

T.C.  
İstanbul Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Genetik Anabilim Dalı  
Danışman: Prof.Dr.Asım Cenani

40787.

**İFOSFAMİDE UYGULANAN  
WİSTAR ALBİNO SIÇANLARDA  
SİTOGENETİK İNCELEMELER**

(Yüksek Lisans Tezi)

Tıbbi Biolog R.Dilhan Kuru

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

İstanbul - 1994

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖNSÖZ</b>	
<b>GİRİŞ</b> _____	1
<b>GENEL BİLGİLER</b> _____	3
<b>A. SİTOGENETİK İNCELEMELERDE HAYVAN DENEYLERİ</b> _____	3
<b>B. HÜCRE SİKLÜSÜ</b> _____	9
<b>C. DNA'NIN (DEOKSİRİBO NÜKLEİK ASİT) YAPISI VE REPLİKASYONU</b> _____	12
<b>D. KROMOZOMLAR</b> _____	15
<b>E. MUTASYON VE KROMOZOMAL ANOMALİLER</b> _____	18
<b>F. KEMOTERAPİ, ANTİNEOPLASTİK AJANLAR VE ETKİLİ MEKANİZMALARI</b> _____	35
<b>G. İFOSFAMİDE</b> _____	41
<b>MATERYAL VE METOD</b> _____	48
<b>BULGULAR</b> _____	55
<b>TARTIŞMA</b> _____	85
<b>ÖZET</b> _____	90
<b>SUMMARY</b> _____	91
<b>KAYNAKLAR</b> _____	92

## ÖNSÖZ

"İfosfamide" uygulanan Wistar-Albino sıçanlarda sitogenetik incelemelere dayanan bu çalışma İ.Ü. Genetik ve Teratoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi (GE-TAM) Sitogenetik Laboratuvarında Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Yaptığım çalışmanın planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılmasında değerli katkıları olan, tüm lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölüm Başkanı, sayın hocam ve danışmanım Prof.Dr.Asım Cenani'ye,

Çalışmam süresince her fırsatta yardım ve teşviklerini gördüğüm Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü Genetik Anabilim Dalı Başkanı sayın hocam Yard.Doç.Dr.Seniha Hacıhanefioğlu'na,

İlaç temininde yardımlarını esirgemeyen Doç.Dr.Lebriz Sağlamer'e, doz hesaplamalarında yardımcı olan Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr.Aydın Barlas'a bulguların istatistik olarak değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Bioistatistik Bilim Dalı Başkanı Prof.Dr.Mustafa Şenocak ve yüksek lisans öğrencisi Pembe Çağatay'a, çalışmalarımın her aşamasında büyük yardım ve desteğini gördüğüm, Tıbbi Biyolog Gülgün (Sağcı) Güven'e, ihtiyaç duyduğumda yardımlarını esirgemeyen bölümümüzün diğer tüm elemanlarına,

Ve tüm yaşamım boyunca olduğu gibi bu çalışmam sırasında da beni daima destekleyen ve hiç bir fedakarlıktan kaçınmayan annem ve kardeşime sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

# G İ R İ Ő

---

Biyolojik sistemlerde canlılık olayının devamı kalıtım materyali olan DNA'nın kendisini çoğaltması ile mümkündür. DNA'nın çoğalması ve hücre bölünmesi kimyasal, fizik ve biyolojik mutajen ajanları tarafından etkilenerek, bozulabilir. DNA'daki bu değişiklikler mutasyon olarak adlandırılır. Mutasyonlar, genetik madde artış veya azalışına, kromozom düzensizliklerine ve baz sıralamasında (base sequence) değişimlere yol açarlar(31,87).

Bazı mutajenlerin DNA hasarının yanısıra çeşitli mekanizmalarla hücre bölünmesi sırasında kromozomların kusurlu ayrılmasına neden olarak sayısal kromozom değişikliklerine (euploidi, aneuploidi) yol açtığı görülmüştür(48).

Kimyasal maddelerin neden olduğu kromozomal hatalar, gittikçe artarak literatürlere geçmektedir. Bu kimyasal maddelerin bir kısmını da ilaçlar oluşturmaktadır. Bu ilaçlar arasında alkilleyiciler, nükleik asit analoglar, sitotoksik ilaçlar ve antibiyotikler sayılabilir. Bir çok araştırmacı ilaç-kromozom anomalisi ilişkisi üzerine eğilmiş, ilaçların kromozomlarda meydana getirdiği etki, çok sayıda araştırmaya konu olmuştur. Kanser tedavisinde kullanılan sitotoksik ilaçların invitro sistemlerde mutajenik olduğunun ispatlanması dikkatleri bu konu üzerine çekmiştir(74,77,87).

Kemoterapi olan hastalarda kromozom yapı değişiklikleri gösterilmekte ve buna bağlı olarak da ikincil malignitelerin ortaya çıkabileceği düşünölmektedir(77).

Kanser kemoterapisinde kullanılan antineoplastik ajanlardan biri olan "İFOSFAMİDE" alkilleyiciler sınıfına dahil olan bir sitostatiktir. Kendisi toksik olmayıp, etkili olması için enzimatik aktivasyonu gerekmektedir(3,13,36,86).

Kullanımı yaygın olan bu ilaç bir çok organda yaptığı toksik etkiden dolayı araştırmacıların dikkatini çekmektedir. Yapılan hayvan çalışmalarında kanserojen etkisi bulunmuş ve teratojen etkilerinin olduğu düşünölmektedir(53,78,86).

