bir ajan olan mitomisin C varlığında insan lenfositleri ile çalıştı. Mitomicin C

özellikle düşük konsantrasyonlarda, SCE düzeyinde ve olağan kromozom aberasyonlarında artışa yol açar. Bu yönüyle SCE memeli kromozomlarında mutajenlerin etkisini gözlemek için iyi bir yöntem olarak kabul edilmektedir (15,17,31,43,47).

Perry ve Evans; 14 bilinen veya şüphelenilen karsinojenle mutajeni Çin hamster ovaryum (CHO) hücrelerinde test etti (29). Direkt etki eden mutajenler SCE verimini artırırken adiamicin, bleomycin gibi kemoterapikler kromozom aberasyonunu düşük oranda indükler. In vitro koşullarda SCE verimini artırmayan kimyasallar ise maleik hidrazid (memeli hücrelerinde mutajenik olmayan) ve efektif olarak metabolik aktivasyon kemoterapotik ajan siklo fosfamid idi. Fakat in vivo çalışmalarda hayvana siklo fosfamid verip kemik iliği yada spermatogonia ile çalışıldığında SCE de büyük artış gözlenmiştir. Yalnız bu artış ilacın etkisi geçtikten sonra ortadan kalkmaktadır.

Doku kültürüne efektif mutajen veya karsinojen ilavesinden önce aktive edici sistem olarak metabolik aktivatör kullanılabilir. Natarajan ve ark.'la Stetka ve Wolff, CHO ile yaptıkları çalışmalarda birçok kimyasalı aktive etmek için DPNH jenerasyon sistemi ile sıçan karaciğer mikrozomlarının ekstraksiyonunu ekleyerek olağan SCE'ler de aktivasyona neden olduğunu göstermişlerdir (48).

Çeşitli metabolik olaylarda ve defektif hücre ortamında, tedbirli seçilen fiziksel ve kimyasal ajanların kullanımı ile temel biyoloji ve biyokimya hakkında ipucu sağlamak için SCE araştırmaları ve SCE formasyonu kullanılmıştır.

Xeroderma pigmentozum (XP) hücreleri normal hücrelere oranla UV ve X-ışınına daha hassastır. XP hücreleri kimyasalların etkisini incelemede kullanılan en tercih edilen hücrelerdir (33,49).

2.3.8. UV ile İndüklenen Mutasyonlar ve DNA Onarımı.

Birçok organizmada kendiliğinden oluşan defektlerin DNA onarım mekanizması ile en aza indirilerek genetik materyalin bütünlüğü korunmuştur. E.coli'de UV'nin mutajen etkisi ve UV'nin rolü, DNA'nın enzimatik onarımında araştırılmıştır. UV, primidin dimerlerinde şekil değişimi yapar. Bu değişime Timidin-timidin

dimerleri sitozin-sitozinden daha meyillidir. Mutasyonlar UV duyarlılığını artırırken, pirimidin dimerlerinin onarım kabiliyetini yada onarılmamış pirimidin dimerlerindeki tolerans kabiliyetini azaltır. Fakat mutasyon oranı çok fazla ise tolerans düşer.

SCE, DNA bozukluğunu ve onarım işlevlerini kromozomal seviyede gösterebilen bir test olarak bilinir. Vücuttaki total DNA'nın %1'inden daha az bir bölümündeki kayıp bile SCE ile rahatlıkla tesbit edilip, SCE analizi ile kolayca anlaşılabilir (1,19).

UV ışığının indüksiyon etkisi (33,35) araştırmacılar tarafından otozomal resesif geçiş gösteren Cockayne sendromu ve Kseroderma pigmentosum hastalarında denenmiştir. Kseroderma pigmentosum ve Cockayne sendromu, DNA lezyonlarının onarım defektinden kaynaklanmıştır. Bu hastalarda UV ile, kromozomal aberasyon ve SCE'ler artmıştır. Cockayne sendromlu hastaların fibroblastlarının büyüme karakteri zayıf olduğundan, bu hastalarda çalışma yapmak zor olup Kseroderma pigmentosum da UV ile indüklenme Cockayne sendromundan fazla olduğu gözlenmiştir (34,48,49).

Alkali ajanlarla muamele edilen hücreler, anlamlı olarak replikasyon sonrası onarımını inhibe eden kafeinle muamele edildiğinde SCE'lerin veriminin artmadığı gözlemlendi (33,48)

2.3.9. SCE Formasyonundan Sorumlu Lezyonlar.

SCE'lere yol açan lezyonlar tam bilinmemektedir. SCE frekansını birçok ajan artırır. Bu ajanlar [³H]-timidinden kaynaklanan β partikülleri, X-ışını, UV ışığı ve kimyasal mutajenlerdir (48). UV ışığı ve kimyasal mutajenlere maruz kalan hücreler S fazında uzun ömürlü lezyonlara neden olurken SCE'lerde artış gözlenmiştir. Fakat G₂ döneminde oluşan lezyonlar SCE'lerde artışa neden olmamıştır. UV ışığı ile DNA da etkili olarak oluşturulan uzun ömürlü lezyonların timin dimerleri olmadığı, onarım eksikliği olan hücre deneylerinde gösterildi (5,33).

Farklı onarım kapasiteli XP hücrelerinde SCE oluşumu için hassasiyet onarım miktarıyla ilişkili değildir. SCE'lerin verimi hücrede mevcut timin dimerlerinin rezidüel miktarından bağımsız olarak gözlemlendiği ifade edilir. XP hücreleri kimyasal ajanlara ve

UV ışığına hassastır. Bu hassasiyet UV, X-ışını gibi kimyasal ajanlar için doğrudur. XP'da lezyonların onarılmasına rağmen SCE'ye neden olan ufak bir rezidüel miktar harabiyet vardır. Lezyonun bizzat kendisi karakterize edilememiş olmasına karşın etilnitroso üreli deneyler 0-6 pozisyonunda alkilleşen guaninin sorumlu olduğu düşünüldü (48). Etilnitrosoüre, XP hücrelerinde SCE verimini artırır; ayrıca N-7 pozisyonuna göre guanin 0-6 pozisyonunda büyük oranda alkilizasyon yapar (48).

Guaninle reaksiyona giren monofonksiyonel alkil yapan ajanlarla muamelesinden sonra DNA pürini kaybetmeye başlar. Bu da genelde tek strand kırıklarına yol açar. Bu durum alkilizasyonu takiben depürinizasyonun SCE'lere neden olduğuna işaret eder. Bu kuşku, BrdU'li hücre kültürlerinde görünür ışığın SCE sayısını artırmasıyla desteklenir. DNA yüksek pH'ya ışığa maruz kaldığı zaman tek strand kırıklara yol açan alkili-labil yerler oluştuğu ve böylece görünür ışık BrdU içeren DNA'nın fotolizisine neden olduğu bildirilmiştir (48).

SCE indüksiyonu, olağan kromozom aberasyon indüksiyonundan bir çok tarzda farklıdır (48,49).

1. SCE'ler bir kaç aberasyon yapan kimyasalların konsantrasyonunda yüksek frekansta oluşabilir.
2. SCE'ler iyonize radyasyonun düşük dozlarıyla belirgin olarak artmaz iken aberasyonlar artar.
3. SCE'ler iyonize radyasyon ve [³H] timidin konsantrasyonunun artan dozlarıyla satüredir. Fakat aberasyonlar satüre değildir.
4. Kafeinle muamelede SCE'ler kromozom aberasyonuna göre farklı olarak reaksiyona girerler.
5. SCE'ler; Bloom sendromu, AT, Fanconi anemisi gibi hastalıklarda görülen artan aberasyonlarla tutarlı tarzda aynı değildir. SCE, Bloom sendromunda çok yüksek, AT'de normal, Fanconi'de ise düşüktür.

SCE'ler kromozom aberasyonlarına neden olanlardan temelde farklı hücresel lezyonların ve yöntemlerin sonucu olabildiği görülür. Aberasyonlar hücre ölümüyle beraberdir. Oysa SCE'ler böyle görünmezler. SCE'ler daha çok mutagenesis gibi hücresel kalıtım ile

ilgili olayları temsil eder. SCE'ler eşit miktarda değiş-tokuşa uğraması nedeniyle genetik olarak nötral olmalarına rağmen az da olsa eşit olmayan delesyona, translokasyona, inersiyona, çatı kayması ve mutagenезise yol açabilir. Tüm bunlara rağmen SCE'nin gerçek biyolojik anlamı hala tam bilinmemektedir (23,24).

Nörofibromatosis de normal ve hasta grup arasında spontan SCE arasında fark yokken radyasyona cevapta anlamlı bir fark vardır. Birçok çalışmada SCE formasyonu ile DNA zararlanması arasında ilgi vardır. Farklı mutajenlerle onarımda farklı cevaplar alındı. Bilinmeyen SCE süreçlerinde mekanizmalar komplekstir. Radyasyonun etkisi ile lenfositler de gaplar kırılmalar ve disentromer oluşumunda artış gözlenebilir. Kromozomal instabilite artışı radyasyon dozlarındaki artma ile ilgilidir (15).

Tütün, alkol, diet, iş tehlikesi gibi mutajenlerin mutajenitelerini sınıflandırmak için ames testi SCE ile birlikte kullanılır. Kanserin gelişimi tüm kişilerde aynı değildir. Farklı kişilerin mutajenlere duyarlılıkları farklıdır. Sağlıklı kişilerde yaygın mutajenlerin biyolojik etkisi tahmin edilir. Kansere mani olmak için mutajen duyarlılığını bulmak önemlidir. Mutajenler in vivo ve in vitro olarak insan lenfositlerini indükler. İndüklenme durumunda artan SCE frekansı meslek kanserlerinin oluşum nedenlerinden biridir (16).

2.3.10. Lösemi Lenfoması ve SCE.

Kronik miyelositik lösemi (KML) inaktif döneminde SCE düşük iken aktif döneminde yaklaşık 10 kat artar. Tedavi edilen KML'li hastalarda SCE frekansı, edilemiyenlere göre yüksektir. SCE'in hastalığın seyri ile ilişkili olması, hastalığı biyolojik ilerlemesinin yanısıra kemoterapi ve enfeksiyon gibi diğer nedenlerden etkilenebileceğini düşündürmüştür (42).

47 lenfomalı hastada SCE sıklığı kontrol grubuna nazaran iki misli daha fazla bulunmuştur. Tedavide cytoxan alanlarda SCE sıklığı kullanmayanlardan daha yüksek gözlenmiştir. Radyoterapi alanlarda SCE sıklığı kemoterapi alanlardan daha düşük bulunmuştur.

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Denek Grubu.

Yaşa bağılı olarak SCE sayısında değişim olup olmadığını saptamak amacıyla yaptığımız çalışmada toplam 20 kişiden periferik venöz kan alındı.

I. grup 1-3 yaş grubundaki çocuklardan; II. grup ise 16-20 yaş arasındaki yetişkinlerden oluştu. Her grup 10 ar denegi içeriyordu.

Denekler sigara ve alkol kullanmayanlardan ve son iki ay içinde viral enfeksiyon geçirmeyenlerden seçildi.

Laboratuvar şartlarında çalışan kişilerde SCE oranındaki değişimi saptamak amacıyla yaptığımız 2. çalışmada Merkez Laboratuvarında çalışan, kimyasal maddeler ile direk ilgili olan 5 kişi ve laboratuvar dışı çalışan 5 personelden kan alındı.

3.2. Gereç ve Yöntem.

3.2.1. Kromozom Çalışmalarında Uyulan Kurallar.

Tüm kromozom çalışmalarında olduğu gibi, bizim çalışmamızda da özellikle hücre kültüründeki kontaminasyon olasılığını azaltmak için steriliteye özen gösterildi. Besiyerleri daha önceden hazırlanan steril kaplara konularak çalışıldı. Kromozom çalışmaları sırasında optimum miktarda hücre elde etmek için:

- Sterilite
- Kültür kapları ve yatakları
- Vasat ve zenginleştiriciler
- Sıcaklık
- pH
- Osmotik basınç
- Gaz fazı

Koşullarının sağlanmasına özen gösterildi.

Kolay elde edilen; ayrıca bol ve kaliteli mitoza sahip doku

olduğundan, kromozom çalışmaları periferik kan kullanılarak yapıldı (5,19).

Periferik kan ile yapılan kromozom çalışmalarında değer taşıyan hücre lenfositlerdir. Sağlıklı bir erginde lökositlerin tam diferansiye formları hiçbir zaman aktif üreme göstermez iken, sadece lenfositler uygun koşullar sağlandığında bölünebilirler. O yüzden genetik açıdan büyük önem taşırlar (5,19).

3.2.2. Periferik Kan ile Kromozom Çalışma Yöntemi.

Periferik kan ile yaptığımız kromozom çalışmasında, ilk kez 1960 yılında Nowell tarafından yapılan ve Moorhead ve ark. tarafından geliştirilen yöntem kullanılmıştır (19). Bu amaçla deneklerden 1 cc venöz kan alındı. Eğer hemen ekim yapılabilecekse heparinize kan almaya gerek görülmedi. Ekim steril bir ortamda yapıldı. Bu amaçla hava akımının olmadığı bir odada, bek arkasında ekim işlemleri yapıldı. 2,5 cc besiyerine 4 damla kan damlatılarak ekim tamamlandı. Deneylerde RPMI 1640 ile hazırlanan besiyeri kullanıldı. Hazırlanan besiyerine kan ekiminden hemen sonra 10 µg/ml konsantrasyonda BrdU ve 10 µg/ml konsantrasyonda deoksi sitedin (dC) solüsyonları eklendi. Bazı deneklere ise sadece BrdU eklendi. 37°C da 70 saat inkübe edilen kültürlerle 10 µg/ml olacak şekilde kolşemid ilave edildi. 1,5-2 saat tekrar 37°C'da inkübe edildi. Kültür 10 dakika 800-1000 rpm/dak. santrifüj edildi. Çökeltinin üzerinde 0,5 cc solüsyon kalacak şekilde üstteki süpernatant atıldı. Karışım süspansiyon haline getirildikten sonra hipotonik solüsyon (0,075 M KCl solüsyonu)'dan 4 cc ilave edildi. 37°C de 20 dakika inkübasyondan sonra tekrar santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. İki saat önceden hazırlanıp +4°C de ağzı kapalı olarak bekletilen fiksatif (3:1 metanol; gliseal asetik asit)'ten 4 cc alınarak, üzerine yavaş yavaş eklendi. 10 dakika oda ısısında bekletilip, tekrar santrifüj edildi. Süpernatant atılarak 4 cc fiksatif eklendi. Bu işlem 3-4 kez tekrarlandı. Renk beyaz oluncaya kadar fiksatif kondu ve buzdolabında bir gece bekletilen solüsyon ertesi gün santrifüj yapıldı. Bir miktar taze fiksatif ilave edildi. Sonra, soğuk distile suda bekletilen lamlara yayıldı.

Yayma işlemi oda ısısında, düz bir zemine konan lamlara 30 cm kadar yukardan Pastör pipetiyle damlatılarak uygulandı. Kurutulan preparatlarda SCE rezolüsyonunu sağlamak için gerekli işlemlere geçildi.

3.2.3. SCE Çalışma Yöntemi (6,30).

1. Yukarda anlatıldığı şekilde preparatlar hazırlandı.
2. 254 nm dalga boyunda UV. ile 30 dakika ışınlandı. Bu esnada preparatlar yüzeylerini hafif bir film tabakası şeklinde örten Sörensen tamponu ile hazırlanan ışınlama solüsyonunda tutuldu.
3. Işınlama bittiğinde solüsyon fazlası bir filtre kağıdı ile alındı.
4. Su banyosunda 1.SSC (salin sitrat solüsyon)'da 60°C de 1 saat inkübe edildi.
5. Preparat üzerindeki SSC fazlalığı filtre kağıdı ile alındıktan sonra boyama solüsyonu ile boyandı. Bu solüsyon Sörensen tamponu ile hazırlanmıştı.
6. Hazırlanan preparatlardan her denek için 15 metafaz plağı incelendi. SCE analizlerinde aynı anda bantlama yapılamadığından örnekler, Denver yöntemine göre değerlendirildi. Buna göre Y kromozomu G grubunda, X kromozomu ise C grubunda sayıldı.