Kimyasal bir maddenin mutajen olup olmadığı konusunda yapılan araştırmalardan alınan sonuçların çoğu zaman çelişkili olduğu görölmektedir. Bender ve arkadaşlarına göre bu çelişkili sonuçların en önemli nedeni değişik laboratuvar teknikleridir. Özellikle invitro çalışmalarda kromozomlar dış şartların etkisi altına girmektedir. Bu nedenle mutajenite ve teratojenite çalışmalarında test edilecek kimyasal madde, bazı özellikleri bakımından insana yakın olan deney hayvanlarına uygulanmaktadır. Bu konuda geliştirilen yöntemlerden birisi de deney hayvanlarında çevre şartları sabit tutularak, istenilen ilacın istenilen dozda ve sürede uygulanabilmesidir. Böylece kromozom preparatları doğrudan kemik iliğinden hazırlandığından kromozomlar laboratuvar şartlarından büyük ölçüde korunabilmektedir(66,74).

Bu çalışmada, alkilleyici oxazafosforin ailesinin bir üyesi olan ifosfamide Wistar Albino sıçanlara invivo uygulanarak, kemik iliğinden hazırlanan direk preparatlarda sitogenetik değişimlerin incelenmesi amaçlandı.

## GENEL BİLGİLER

---

### A- SİTOGENETİK İNCELEMELERDE HAYVAN DENEYLERİ:

Bilimsel çalışmalarda hayvan deneylerinin ayrı bir yeri vardır. Bazı özellikleri bakımından insana yakın olan, hızlı çoğalan ve bir batında çok sayıda yavru verebilen, bu yüzden de embryo çalışmalarına imkan tanıyan deney hayvanları tercih edilir. İnsanda uygulanmadan önce, bir çok kimyasal madde test edilebilmekte, farmakolojik, patolojik, teratojenik ve mutajenik açıdan incelenebilmektedir.

Memelilerde test edilen kimyasal maddelerin kontrol hayvanlarında görülenden daha yüksek sıklıkta kromozom düzensizliğini indükleyip, indüklediğini tesbit için kemik iliği analizine başvurulur. Çünkü, şimdiye kadar yapılan mutajenik incelemelerin büyük bir kısmı invitro şartlarda gerçekleştirilmiştir. Denenen madde invivo olarak hayvana verilmişse bile kromozom preparasyonu için invitro olarak kültüre edilmiştir. Böylece invitrodaki kromozomlar dış şartların etkisi altına girmekte ve mitozu provoke etmek için kullanılan Phytohemaglutinin (PHA), kullanılan medyum ve medyum pH'sının labil olması gibi diğer dış faktörlerin etkisi ile çelişkili sonuçlar alınmıştır. Oysaki kemik iliği metodunda kromozomlar laboratuvar şartlarının etkisinden büyük ölçüde korunabilmekte ve daha sağlıklı sonuçlar elde edilmektedir.

Bir kimyasal maddenin klastojenik ya da nonklastojenik olduğunun çok dikkatli tesbit edilmesi gerekir. Bunun için aşağıda kısaca özetlenen bir protokol izlenmelidir.

1- Hücreler, aberasyon sıklığının elde edilmesi için ilaç uygulanıktan sonra ilk metafazlarında elde edilir.

2- Seçilen rnekleme zamanı, uygulama sırasındaki hücre siklüsünün farklı aŐamalarındaki hücrelerin elde edileceği Şekilde olmalıdır.

3- Uygulanan hayvan miktarının kafi derecede çok olması gerekir. Bazı ajanların, dişi ve erkekler arasında farklılıklar gösterdiklerinden, eşit miktarda her iki cinsde de kullanılması gerekir. İdeali, 5 dişi 5 erkek olmak üzere 10 hayvanlık bir gruptur.

4- Uygulanan dozun miktarı normalde doza cevabın bulunup bulunmadığının analizine izin verecek Şekilde olmalıdır. En az üç doz uygulanmalıdır.

5- Vücut ağırlığı dikkat edilmesi gereken bir diğer faktördür. Kesin bir ağırlık belirlenmemekle beraber, düşük ağırlıklar avantaj getirir.

6- Genç hayvanlarda genellikle daha yüksek mitotik indeks bulunduğundan, seksüel maturiteye ulaŐmıŐ hayvanlar kullanılmalıdır. İlerlemıŐ yaŐlardaki hayvanlar çalıŐmalara katılmamalıdır.

7- Özellikle merkezi sinir sisteminde rol oynayan ilaçlarda, evcil hayvanlar kafeste yalnız tutulduklarında, bu ilaçların zararlı etkilerini arttırdığını unutmamak gerekir.

8- Tüm hayvanlar uygun dietle beslenmelidir. İlaç verildiğinden itibaren, bu hayvanların gıda tüketiminde azalma olabilir. Kontrol hayvanlarının beslenmesi buna göre ayarlanmalıdır.

9- Rutin teratolojik ilaçlar için yüksek fertilize oranı ve kısa süren hamilelikleri olan hayvanlar kullanılmalıdır. Sıçan, fare ve tavşanlar bu gruba girerler.

Kemirgenlerden; sıçan, fare, Çin Hamsterleri ile tavşanlar en sık kullanılmakla beraber domuz, kedi ve köpek, primatlardan maymunlar (Rhesus) laboratuvar çalışmalarında kullanılırlar(62,66).

#### ***Hayvan ve İnsan Kromozomlarının Karşılaştırılması:***

Canlılar aleminde karyotiplerin sayısal ve yapısal değişiklikleri türlerin evolüsyonunda kuşkusuz önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Hayvanlarda ortaya çıkan değişikliklerin ana sebebi Robertsonian tipi translokasyonlar ve inversiyonlarla belirlenmiştir. Drosophila'nın yakından ilişkili türleri arasındaki değişikliğin en çok rastlanılan formu parasentrik inversiyonlardır.

Memeli türlerinde de kromozomal farklılıkların sebebi bir meta-sentrik kromozomun 2 telosentrik ya da akrosentrik kromozomun sentromerlerinden birleşmesi olan sentrik füzyon tipi (Robertson) translokasyonlarla oluşmasıdır. Değişik sentrik füzyonlar sonucu oluşan yakın memeli türleri arasında oldukça ilginç karyotipik değişiklikler mevcuttur. Örneğin American pamuk sıçanı Sigmodon hispidus'un diploid formu 52'dir. Fakat Sigmodon arizonae'de kromozom sayısı sentrik füzyon ile 22'ye inmiştir.



*Mus poschiavinus* (tütün faresi) ve *Mus musculus* arasındaki karyotipik değişiklikler kromozom bantlama teknikleri ile incelenmiş. *Mus musculus* 40 akrosentrik kromozomlu bir karyotipe sahipken, *Mus poschiavinus* 7 çift metasentrik kromozomun füzyonundan dolayı yalnızca 26 diploid karyotipe sahiptir. Kromozom kollarının sayısında değişiklik yoktur.

Perisentrik ya da eşit olmayan (karşılıklı olmayan) resiprokal translokasyonların sebep olduğu kromozom sayısının bir türden bir türe değişmediği, fakat kromozom kollarının sayısının değiştii hayvan grupları da vardır. Örneğin *Peromyscus* cinsi farelerin 48 diploid kromozoma sahip 20 türünde 56'dan 96'ya kadar değişen total kromozom kol sayısı mevcuttur.

İnsan ve primatların sitogenetik açıdan ilişkilerinde hominoid (maymun benzerlerinin) karyotipleri arasındaki kıyaslamalar gelişen bant teknikleri ile açık bir şekilde ortaya konmuştur.

Evolüsyonun seyri boyunca oluşan tüm cins ve türler karyotiplerinde farklılıklar göstermekle beraber mutagenik ajanlardan aynı şekilde etkilenmektedirler(74).



Şekil 1: İnsan karyogramı 2 n=46

Rattus norvegicus (Rat)

2n=42

Şekil 2 : *Rattus norvegicus* (Sıçan) Karyogramı

## B- HÜCRE SİKLÜSÜ

Yetişkinlerde toplam hücre sayısının tahminen  $10^{13}$  civarında olduğu, tüm bu hücrelerin tek bir hücreden yani döllenmiş yumurta hücre-sinden oluştuğu bilinmektedir.

Aynı zamanda döllenmiş yumurta hücresinde çok az miktarda ( $10^{-12}$  gr.) bulunan DNA'nın yetişkin bir insanda birkaç grama kadar çoğaldığı saptanmış bulunmaktadır. Bu da genetik materyal olan DNA'nın replikasyonu ve replike olan DNA'nın hücre bölünmesi esnasında eşit miktarlarda yavru hücrelere geçmesi ile mümkündür. Bu olay interfaz olarak isimlendirilen bir metabolik devreden sonra mitozla tamamlanan hücre siklusünde cereyan eder.

Hücrenin hayat siklusü dört dönemi içerir.

- 1- Post mitotik dönem veya istirahat fazı ( $G_1$  fazı)
- 2- Sentetik faz (İnterfaz = S fazı)
- 3- Post sentetik dönem veya istirahat fazı ( $G_2$  fazı)
- 4- Mitotik dönem

" $G_1$ " fazı metabolik aktivitenin yoğun olduğu bir dönemdir ve süresi hücre siklusünün yarısından fazlasını kapsar. Bu dönemde RNA sentez olur ve hücre DNA replikasyonuna hazırlanır. Ancak sentezi yapılmaz.

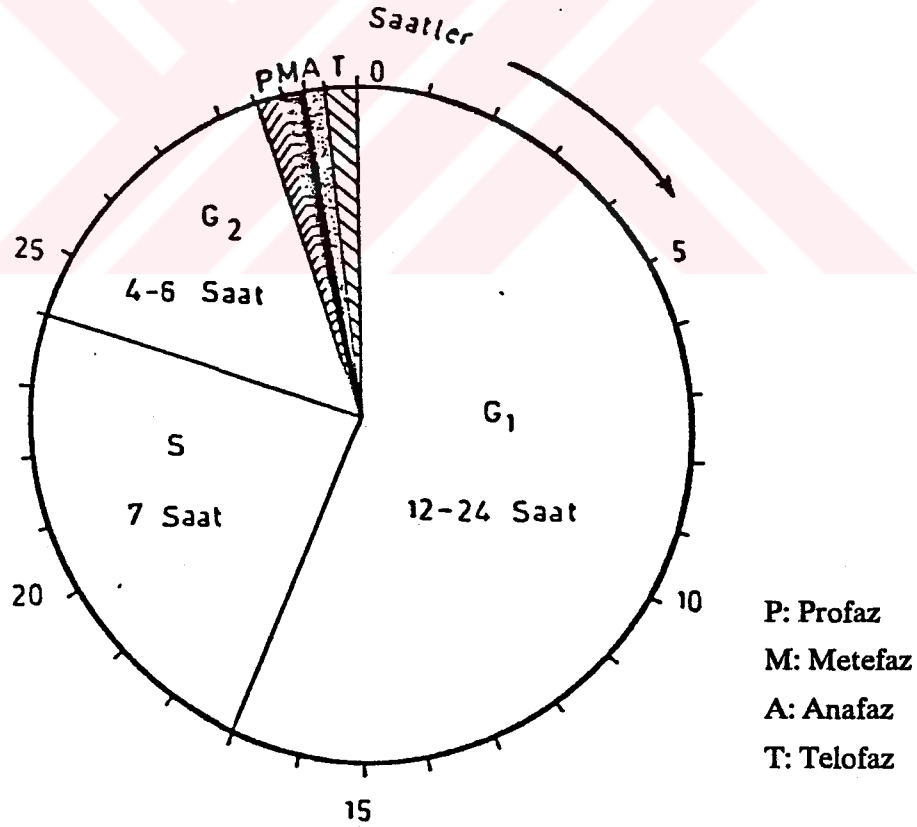
"S" fazında DNA sentez edilmeye başlar. RNA sentezi devam eder ve protein sentezi ise maksimuma çıkar. Genetik madde 2 katına çıkar.