3.2.4. Kullanılan Solüsyonlar (5,19).

Besi Yeri.

Materyal	Derişiklik	Hacim (ml)
RPMI 1640	1X	100
Calf serum	-	20,0
L-Glutamin	200 mM(100X)	1,0
Penisilin/	10.000IU/ml+	
Streptomysin	10.000µg/ml	1,0
Sodyum bikarbonat	%7,5	1,0
PHA	-	1,5

Sörensen Tampon.

11,34 g KH_2PO_4 alındı ve distile su ile 250 ml'ye tamamlanarak

A Solüsyonu hazırlandı.

14,83 gr Na_2HPO_4 alındı ve distile su ile 250 ml'ye tamamlanarak B solüsyonu hazırlandı.

Işınlama Solüsyonu.

5 ml A solüsyonu

5 ml B solüsyonu

90 ml distile su ile hazırlandı.

Boya solüsyonu (SCE değerlendirilmesi için).

5 ml A solüsyonu

5 ml B solüsyonu

5 ml Giemsa boya

85 ml distile su ile hazırlanan, filtre kağıdından geçirilerek süzülen karışım, boyama solüsyonu olarak kullanıldı.

Salin Sitrat Solüsyonu (SSC).

21,9 gr. NaCl

11,05 gr. trisodyum sitrat.2 H_2O

500 ml su ile tamamlandı.

Hazırlanan bu solüsyon 5.SSC'dır. Buz dolabında bekletildi. Konsantre durumda olan (5.SSC) bu solüsyon gereğinde sulandırılıp 1.SSC haline getirilerek kullanıldı.

BrdU (5 Bromo deoksiüridin).

30,7 mg BrdU 10 ml saf suda eritildi. Dondurularak saklandı.

Son konsantrasyon 10^{-4} M olacak şekilde kullanıldı.

dC (Deoksi sitidin hidroklorür).

28 mg dC 10 ml'de eritildi. Son konsantrasyon 10^{-4} M olacak şekilde distile su eklendi.

Boyama Solüsyonu (preparatların Denver yöntemine göre değerlendirilmesinde ve sentromer bantta kullanılan).

Genetik laboratuvarımızda rutin amaçlı çalışmalarda BrdU

içermeyen kültürler ile çalışarak hastalardan kromozom preparatları hazırlandı. Bu çalışmalarda özellikle sayı anomalilerini saptamada, genelde Denver yöntemine göre değerlendirme yapıldı. Bu yöntemde kromozomlar sentromerin yerine ve kromozomun boyutuna göre 7 alt grupta incelendi. Giemsa Gurr solüsyonu hazırlanarak boyandı. Bu solüsyon :

5 ml Giemsa

10 ml pH 7 olan PBS (fosfat tamponlu salin)

85 ml distile su ile hazırlanan boya solüsyonu kullanıldı.

PBS (fosfat tamponlu salin).

NaCl 8,0 gr

KCl 0,2 gr

Na₂HPO₄ 0,92 gr

KH₂PO₄ 0,2 gr

distile su ile bir litreye tamamlanarak hazırlandı.

Boya solüsyonunun taze olmasına dikkat edildi. Hazırlanan boya solüsyonu filtre edilerek kullanıldı. Preparatlar 7-10 dakika boya da bekletildi. Yıkılarak kurutuldu.

Giemsa bantlama ile ilgili resimler, tripsin kullanılarak hazırlanan preparatlardan çekildi. Kullanılan preparatların 2-3 gün yaşlandırılmış olmasına dikkat edildi.

Fosfat Tamponu Hazırlanması.

0,025 M KH₂PO₄ la (3,4 gr/lt) hazırlanan solüsyon PH:6,8 oluncaya kadar, % 50'lik NaOH ile titre edildi.

Tüm solüsyonların hazırlanmasında Merck ve Sigma kimyasal maddeleri kullanıldı.

3.2.5. Giemsa Bantlama.

Bu amaçla bir çok farklı yöntem uygulanmakta olup bizim çalışmamızda bantlar en çok kullanılan tripsin uygulanarak elde edilirdi. Bu amaçla, 0,0125 mg bacto tripsin 100 ml PBS'de çözülerek tripsin solüsyonu hazırlandı. 37 °C su banyosunda bir şale içerisinde bulundurulmuş tripsin solüsyonuyla preparatlar 0,5-1,5

dakika muamele edildi. PH:6,8'lik fosfat tamponu ile hazırlanan Giemsa Gurr ile boyandı. Preparatlar distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı (2,19).

3.2.6. Preparatların Hazırlanması ve Değerlendirilmesinde Kullanılan Araçlar.

Ekim yapılan besiyerleri 37°C de, O₂ ve CO₂ oranı ayarlanabilen inkübatörde inkübe edildi (Heraeus Type B 5061 EK/CO₂). Periferik kan kullanarak yaptığımız çalışmada kapalı kültür uygulandığından O₂-CO₂ oranı ayarlanmadı.

Santrifüj işlemlerinde, 800-1000 rpm'e ayarlanabilen santrifüj kullanıldı (Sorvall GLC-1).

Işınlama işlemi için, 254 ve 366 nm dalga boylarını içeren UV kabini kullanıldı (Camag 254/366 nm).

Su banyosu gerektiren işlemler için, 60°C'a ayarlanabilen Ben Mari kullanıldı (Elektro-Mag).

Hazırlanan preparatların değerlendirilerek, resimlerinin çekilmesi için Olympus marka mikroskop ve otomatik resim çekme düzeneği kullanıldı (Olympus BH-2 mikroskobu, Olympus AD sistem Exposure Control Unit).

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde student t-testi uygulandı (STATGRAPHICS Vers. 3.0 ORGST).

BULGULAR

Yaşa bağılı gelişen ve laboratuvarında kimsiyal ajanlarla çalışılması sonucunda oluşabilecek SCE sayılarının araştırıldığı bu çalışmamızda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

1) SCE frekansının yaşa bağılı gösterdiği değişiklikler Tablo 1-3'te sunulmuştur:

Tablo 1. Erişkin gruba ait 15'er alanda gözlenen SCE sayıları.

Denek	A	B	C	D	E	F	G	Toplam
1	46	23	36	14	9	1	1	129
2	38	20	31	15	6	2	1	113
3	46	27	28	16	10	2	1	130
4	45	24	35	14	8	2	-	129
5	44	22	35	15	8	2	1	126
6	45	22	34	15	8	1	-	125
7	43	21	33	13	8	1	-	119
8	42	20	33	14	7	-	1	116
9	44	21	34	14	9	-	-	122
10	44	20	32	11	8	1	1	117

* A,B,C,D,E,F,G Denver yöntemine göre adlandırılan kromozom gruplarını göstermektedir.

Erişkin grubunda büyük kromozomlarda SCE sayısı daha fazladır.

Tablo 2. Çocuk grubuna ait olan deneklerin 15'er alanında gözlenen toplam SCE sayıları

Denek	A	B	C	D	E	F	G	Toplam
1	29	15	18	8	4	2	1	77
2	31	15	22	11	4	2	1	86
3	29	14	22	9	5	1	-	80
4	30	18	21	10	4	1	-	85
5	30	16	18	9	4	2	-	79
6	31	15	20	10	4	1	-	81
7	31	18	21	8	4	1	-	83
8	28	15	18	9	4	1	1	76
9	29	13	21	9	5	-	-	77
10	32	15	22	10	5	1	-	85

Çocuk grubunun büyük kromozomlarındaki SCE sayısı daha fazladır.

Tablo 3. Çocuk ve Erişkin grubuna ait hücre başına düşen ortalama SCE değerleri.