" $G_2$ " fazı ile yeni bir metabolik aktivite dönemi başlar. DNA sentezi durur. RNA ve protein sentezi ise  $G_1$  döneminde olduğu kadardır. İşte bu süreç tamir olaylarının olduğu en önemli dönemdir.

Bu dönemin sonunda mitoz başlar. Profaz, metafaz, anafaz ve telofaz safhalarına geçerek, hücre siklüsü tamamlanır. İki yavru hücre meydana gelmiş olur. Başka bir deyişle "S" fazında sentez edilmiş olan DNA yavru hücrelere geçmiştir.

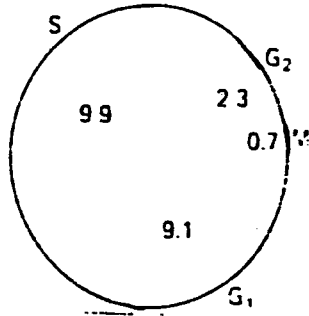
Hücre siklüsü insanda ortalama 32 saat (25-39 saat) sürerken, fare fibroblastlarında 22 saat Çin hamsteri fibroblastlarında 11 saattir (Şekil 3 ve 4).

$G_1$  fazındaki diploid ( $2n$ ) kromozom sayısı DNA sentezinden sonra iki katına ( $4n$ ) çıkmaktadır. İnterfazda DNA'sı iki katına çıkmış olan kromozomlar uzunluğuna olarak iki kromatide ayrılır ve bunlardan herbiri yeni yavruya gider(30,31,88).



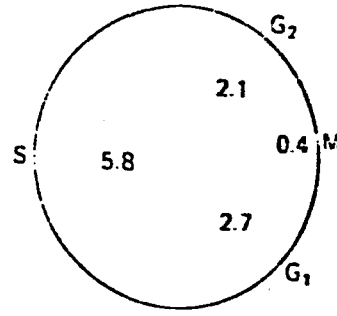
Şekil 3 : İnsan Hücre Siklüsü(31)

Fare fibroblastı



Total 22.0 saat

Çin hamsteri fibroblastı



Total 11.0 saat

Şekil 4 : Fare ve Çin Hamsteri Hücre Siklüsü(74)

**Mitotik İndeks**

Mitotik indeks, mitotik aktiviteyi yani hücrelerin bölünme oranını ifade eder.

Mitotik indeks değişik şekillerde hesaplanmakta ise de genellikle incelenen 1000 hücreye düşen mitoz sayısı olarak kabul edilmiştir.

Bazı kimyasal maddeler ve ilaçların mitotik aktiviteyi azalttığı gözlenmiştir(20,31).