Denek	Çocuk Grubu	Erişkin Grubu
1	5.1	8.6
2	5.7	7.53
3	5.3	8.66
4	5.6	8.6
5	5.2	8.4
6	5.4	8.33
7	5.53	7.93
8	5.06	7.73
9	5.13	8.13
10	5.66	7.8
Genel Ort. (±SD)	5.39± 0.25	8.17± 0.41

$t = -18.51$; $p < 0.001$ bulundu.

Erişkin grubundaki ortalama SCE değeri daha yüksek bulunmuş olup bu fark anlamlıdır ($p < 0,001$).

2) Laboratuvarda çalışan ve çalışmayan gruplarda gözlenen SCE değerleri tablo 4-6'da gösterilmiştir.

Tablo 4. Laboratuvar personelinde gözlenen SCE değerleri

Denek	A	B	C	D	E	F	G	Toplam
1	45	21	35	14	9	1	1	125
2	45	22	35	15	9	1	-	126
3	46	20	34	12	8	1	-	121
4	45	21	33	13	9	2	-	123
5	46	20	34	15	8	1	1	124

Büyük kromozomlardaki SCE frekansı daha yüksektir.

Tablo 5. Laboratuvar dışı personelde gözlenen SCE değerleri.

Denek	A	B	C	D	E	F	G	Toplam
1	45	21	34	13	9	1	-	123
2	44	21	33	15	8	-	1	122
3	46	23	31	15	8	-	-	123
4	45	24	32	15	9	-	-	125
5	42	24	30	15	8	2	-	121

Büyük kromozomlardaki SCE frekansı daha yüksektir.

Tablo 6. Personelde gözlenen hücre başına düşen ortalama SCE değerleri.

Denek	Laboratuvar Personeli	Laboratuvar Dışı Per.
1	8,33	8,2
2	8,4	8,13
3	8,07	8,2
4	8,2	8,33
5	8,26	8,07
Genel Ort(\pm SD)	8,25 \pm 0,13	8,19 \pm 0,10

$t= 0,926$; $p>0,05$ bulundu.

Ortalama SCE değerleri açısından, iki grup arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$).

TARTIŞMA

Kromozom analiz metodlarından biri olan ve özellikle mutajenlerin etkisini gözlemek için kullanılan SCE yöntemini laboratuvarımızda kurmak ve geliştirmeyi amaçladık.

Mutajenlerin etkisini gözleyebilmek için önce yaşa bağlı ortalama değerleri saptamayı hedefledik. Laboratuvardan laboratuvara değiştiği düşünülen ortalama SCE değerlerini laboratuvarımız için saptamak ve bu oranda yaşa bağlı bir fark olup olmadığını gözlemeyi amaçladık.

Kromozom elde etme yöntemlerinden en fazla kullanılan metod periferik kanla çalışılan yöntemdir (2,4,5,19,42,44). Kolay elde edilebilir olması ve kaliteli metafazlar elde edilmesi nedeni ile biz de periferik kan ile çalıştık. SCE yöntemi, kardeş kromatidlerin birbirinden farklı boyanarak ayırdedilebilmesi temeline dayanır. Bunu sağlamak amacıyla replikasyon sırasında timin bazı yerine geçebilecek timin analogu olan 5 BrdU kullanıldı (1,5,9,21,-48,49).

Kromatidler arasındaki rezolüsyon farkını 1958 yılında otoradyografi yöntemi ile ^3H timidin varlığında ilk gösteren kişi Taylor olmuştur. Daha sonra gelen araştırmacılar timin bazı analogu olarak 5BrdU kullanmışlardır. Bu durumda kromatidler arasındaki rezolüsyon daha da artmış, SCE'ler daha kolay gözlenmiştir (19,27,35,36).

Kültür ortamına eklenen BrdU miktarı ile metafaz plağı sayısı arasında (20,47,48) ilişki vardır. BrdU konsantrasyonu arttırıldığında mitotik index daha da azalmakta ve belirli bir oranın üzerinde hemen hemen tümüyle ortadan kalkmaktadır. Ortama BrdU yanında deoksisitidin (dC) ilavesiyle (19) BrdU'nun toksik etkisi kısmen ortadan kalkmaktadır. Bizim çalışmamızda da, dC eklenen örneklerde mitotik indeksin daha fazla olduğu gözlenmiştir (19).

Bizim kullandığımız SCE yönteminde preparatlar UV ile

ışılanmıştır. Işınlamada kullanılan UV'nin dalga boyu son derece önemlidir. Işınlama karanlıkta yapılmış, preparatların güneş ışığı almamalarına dikkat edilmiştir. 254 nm dalga boyundaki ışınlamada SCE rezolüsyonu daha iyi gözlenmekte iken, 366 nm dalga boyundaki ışınlamalarda hemen hiç SCE kaydedilememiştir. Bir çok araştırmacı da, benzer bulgular elde etmiştir(2,8,19,40). Çalışmamızda ışınlama mesafesi 15-20 cm olarak seçilmiştir. BrdU ile hazırlanan preparatlarda SCE 'in gösterebilmesi için uygulanan yöntemler arasında Floresan-Puls Giemsa tekniği, bunun modifiye tipleri ya da UV kabinine ihtiyaç duyulmayan Korenberg yöntemi bulunmaktadır (2,6,19,30). Bizim kullandığımız yöntem, floresan puls giemsa tekniğinin modifiye bir şeklidir.

Çalışmamızda floresan puls giemsa tekniğinin uygulanamamasının nedeni, bu amaçla kullanılan bisbenzimidazol boyası (Hoechst 33258) nin sağlanamamasıdır. SCE eldesinde kullanılan Korenberg yöntemini deneyemememizin nedeni ise gerekli ısıya çıkabilecek su banyosunun laboratuvarımızda bulunmayışıdır.

Hücre kültürünü metafazda durdurmak amacıyla kullandığımız colcemid solüsyonunun yüksek konsantrasyonda olması ya da hücre kültürünün colcemidde uzun süre tutulması ile kromozomların boyları çok kısalır ve kondanse alanlar elde edilir. Kültürde colcemide maruz bırakılma süresi çok azaldığında da yeterli mitoz elde edilememektedir. Bu nedenlerle, en ideal sürenin belirlenmesine çalışılmıştır. Özellikle SCE çalışmalarında, kromozom boylarının kısa olması SCE sayısının sağlıklı saptanamamasına yol açmaktadır. Bu da yanlış sayımlara neden olarak, hücrelerdeki SCE değerlendirilmesini olumsuz yönde etkilemektedir (19).

Rutin amaçla kullanılan periferik kan kültürlerinde, ekimden yaklaşık 70 saat sonra colcemid eklenir. Zamanlama çok önemlidir, çünkü bu dönemde hücreler metafaza girmek üzeredirler. İyi bir zaman ayarlaması ile, bol sayıda metafaz plağı elde edilir.

Bir çok araştırmacı tarafından desteklendiği gibi kromozomlar sentromerin yerine ve büyüklüklerine göre gruplara ayrılarak yapılan SCE değerlendirilmelerinde, büyük kromozomlardaki (özellikle A grubu) SCE frekansı daha fazla gözlenmektedir (51).

Kromozomların boyutları ile SCE sayısı arasında doğru bir orantı olup, G kromozomunun bu kurala uymadığı ve boyutu ile kıyaslanmayacak ölçüde SCE içerdiği bir çok çalışmada gösterilmiştir (1,19,20,48). Bizim çalışmamızda da, büyük kromozomlarda ve özellikle A grubunda fazla sayıda SCE gözlenmiş olup, kromozomlar küçüldükçe SCE sayısı azalmıştır. G grubu kromozomlarındaki SCE sayısının diğer küçük kromozomlardakinden daha fazla olduğu ileri sürülmüşse de, bizim gözlemlerimiz buna uymamaktadır (Tablo 1,2,4,5).

94 saat inkübasyondan sonra kültüre colcemid ilave ettiğimiz bir denemede, metafaz plak sayısında kısmen artma gözlenmiştir. İlk ekimden hemen sonra ortama konan BrdU'nin etkisi ile elde edilen metafaz plaklarının çoğu M3 döneminde (3. replikasyon sonunda) olduğundan, genelde SCE açısından değerlendirilemeyecek alanlar elde edilmiştir. Bu tür denemeler özellikle hücre döngü süresinin ve kinetiğinin araştırıldığı çalışmalarda kullanılmaktadır (4,18,19,27,39).

94 saatten daha fazla süren inkübasyonlarda, ortamdaki besiyeri genellikle kafi gelmemekte; bu da hücrelerin ölümüne neden olmaktadır. Bu nedenle periferik kan ile çalışılan hücre kültürlerinde en ideal süre 3 gün ya da maksimum 4 gün olarak belirlenmiştir (5,19).

Kromozomların değerlendirilmesi için hazırlanan preparatlar giemsa ile boyandığında sayı anormalliği sağlıklı olarak saptanırken; genellikle insersiyon, transplantasyon ya da transformasyonlar çok iyi gözlenmemektedir. Bu gibi durumlarda, preparatların bantlanması ile daha kesin sonuçlar elde edilmektedir (2,3,4,5,19,24,42). Kromozomlarda aynı anda hem SCE, hem de bantlama yapılması ve bunun değerlendirilmesi çok zordur. O yüzden SCE yönteminde bantların yerini saptamak hemen hemen imkansızdır. Bu nedenle bizim çalışmamızda da ya bantlama yapılmış, ya da SCE yöntemi uygulanmıştır. SCE çalışması sırasında su banyosu sıcaklığının 56°C'ye inmesi durumunda, SSC bantları elde edilmektedir (2,4,42). Bizim çalışmamızda da, özellikle 2SSC'lik solüsyonlar kullanıldığında bant görüntülerinin daha iyi olduğu gözlenmiştir.

Kromozomların eldesinde en önemli faktörlerden biri de sıcaklık olup, bunun sınırları 37 ± 1 °C'dir. En ideal sıcaklık 37°C olup, 36°C'nin altında hücrelerde ölüm gözlenmemekte, fakat siklüs süresi değişmekte ve mitotik indeksin kalitesi, verimi azalmaktadır. Oysa 38°C'nin üzerinde (~ 39 °C) hücreler tümüyle ölmektedir 36°C'ın altında kalma durumunda süre de son derece önemlidir. Eğer bu süre kısa ise, kültür sonunda bunun tolere edilebilme imkanı daha kolay iken, süre çok uzadığında hücrelerin hücre siklüsünün neresinde olduğu bilinemeyeceğinden sağlıklı sonuç alınamamaktadır (2,4,19,42).

İnsan kromozomlarındaki replikasyon, eş zamanlı olarak gelişmez. Kromozomların farklı zamanlarda replike olmalarının nedeni bugün tam bilinmemektedir. BrdU varlığında kromatidler farklı boyanma özelliği gösterirler. Bu lateral asimetri, diğer kromatide oranla daha fazla timin içeren kromatid bölgelerini yansıtır. BrdU'in iki tam döngü boyunca ortamda bulunması halinde, BrdU'li DNA içeren bir kromatid bir polinükleotit zincirinde BrdU bulundururken, kardeş kromatid her iki zincirde de BrdU içerir. Homolog kromozomlar genellikle aynı anda replikasyona uğrarlar, fakat inaktif X kromozomu buna uymaz ve daha geç replike olur (19,47). Bu durum bizim preparatlarımızda da gözlenmiştir.

Preparatları hazırlarken karşılaştığımız güçlüklerin en önemlisi farklı kromatidlerdeki rezolüsyonun yeterli olmaması ve kromatidin yeterince koyu boyanamamasıydı. Bu durum özellikle resim çekme sırasında dezavantaj yaratacağından, bu konudaki eksikliğimiz 254 nm dalga boyundaki UV ışınlaması kullanılarak giderilmeye çalışılmıştır. Özellikle ilk elde ettiğimiz preparatlarda rezolüsyonun ideal ölçülerde olmamasının en önemli nedeninin UV kabininden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Kimyasal maddenin DNA üzerinde etkiye neden olan en önemli faktörler o maddenin konsantrasyonu, kimyasalın tipi ve DNA'yı etkileyebilme derecesidir.

SCE, kardeş kromatidler arasında özdeş segmentlerin simetrik olarak değişimi sonucu ortaya çıkar. Mutajenlerin etkisi ile kromozom DNA'sında meydana gelen ve replikasyon sırasında onarıla-

mayan hatalar SCE'lerin oluşmasına ve sayıca artmasına yol açar. Mutajenlerin etkisinin araştırılacağı her laboratuvarında önce ortalama SCE'lerin saptanması gerekir. Bizim çalışmamızda çocuk ve yetişkinlerdeki ortalama SCE sayılarının gözlenmesi ve aralarında bir fark olup olmadığının saptanması amaçlanmıştır. SCE sayısını etkileyen en önemli faktörlerden birisi BrdU'nun kullanma dozu olduğundan, tüm çalışmalarımızda sabit bir BrdU dozu (10µg/ml) kullanıldı. BrdU dozu arttıkça, genellikle SCE sayısı da artar; belirli bir dozdan sonra ise, BrdU'nun toksik etkisi nedeniyle hücrelerde mitoz son derece azalır ve hücre ölümleri gözlenir (1,5,9,47,48).

Çalışmalarımızda her metafaz plağında eşit sayıda SCE gözlenmemiştir. Bu nedenle her denekte 15 metafaz plağı değerlendirilerek, o bireydeki ortalama SCE sayısı saptandı (Tablo 1.2,4.5). Yetişkin grubunda elde ettiğimiz hücre başına düşen SCE sayısı (\pm SD) 8.17 \pm 0.41 iken, çocuk grubunda 5.39 \pm 0.25 bulunmuş olup, gruplar arasındaki bu fark anlamlı idi (Tablo 3; $p < 0,001$). Yetişkinlere ait olan bulgularımız, diğer bir çok araştırmacı tarafından da desteklenmektedir (7,47,50). Çocuk ve yetişkin gruplarındaki SCE sayıları açısından saptadığımız anlamlı fark ise, bazı çalışmalarda desteklenirken, bir kısım araştırmacı tarafından desteklenmemektedir (10,48,50).

Çeşitli kimyasal maddelere toksik dozajlarının in vivo ortamda saptanmasında genellikle CHO, rat, vicia faba veya fare kullanılmıştır (8,11,26,38). İnsanda ise kimyasal maddelerin etkisi in vitro ortamda değerlendirilmeye çalışılarak, DNA'da yaptığı hasar araştırılmıştır (1,18,48). Kimyasal ajanlarla direkt temasta bulunacak kişilerde, işe alınmadan önce ve alındıktan sonra belirli aralıklarla SCE analizi yapılarak, anlamlı bir fark olup olmadığı araştırılabilir. Kanser vakalarında kullanılan kemoterapinin DNA'daki etkisinin incelenmesinde yine SCE analizi kullanılabilir (1,12,15,19,22). Bizim çalışmamızda da kimyasalların etkisi araştırılmış olup; laboratuvarında çalışan ve kimyasal maddeler ile direkt ilgili olan kişilerle, laboratuvar dışı personele ait olan SCE değerleri Tablo 4-5'de verilmiştir. Her iki grupta benzer yaş

aralığında olup; sigara, alkol kullanmayan ve son bir ay içinde viral enfeksiyon geçirmeyen kişilerden oluşmaktadır. Laboratuvar personelinde gözlenen SCE frekansı (\pm SD) 8.25 ± 0.13 iken, etkilenmemiş personeldeki değer 8.19 ± 0.1 olarak gözlenmiştir.

İki grup arasındaki ortalama SCE değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 6; $p > 0,05$). Laboratuvar personelinde gözlenen SCE frekansının çok daha yüksek olmamasının nedeni, ortamdaki kimyasalların düşük konsantrasyonda bulunması ve çalışma ortamının yeterince havalandırılmasından kaynaklanabilir. Değerlendirilen vaka sayısının yetersiz olması nedeni ile bu konuda kesin bir yorum yapmak sakıncalıdır.