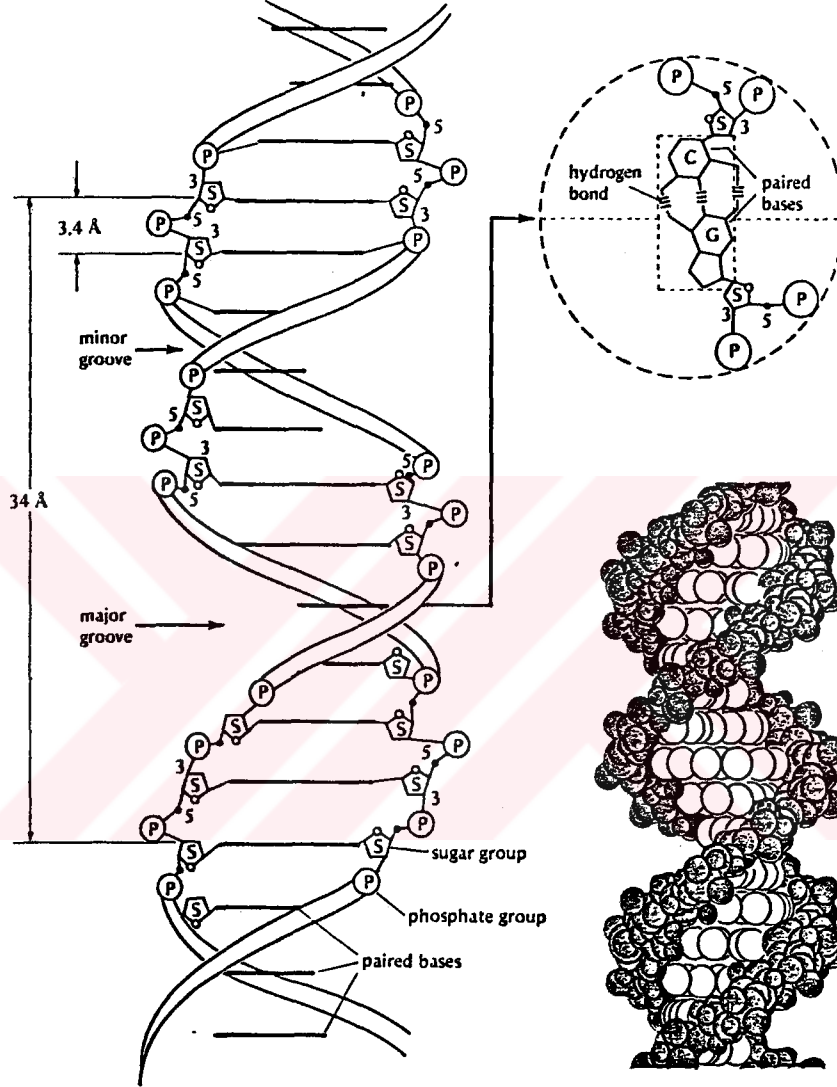
### C- DNA'NIN (DEOKSİRİBO NÜKLEİK ASİT) YAPISI VE REPLİKASYONU

Kromozomlarda bulunan deoksiribonükleik asit (DNA) proteinlerin primer yapıları ile ilgili bilgiyi taşır.

Nükleik asitlerin temel yapı taşları pürin ve pirimidin bazlarıdır. DNA'da iki pürin (Adenin ve Guanin) ve iki pirimidin (Timin ve Sitozin), RNA'da ise gene iki pürin (Adenin ve Guanin) ve iki pirimidin (Urasil ve Sitozin) bazı bulunur.

Pürin bazlarının 9 no'lu atomlarından, pirimidin bazlarının da 3 nolu atomlarından pentozlara bağlanması ile "nükleozidler" meydana gelir. Baz ile pentozun 1 nolu karbon atomu arasındaki bağ glikozid tabiatındadır. Bazların bağlandığı pentozlar, DNA'da 2'-deoksiriboz, RNA'da ribozdur. Nükleozid şekerlerinin 3' veya 5' karbon atomlarına ortofosfat gruplarının bağlanması ile "3' veya 5' nükleotidler" oluşur. Bağlanan fosfat gruplarının 1, 2 veya 3 tane olmasına göre meydana gelen bileşikler "nükleozid monofosfat", "nükleozid difosfat" veya "nükleozid trifosfat" diye adlandırılır. Nükleotidlerin şeker grublarındaki 3' ve 5' nolu karbon atomlarından fosfat grupları ile 5'-3' fosfodiester bağları ile bağlanması sonunda uzun polinükleotid zincirleri ortaya çıkar. Bu iki uzun polinükleotid zinciri ortak bir eksen etrafında sarmal tarzında kıvrılarak çift heliks yapılı DNA'yı oluşturur. Tüm canlılarda (tek zincirli DNA virüsleri hariç) bu çift sarmallı DNA bulunur. Watson ve Crick'in yaptığı çalışmalar sonunda sarmalın dönüş mesafesinin 34 Angström ve eninin yaklaşık 20 Angström olduğu sarmalın her dönüşünde birbirine 3,4 Angström uzaklıkta 10 bazın bulunduğu, çift sarmalın dışında şeker-fosfat gruplarından ibaret düzenli bir omurga iç tarafında ise birbiri üzerine madeni para dizisi şeklinde sıralanmış nükleik asit bazlarının bulunduğu görülmüştür (Şekil 5). Yalnızca Adenin ile Timin veya Sitozin ile Guanin karşılıklı yer aldıklarında kurulabilen Hidrojen bağı ile bu iki iplik birbirine bağlanır. Adenin ile Timin arasında iki Hidrojen, Guanin ile Sitozin arasında üç Hidrojen bağı bulunur. A/T= 1, G/C= 1'dir. Fakat AT/GC oranı organizmadan organizmaya değişir.

DNA UV'de 2600 Å'da absorpsiyon gösterir. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak  $10^7$ 'dir. Bu da bir molekülde 10.000 nükleotid olduğunu göstermektedir(30,87).



Şekil 5 : Watson - Crick modeline göre DNA molekülü(81)

### **DNA'nın Replikasyonu**

DNA, kalıtsal materyalden beklenen bilgileri bir sonraki generasyona aktarır. Bu görevleri yerine getirmek için replike olur. Replikasyon bir DNA molekülünün eşini oluşturarak çoğalmasına denir. İki replikasyon mekanizması söz konusudur.



**1) Koruyucu (Konservatif) Mekanizma:**

Ana DNA molekülü tamamen korunur. Onun eşi ikinci bir DNA molekülü oluşur. Nükleussuz prokaryotlar ve retrovirüs DNA'sı bu mekanizma ile çoğalır.

**2) Yarı Koruyucu (Semikonservatif) Mekanizma:**

DNA çift sarmalını oluşturan iki zincirin bazları arasındaki hidrogen bağları ortadan kalkar, böylece birbirinden ayrılan 2 yarı DNA molekülünde bulunan bazlar karşılıklı olarak çift oluşturabilecekleri yeni bazları çekerek molekülün yeniden bütünleşmesini sağlarlar (Şekil 6). İnsan ve diğer yüksek organizmalar, ve protozoonlar gibi tek hücrelilerin DNA'ları bu mekanizma ile replike olurlar(6,25,30).



Şekil 6 : DNA'nın Yarı Koruyucu (Semi Konservatif) Mekanizma İle Replikasyonu(81)

## D- KROMOZOMLAR

Kromozomların kimyasal analizi yapıldığında, DNA ve proteinden, az miktarda RNA'dan oluştuğu görülmüştür. Dinlenme evresindeki adı ile kromatinin yapısındaki bu proteinler iki büyük grup içerisinde toplanırlar.