Laboratuvarımızda SCE yöntemini kurma çalışmalarımız 2 yıl önce başlatıldı. Bu dönemde hazırlanan ilk BrdU'lu preparatlar 6-8 ay sonra boyandıklarında, SCE'lerin bozulmadığı gözlemlendi. Preparatlar karanlık ortamda saklanmıştı. Kromatidler arasındaki rezolüsyon SCE sayımı için yeterli idi. 2 yıl sonra tekrar boyandıklarında ise, SCE gözlenmiyordu. Kardeş kromatidler arasında çok az bir ton farkı olmasına rağmen SCE'lerin sağlıklı değerlendirilmesi mümkün olmadı. Taze preparatlarda SCE yönteminin daha başarılı olduğu bilinmektedir. Aradan geçen uzun zaman BrdU'nun farklı boyanabilme özelliğini ortadan kaldırmaktadır. Preparat kutusunun gerektiğinde açılması sonucunda preparatların güneş ışınlarına maruz kalması da rezolüsyon farkını ortadan kaldırmaktadır (1,5,6,48).

Laboratuvarımızda geliştirilmeye çalışılan yöntemlerden biri de bantlamadır. Bu amaçla Giemsa bantlama (G bant) ve sentromer bantlama denenmektedir. Giemsa bantlamayı tripsin kullanarak yapmaktayız. Rutin amaçlı çalışmalarımızda sentromer bantlamayı özellikle cinsiyet tayinlerinde destekleyici olarak kullanmaktayız. Sentromer bantlama aynı zamanda sentromerde yoğun olan heterokromatinin boyutu hakkında da fikir vermektedir (2,4,5,42,-44).

SCE yönteminde olduğu gibi, bantlama preparatlarındaki metafaz plaklarında bulunan kromozomların boyutları ne kadar büyük ise, herhangi bir bant hatası da o kadar kolay gözlenir. Daha çabuk sonuç alınabilmesi için günümüzde kromozom preparatlarını okuyabi

len bilgisayarlı araçlar geliştirilmiştir. Bu tür bir alet ile çalışıldığında fotoğraf çekme ve resim basma işlemleri olmayacağından zaman kazanılmaktadır. Ayrıca çekilen resimlerin karyotip haline getirilmesi için gereken oldukça uzun bir süre de ortadan kalkmaktadır (2,42).

En sağlıklı kromozom analizi bantlama yöntemleri kullanılarak yapılmakta olup, en yaygın kullanılan metod giemsa bantlamadır. Bu yöntemin diğerlerine üstünlüğü preparatların daha uzun süre saklanabilmesi, çok yaşlanmış preparatlara da uygulanabilir olması ve ucuzluğudur. Bantlama ile kromozomlardaki translokasyon, transversion, inversiyon gibi şekil ve yapı anormallikleri kolayca gözlenerek, tanı konulabilmektedir (4,24,42,44). Amacımız tüm kromozom bantlama yöntemlerinin laboratuvarımızda kurulması ve özellikle Y kromozomuna spesifik bir boyama olan Sentromer bantlama yönteminin de geliştirilmeye çalışılmasıdır.

Kromozom analiz çalışmalarında normal ışık mikroskobu ya da floresan mikroskobu kullanılır. Elektron mikroskobu ile kromozomlar çok daha ayrıntılı olarak incelenebilirken, rutin işlemlerde kullanılması imkansızdır.

SONUÇ

Differansiyel bir replikasyon boya tekniği olan SCE yöntemini laboratuvarımızda kurmayı ve geliştirmeyi amaçlayan bu çalışmamızda;

Metafaz plaklarında gözlenen SCE sayısının kromozom büyüklüğüne paralel olarak artış gösterdiği;

Farklı kromozomlardaki replikasyon dönemlerinin eş zamanlı olmadığı; homolog kromozomlardaki eş zamanlı replikasyonun ise sadece inaktif X kromozomunda gözleendiği;

Yetişkinlerde gözlenen SCE sayısının çocuk yaştakilere oranla daha fazla olduğu;

Havalandırma koşullarının yeterli olduğu bir ortamda çalışan laboratuvar personeline gözlenen SCE sayısının normalden önemli bir sapma göstermediği;

Çok yaşlandırılmış preparatlarda BrdU'lu kromatidin farklı boyanma özelliğinin ortadan kalktığı; uzun süre bekletilmenin preparatların kalitesini SCE açısından bozduğu sonucuna varılmıştır.

ÖZET

Differansiyel bir replikasyon boya tekniği olan ve mutagenlerin DNA'daki etkisini araştırmak ve kromozomların farklı hızda replike olduğunu göstermek amacı ile kullanılan SCE yöntemini laboratuvarımızda kurmak ve geliştirmek amacıyla yapılan bu çalışmamızda, normal popülasyonda gözlenen SCE oranınının saptanması düşünöldü.

Yaş bağılı olarak SCE oranında ne tür bir değişiklik olduğunu gözlemek amacıyla yaptığımız çalışmada toplam 20 kişi değerlendirildi. Bunlar 1-3 yaş arasındaki 10 çocuk ile, 16-20 yaş arasındaki 10 genci kapsamaktaydı. Eşit BrdU dozlarında (10 µg/ml) iki grup arasında anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi. Gözlemlerimize göre yaş ilerledikçe SCE sayısı artmakta idi. Ortalama SCE sayısının sağılıklı olarak değerlendirilebilmesi için, her denekte 15 metafaz plağı incelendi.

Laboratuvarda çalışan ve direkt kimyasallar ile ilişkili olan; ayrıca laboratuvarda çalışmayan 5'er kişilik personel grubu arasında ortalama SCE/hücre sayısı açısından fark olup olmadığı araştırıldı. Amacımız kimyasallara bağılı gelişen in vivo DNA zararlanmasının derecesini saptamaktı. Sonuçta iki grup arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($P>0,05$).

Özellikle taze preparatların daha iyi sonuç verdiği bilinen SCE yöntemini uyguladığımızda, preparatların hazırlanmasını takiben geçen uzun süre sonunda BrdU larda bir sönme gözlenmiş ve kromatidler homogen olarak boyanmıştır. SCE'ler kromozomlarda eşit sayıda dağılmamışlardır. SCE sayısının kromozom büyüklüğüne bağılı olarak değiştiği gözlemlendi. Değerlendirmeye alınan tüm kişilerde en fazla saptanan SCE değişimi A grubu kromozomlarında idi.

SUMMARY

In this study performed in our laboratory, we aimed to establish and improve the SCE method which is a differential replication staining technique used to investigate the effects of mutagens on DNA and to demonstrate the differences of chromosomal replication rates. For this purpose, we tried to evaluate SCE ratio in the normal population.

In our study, 20 subjects were evaluated to determine the effect of age on the type of changes in SCE ratios. The subject groups included 10 children between 1 to 3 years, and 10 adults between 16 to 20 years old. When similar dosages of BrdU (10 µg/ml) were applied, a significant difference was observed between these groups. SCE number was determined to increase with age. To estimate the mean SCE number reliably, 15 metaphase areas were examined in each subject.

In order to evaluate the differences in mean number of SCE/cell, 2 groups of subjects were developed. Each group included 5 subjects. One group was working in a laboratory and dealing with the chemicals directly, whereas the other did not have any contact with chemicals. In this part of our study, we aimed to determine the degree of in vivo DNA injury, developing due to chemicals. We could observe no significant differences between these two groups ($P > 0.05$).

It is known that SCE method gives better results when especially applied to fresh preparations. We also observed similar results; when aged preparations were used, BrdU lost much of its effect, and the chromatids were observed to be stained homogeneously.

SCE's were not distributed in equal numbers in the chromosomes. SCE number was observed to change in accordance with the size of the chromosomes. When all subjects were evaluated, SCE number was determined to be the most in A group chromosomes.

KAYNAKLAR

- 1- ACAR, A., BAĞCI, G., LÜLECI, G., (1986). Akdeniz Üniversitesi Tıp Fak. Cilt III Sayı 2.3
- 2- BABU, A., VERMA, R.S., (1987). Chromosome Structure Euchromatin and Heterochromatin. International Review of Cytology vol.108 (1-60)
- 3- BAĞCI, H., (1985). Tübitak Moleküler Biyoloji ve Gen Mühendisliği Lisans Üstü Yaz Okulu Ders Notları, ODTÜ Biyoloji Bölümü.
- 4- BAŞARAN, N., (1985). Tıbbi Genetik. Bilim Teknik Yayınevi Eskişehir.
- 5- BENN, P.A., PERLE, M.A., (1986). Chromosom Staining and Banding Techniques., ROONEY, B.E., CZEPULKOWSKI, B.H., (Ed.). Human Cytogenetics. OIRLPRESS Oxford Washington.
- 6- BLOCK, A.W., (1982). Sister Chromatid Exchange Methodology. Sister Chromatid Exchange. 13-32.
- 7- CARRANO, A.V., THOMPSON, L.H., LINDL, P.A., MINKLER, J.L., (1978). Sister Chromatid Exchange as an Indicator of Mutagenesis Nature Vol.271 (551-553).
- 8- CORTES, F., ANDERSSON, H.G., (1987). Analysis of SCE₈ in Vicia Faba Chromosomes by a Simple Flouroscent Plus Giemza Technique Hereditas 107. 7-13.
- 9- DAVIDSON, L.R., KAUFMAN, E.R., (1980). Induction of Sister Chromatid Exchanges by BUdR Islargely Independent of the BUdR

Content of DNA. Nature 284, 74-76.

- 10- DEWDNEY, R.S., LOVELL, D.P., JENKINSON, P.C, ANDERSON, D., (1986). Variation in Sister-Chromatid Exchange Among 106 Members of the General U.K. Population. Mutation Research, 171: 43-51
- 11- GALLOWAY, S.M., ARMSTRONG, M.J., et all (1987). Chromosome Aberrations and SCE in Chinese Hamster Ovary Cells : Evaluations of 108 Chemicals. Environ Mental and Molecular Mutagenesis Vol.10 Sup. 10, 1-175.
- 12- GLOVER, T.W., STEIN, C.K., (1987). Induction of SCE at Common Fragile Sites. Am. Hum Genet. 41: 882-890.
- 13- GOTO, K., MAEDA, S., KANO, Y., SUGIYAMA, T., (1978). Factors Involved in Differential Giemsa-Staining of Sister Chromatids. Chromosoma 66. 351-359.
- 14- GUYTON, A.C., (1986). Tibbi Fizyoloji Merk Yayıncılık, Istanbul.
- 15- HAFEZ, M., EL-NABI, S.M., et all (1986). Enhanced Response to the Induction of SCE by Gama Radiation in Neurofibromatosis. Cancer 59: 1937-1940.
- 16- HEDNER, K., WADSTEIN, J., MITELMAN, F., (1984). Increased SCE Chromatid Exchange Frequency in Chronic Alcoholic Users. Hereditas 101: 265-266.
- 17- JENSSEN, D., (1982). The Induction of Micronuclei. Sister Chromatid Exchange, 47-63.
- 18- JIAN-BIN, L., BAO-XIANG, O., (1985). An Improved Method for the Analysis of SCE in vivo Mutation Research, 144: 243-245.

- 19- JONASSON, J.A., (1986). Analysis and Interpretation of Human Chromosome Preparations., ROONEY, D.E., CZEPULKOWSKI, B.H., (Ed.), Human Cytogenetics. OIRLPRESS Oxford-Washington DC.
- 20- KADAM, R.P., ADVANI, S.H., (1986). Studies on SCE in Patients With Hodgkings Disease. Cancer Genet Cytognet 22: 265-274.
- 21- KATO, H.B., (1973). Spontaneous SCE Detected by a BUdR-labelling Method. Nature Vol. 251, September 6:70-72.
- 22- KATO, H., (1976). Sister Chromatid Exchanges in Ageing and Repair-Deficient Human Fibroblasts. Nature Vol. 260: 447-448.
- 23- LEVINE, H., (1971). Clinical Cytogenetics, Little, Brown and Company Boston .
- 24- LEVITAN, M., (1988). Textbook of Human Genetics Oxford. University Press.
- 25- NAGAYA, T., TORIUMI, H., (1986). Spontaneous and Induced SCE in Lymphocytes of Healthy Persons. Environmental Research 40: 181-187.
- 26- NISHI, Y., HASEGAWA, M.M., OHKAWA, Y., INUT, N., (1986). Mouse Peritonel Lymphocytes, a New Target For Analyzing Induction of SCE on in vivo Exposure to a Genotoxic Agent. Cancer Research 46: 3341-3347, July.
- 27- PAINTER, B.R., (1980). A Replication Model for S.C.E. Mutation Research. 70 337-341
- 28- PAINTER, B.R., (1982). A Replication Model for SCE. Sister Chromatid Exchange. 115-121.

- 29- PERRY, P., EVANS, H.J., (1975). Cytological Detection of Mutagen-Carcinogen Exposure by Sister Chromatid Exchange Nature Vol. 258: 121-125.
- 30- PERRY, P., WOLFF, S., (1974). New Giemsa Method for the Differential Staining of Sister Chromatids. Nature vol. 251 September 13: 156-158.
- 31- RUSSELL, J.P., (1987). Mutation, Mutagenesis and selection Essential Genetics Blackwell Scientific Publications, London 78-96.
- 32- SCHUBERT, I., STURELID, S., DÖBEL, P., RIEGER, R., (1979). Intra-Chromosomal Distribution Patterns of Mutagen Induced SCE₂ and Chromatid. Research 81, 357-364.
- 33- SCHVARTZMAN, J.B., TICE, R.R., (1982). 5-Bromodeoxy Uridine and its Role in the Production of SCE Sister Chromatid Exchange, 123-134.
- 34- SEGUIN, L.R., TARONE, R.E., LIAO, K., ROBBINS, J.H., (1988). Ultraviolet Light-Induced Chromosomal Aberrations In Cultured Cells From Cockayne Syndrome and Complementation Group C Xeroderma Pigmentosum Patients. Lack of Correlation with Cancer Susceptibility. Am.J. Hum. Genet. 42: 468-475.
- 35- SHAFER, A.D., (1982). Alternate Replication Bypass Mechanisms for Sister Chromatid Exchange Formation. Sister Chromatid Exchange. 67-98.
- 36- SHARMA, T., DAS, B.C., (1981). Culture Media and Species-Related Variations in the Requirement of 5-Bromo Deoxuridine for Differential Sister Chromatid Staining. Mutation. Research 81:357-364.

- 37- SINHA, A.K., LINScombe, A.V., et all., (1985). Analysis of Sister Chromatid Exchanges in Lymphocytes Cultured From 71 Healthy Men. Cell Biology and Toxicology. Vol.1, 4: 333-342.
- 38- SINHA, A.K., GOLLAPUDI, B.B., et all., (1985). Analyses for in vitro Growth Conditions, Cytokinetics and SCE in Lymphocytes Cultured from the Sprague Dawley Rat. In Vitro Cellular and Developmental Biology. Vol. 21, 10: 583-588.
- 39- SPEIT, G., HAUPTER, S., (1985). On the Mechanism of Differential Giemsa Staining of Bromedeoxyuridine Substituted Chromosomes. Hum. Genet. 70:126-129.
- 40- STETKA, D.G., (1982). Operative and Non-operative Mechanisms of Sister Chromatid Exchange. Sister Chromatid Exchange, 99-114.
- 41- STRICKBERGER, W.M., (1968). Genetics The Macmillan Company, New York.
- 42- ŞAYLI, B.S., (1986). Medikal Sitogenetik. Ankara.
- 43- ŞAYLI, B.S.: Genetik ilkeler. Hacettepe Taş Kitapçılık.
- 44- TAYŞI, K., SAY, B., (1975). Tıbbi Genetik. Hacettepe Üniversitesi Yayınları.
- 45- TICE, R.R., CHALLET, J., SCHNEIDER, E.L., (1975). Evidence Derived from Sister Chromatid Exchanges of Restricted Rejoining of Chromatid Subunits Nature Vol. 256: 642-644.
- 46- TICE, R.R., SCHUARTZMAN, J.B., (1982). Sister Chromatid Exchange: A measure of DNA Lesion Persistence. Sister Chromatid Exchange, 33-45.
- 47- TUCKER, J.D., CHRISTENSEN, M.L., STROUT, C.L., CARRANO, A.V.,

(1986). Determination of the Baseline Sister Chromatid Exchange Frequency in Human and Mouse Peripheral Lymphocytes using Monoclonal Antibodies and Very Low Doses of Bromodeoxyuridine. Cytogenet Cell Genet. 43: 38-42.