1) *Histon Tipi Proteinler*: Bazik olan bu proteinler 5 büyük grupta toplanırlar.  $H_1$ ,  $H_{2a}$ ,  $H_{2b}$ ,  $H_3$ ,  $H_4$  olan bu proteinlerin molar oranları da 1 ( $H_1$ ), 2( $H_{2a}$ ), 2( $H_{2b}$ ), 2( $H_3$ ) 2( $H_4$ ) şeklindedir.

2) *Non Histon Tipi Proteinler*: Asidik proteinlerdir.

İnsan kromozomlarının her biri bir DNA çift sarmalından oluşmaktadır. Ancak bu DNA molekülü aşırı düzeyde kangallaşarak metreleri bulan uzunluğunu mikronlara kadar indirmektedir. Bu küçülme dört evreyi kapsamaktadır.

1. Evre : DNA dublex ilk sarmalını kendi çevresinde yapmaktadır.
2. Evre : Histon boncuklarının etrafı bu DNA çift sarmalı ile sarılarak ikinci kıvrımı yaparlar, ve "nükleozomları" oluştururlar.
3. Evre : Nükleozomlar birbirleri ile birleşerek tesbihi andıran bir oluşum yaparlar ve kıvrılarak bobin benzeri bir yapı oluşturur (kromatin iplikçigi)
4. Evre : İlmekler oluşur. Bu ilmekler sarmal yaparak kısalır ve mikroskop altında görülen kromozom formunu oluştururlar.

Bu kromozom yapısı Finch ve Klug tarafından "Solenoid modeli" olarak sunulmuştur (Şekil 7)(6,61).

Her kromozomun kısa ve uzun kolu vardır. kısa kolu P, uzun kolu q olarak isimlendirilir. Kolların birleştiği bölgeye "sentromer" (primer konstriksiyon) adı verilir. Kromozomun en soluk boya alan kesimidir. Kromozom kollarının uç bölgelerine de "telomer" denir.

Kromozomun ( $G_2$ -S) interfaz dönemindeki adına "kromatid" denir.  $G_1$  evresinde ise "kromatin" adını alır. Bu dönemde kümeleşmiş ve yumaklaşmış durumdadır. İki türlü kromatin bilinmektedir. Bunlar:

**1) Heterokromatin:**

İnterfaz evresinde çözülmeden kalan ve bu nedenle koyu olarak boyanan ya da heteropiknosis gösteren kromozom ya da kromozom kesimleridir.

**2) Eukromatin:**

Telofaz ve daha sonraki interfaz dönemlerinde gevşeyerek çözülen ve ultraviolemikrospektrofotometre ile nükleik asit bakımından daha zengin bulunan ve normal boyanan kromozom kesimleridir.

Kromozomlar sentromerin yerine ve kol uzunluklarına göre, Denver klasifikasyonu sonucu Metasentrik, Submetasentrik ve Akrosentrik olmak üzere üç gruba ayrılır.