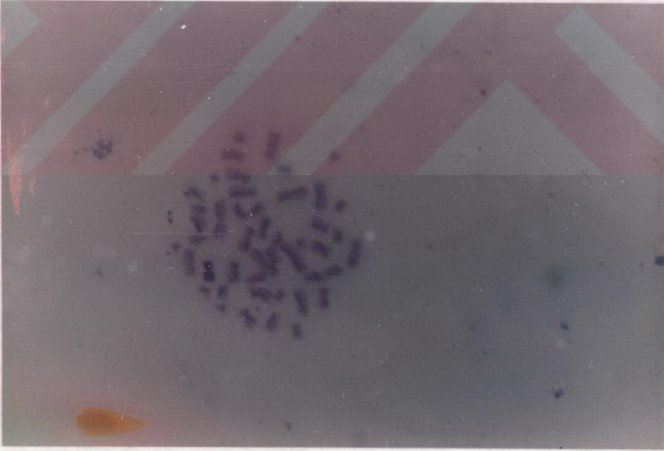
48- WOLFF, S., (1977). Sister Chromatid Exchange. Annual Review of Genetics 11: 183-201.

49- WOLFF, S., (1977). Sister Chromatid Exchanges Induced by Mutagenic Carcinogens in Normal and Xeroderma Pigmentosum Cells, Nature, Vol. 265: 347-349.

50- WULF, C.H., KOUSGOARD, N., NIEBUHR, E., (1986). Sister Chromatid Exchange in Childhood in Relation to age and sex. Mutation Research. 174: 309-312.

51- ZAKHAROV, A.F., (1982). Historical Aspects of Sister Chromatid Exchange. Sister Chromatid Exchange. 1-12.

Resim 1. Farklı kromozomlarda replikasyon dönemleri farklıdır.
Mikrofotoğraf 1000x



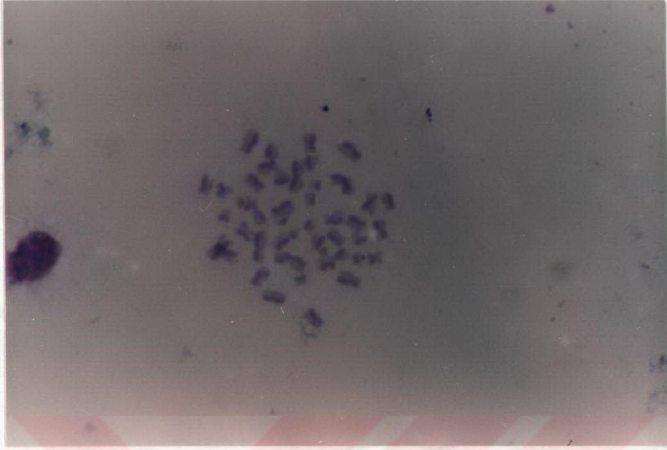
Resim 2. İnaktif X kromozomu homologundan daha geç replike
olur. Mikrofotoğraf 1000x

Resim 3. Erişkin grupta, büyük kromozomlarda SCE/hücre sayısı daha fazladır. Mikrofotoğraf 1000x

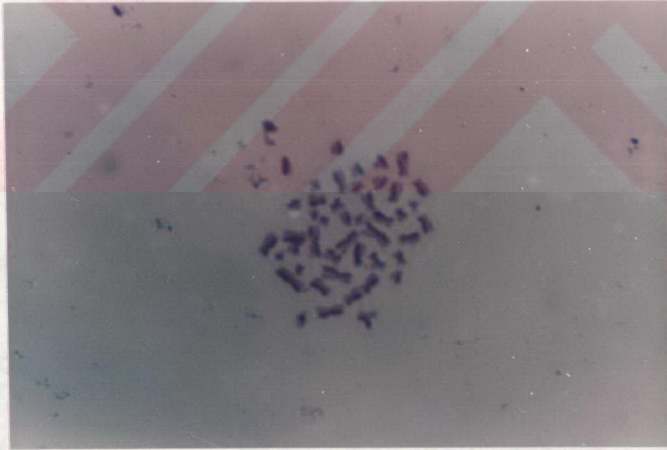
Resim 4. Büyük gruba ait bir SCE fotoğrafı 1000x

Resim 5. Lab.çalışanlarına ait SCE fotoğrafı 1000x

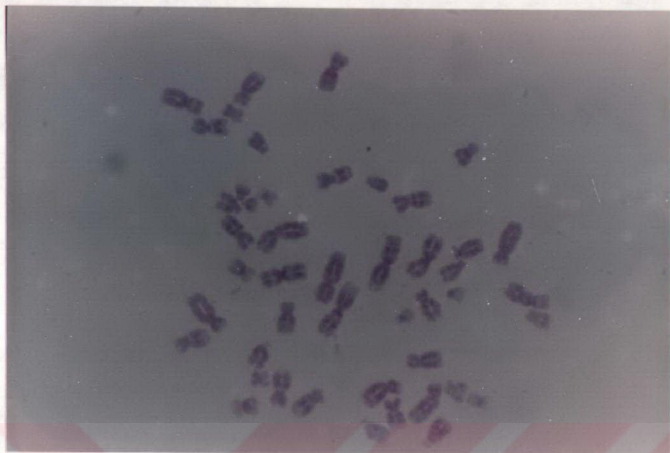
Resim 6. Lab. çalışmayan personele ait SCE fotoğrafı 1000x



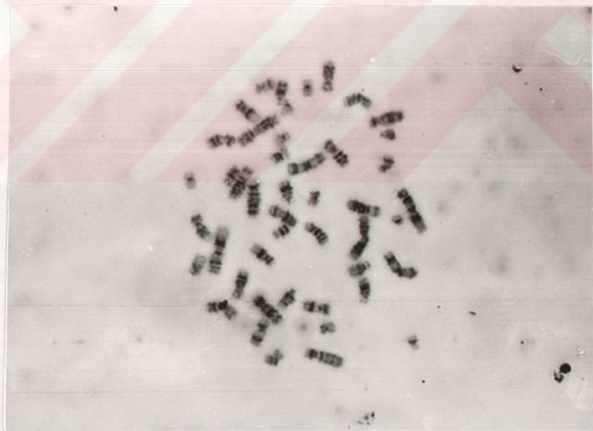
Resim 7. Lab. çalışmayan personele ait SCE fotoğrafı 1000x



Resim 8. Çocuk grubuna ait SCE fotoğrafı 1000x



Resim 9. Giemza bantlama fotoğrafı 1000x



Resim 10. Giemza bantlama fotoğrafı 1000x

ÖZGEÇMİŞ

1959 Tarsus doğumluyum. İlk öğrenimimi Dua Tepe ilkokulunda tamamladım. Tarsus Lisesi Orta kısmından mezun olduktan sonra Adana Kız Lisesinde 1973-1976 yıllarında yatılı öğrenci olarak okudum. 1976 da 1 yıl İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Fizik Bölümünde okudum. 1977 yılında İstanbul Teknik Üniversitesi Kimya-Metalurji Fakültesi Kimya Mühendisliği bölümüne girdim.

1985 yılında Araştırma görevlisi olarak Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında çalışmaya başladım. Anabilim Dalında Genetik laboratuvarında rutin analiz yapmaktayım.

1987 yılında master öğrenimime başladım. Fizyoloji Anabilim Dalında açılan "In Vitro Fertilizasyon ve Embryo Mühendisliği " ile Fizyoloji ve Biyofizik Anabilim Dallarında açılan "Mikro Elektrot ile Hücre içi Kayıt Yöntemleri" konulu kurslara katıldım.

Evlüyüm, bir kızım var.