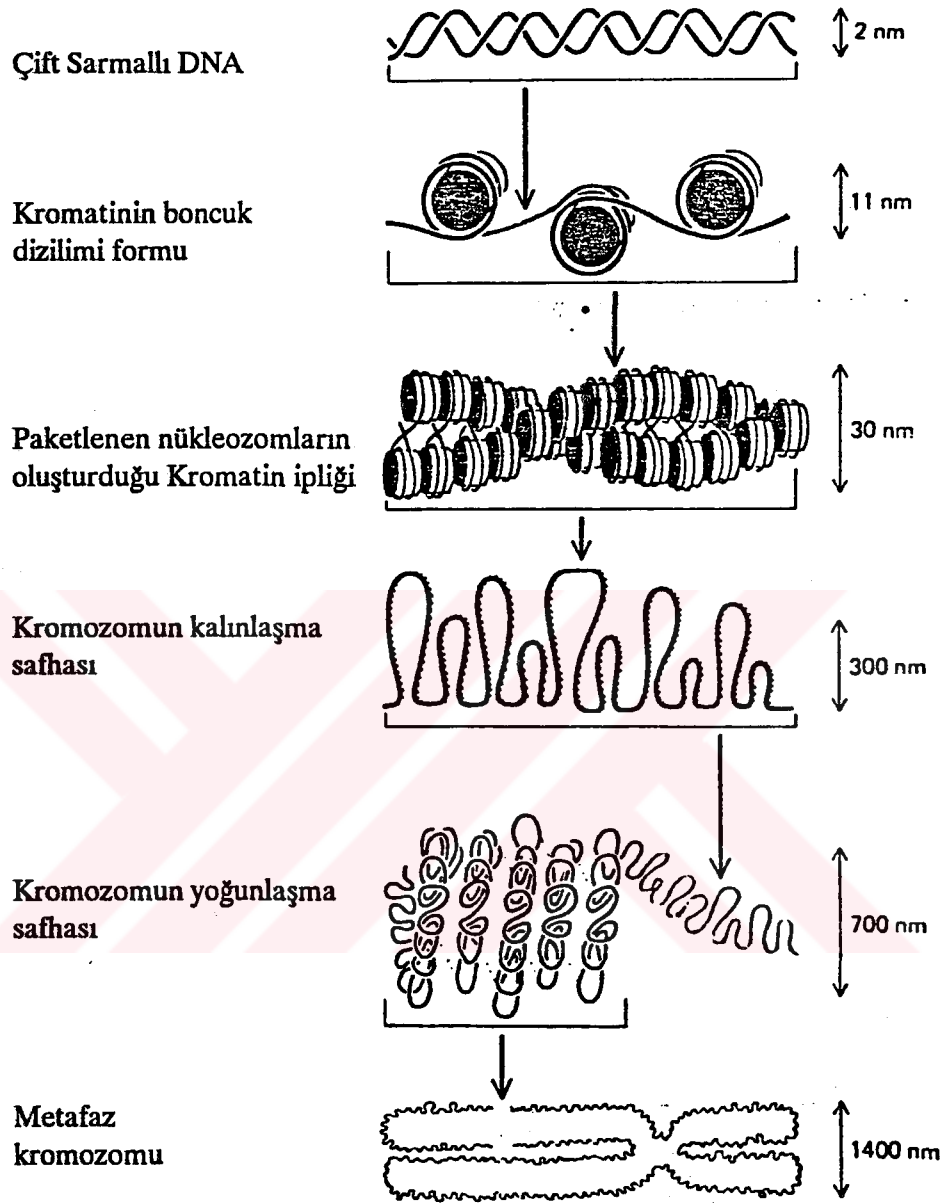
Metasentrik: P = q

Submetasentrik: q uzun p kısa

Akrosentrik: Sentromer bir uca son derece yakındır. P kolu çok fazla kısadır. Ayrıca P koluna kısa bir DNA iplikçığı ile bağlı satellit adı verilen düğme şeklinde yapılar vardır.

Bu kromozomların ek olarak, sentromerin en uçta bulunduğu normalde insanda görülmeyen Telosentrik kromozomlar da vardır(6,30).

Bir organizmadaki diploid kromozom sayısı, genellikle bölünen somatik hücredeki kromozom sayısı ile tesbit edilir.  $2n$  sembolü ile belirtilir. Gametler diploid sayısının yarısına sahiptir. (Haploid set)  $n$  ile belirtilir. İnsanda  $2n$  kromozom sayısı 46 iken, *Rattus norvegicus* da  $2n$  kromozom sayısı 42'dir(83).



Şekil 7 : DNA'dan Kromozom Oluşumu "Solenoid Modeli"(83)

**E- MUTASYON VE KROMOZOMAL ANOMALİLER:****=MUTASYON VE MUTAJENLER=****-Mutasyon-**

Genetik materyal olan DNA, yapısındaki kararsızlıktan dolayı spontan olarak bazen değişime uğrayabilmektedir. Bilhassa mutajenik ajanlarla etkilenerek zarar görmektedir. Genetik materyalde meydana gelen ve kalıcı olan değişikliklere "mutasyon", oluşan yeni yapıya "mutant", mutasyon yapan ajanlara da "mutajen" denir. Latince "mutare" (değişmek) fiilinden türeyen "mutatio" deyimini dilimize mutasyon olarak girmiştir.

Mutasyonlar biyolojik olarak kalıtsal bir özellik elde edilmesini, kimyasal olarak DNA ürünlerindeki değişikliği, sitolojik olarak kromozom yapısı ve sayısındaki değişikliği içerir(30,37,74).

Mutasyonlar oluşum biçimleri ve koşulları, meydana geldikleri hücre tipleri ya da yol açtıkları durumlara bağlı olarak değişik sınıflara ayrılırlar.

**A- Kapsamına Göre:****1- Genom Mutasyonları:**

Kromozomlarda sayı değişikliğine sebep olur. İki gruba ayrılır.

- a) Euploidi= Hücrelerde kromozom sayısı organizma için normal olan haploid sayının tam katı şeklinde artmıştır.
- b) Aneuploidi: Kromozom sayısı normal diploid sayıdan bir veya birkaç adet fazla ise buna hiperploidi, eksik ise hipoploidi denir.

### **2- Kromozom Mutasyonları:**

Kromozomlarda şekil değişikliğine sebep olur. Mikroskopta görülen bu mutasyonlara kromozom aberasyonları, kromozom bozuklukları gibi adlar da verilmektedir. Bu gruba giren translokasyonlarla bir kromozom parçası veya tümü başka bir kromozoma eklenir. Delesyonlarla kromozom parçası kopar ve böylece bir grup gen eksilir. İnversonlarla da gen sırası değişir.

### **3- Nokta Mutasyonları:**

Mikroskopta gözlenemeyen, bazların değişimini içeren mutasyonlardır. Dört gruba ayrılır;

- a) Transisyon= Bir pürin bazı yerini başka bir pürin bazı ve bir pirimidin bazı yerini başka bir primidin bazı almış olur.
- b) Transversiyon: Bir pürin bazının yerini bir primidin bazı veya bir pirimidin bazının yerini bir pürin bazının almasıdır.
- c) Delesyon: Bir veya daha fazla nükleotid çiftinin DNA molekülünden koparak eksilmesi şeklinde olur.
- d) İnverson: DNA molekülüne fazladan bir veya bir kaç nükleotid çiftinin girmesi ile oluşur.

### **B- Oluş Mekanizmasına Göre:**

#### **1- Spontan Mutasyonlar:**

Bunların oranı, normal koşullarda çok düşüktür. Örneğin  $T_4$  bakteriyofajında replikasyon başına  $1,7 \times 10^{-8}$  E.colide  $4 \times 10^{-10}$  ve *Drosophila melanogaster*'de  $7 \times 10^{-11}$ 'dir. Eşleme sırasında yanlış okumadan kaynaklanabilmekle beraber, bu tip mutasyonların en önemli sebebi ketoenol tautomerisine (devingen eşitsizlik) bağlı baz çifti teşkili yanlışları, transisyonlar, transversiyonlar, delesyon ve addisyonlardır.

**2- İndüklenmiş Mutasyonlar:**

Kimyasal, fiziksel ve biyolojik mutajenler kullanılarak oluşturulan mutasyonlardır.

**C- Mutasyonların Meydana Geldiği Hücre Tiplerine Göre:**

**1- Somatik Mutasyonlar:**

Normal vücut hücrelerini etkileyen mutasyonlardır. Bir yandan hücre özelleşmesinde, diğer yandan kanser oluşumunda önemli rol oynayabilecekleri düşünülmektedir.

**2- Genomik Mutasyonlar:**

Eşem hücrelerini etkileyen mutasyonlardır. Sonraki kuşaklara aktarılabilir.

**D- Organizma İçinde Doğurdukları Sonuçlara Göre:**

**1- Anlamlı (Sense) Mutasyonlar:**

Hiçbir değişiklik olmaz. Baz üçlüsü uygun aminoasit halinde okunabilir.

**2- Yanlış Anlamlı (Mis Sense) Mutasyonlar:**

Kodonlar uygun aminoasit halinde okunamaz. Proteinde bir aminoasit değişikliği söz konusudur.

**3- Anlamsız Mutasyonlar;**

Baz değişmelerine neden olan birçok mutasyonlar "anlamlı" baz üçlülerinden bir çoğunu "anlamsız" kodonlara çevirebilirler. Bunun sonucunda protein yapılamaz(30).

**- Mutajenler ve Etki Mekanizmaları**

Mutasyonları arttırıcı etkenlere mutajenler denir. Oluşturdukları mutasyonların mekanizmaları bakımından üç grup altında toplanırlar.

**1) Fiziksel Mutajenler**

Yüksek sıcaklık ve ortamın pH'sının derecesi DNA moleküllerinde depürinasyona, X ve Gamma ışınları gibi iyonizan ışınlar ve Ultraviyole gibi noniyonizan ışınlar iyonlaşmış bazlar, baz kopmaları, polideoksiribonüledotid zincirlerinde fosfodiester bağlarının kırılmaları ya da timin dimerlerinin oluşmasına sebep olurlar. Timin dimerleri tamir mekanizması ile DNA'dan uzaklaştırılmadığında replikasyon ve transkripsiyon durur(30,74,87).

**2) Biyolojik Mutajenler**

Biyolojik mutajen olan virüslerin kromozom kırıklarına ve kardeş kromatid değişimlerine yol açtığı bilinmektedir(31).

**3) Kimyasal Mutajenler:**

İnsanlarda kimyasal mutajenlerin genetik hasar yapması açısından radyasyondan daha önemli bir olay olduğu düşünülmektedir. Tarım, endüstriyel ve eczacılıkta yaygın kullanılan bazı kimyasal maddelerin ve bazılarının da vücut içinde üretilen metabolitlerinin germ hücrelerinin nükleuslarını etkilediğini ve böylece mutasyona sebep olduğu düşünülmektedir. Kimyasal mutajenlerin etki mekanizmaları hücrenin bölünme safhasına, ilacın dozuna, DNA'nın bazı hastalıklarda olduğu gibi, özel eğilimine göre değişmektedir(61,87).

Kimyasal ajanları sırası ile inceleyecek olursak:

**a) Baz analogları:**

5-Bromourasil: Timine çok benzediğinden DNA eşlemesi sırasında timin yerine kullanılır. Timinden tek farkı 5.karbon atomuna bağlı metil grubunun yerine brom atomunun bulunmasıdır. Timinin keto formundan (5-BudR-A) enol formuna (5-BudR G) geçerek mutasyona neden olur. Burada AT → GC ve GC → AT yönünde transisyona sebep olur.



2- Aminopürin: Adenine çok benzer. Amino formunda iken timinle çift oluşturur. (2AP-T) Nadiren bir "imino" formunda bulunabilir ve bu durumda iken sitozinle arasında tek hidrojen bağı olacak şekilde çift oluşturur (2AP-C). Bunun sonucunda gen üzerinde (A-T) çiftleri yerine (2AP-C) oluşur. Böylece (A-T) yerine (G-C) geçmiş olur. (AT → GC ve GC → AT) iki yönlü transisyon olur.

**b) Deaminasyon yapan ajanlar:**

Nitröz asit ( $\text{HNO}_2$ )= Amino grubu içeren bazlarla reaksiyona girerek DNA bazlarının amino gruplarını giderir ve baz sıralamalarında bozukluğa sebep olur. Böyle bir etki Adenin'i Hipoksantin'e, Sitozin'i Urasil'e, Guanin'i Ksantin'e kolayca döndürebilir. Hipoksantin ise özgül olarak Sitozin ile baz çiftleri oluşturacaktır (AT → GC) (GC → AT) iki yönlü transisyon oluşur.

**c) Hidroksilamin ( $\text{NH}_2\text{OH}$ )**

Seçici olarak sitozini etkiler. Etki sonunda sitozin değişerek adenin ile baz çifti oluşturabilir (C-A) Böylece (GC→At) tek yönlü transisyon oluşur.

**d) Alkilleyici ajanlar:**

Kükürt ve nitrojen mustard, etilenoksitler ve daha az toksik olan etil-metan-sulfonat (=EMS) bu gruba girerler. Alkilleyici ajanlar, özgül olarak Guanin'in N7 pozisyonundaki bu azotu alkilerler ve 7-alkilguanin DNA yapısından ayrılır. Bu nedenle bu etkenler, depürinasyon, zincir kırılması, transisyon ve transversiyon tipinde nokta mutasyonlarına neden olabilmektedir.

**e) İnterkalasyon yapan ajanlar:**

Bu gruba akridinler (proflavine, Acriflavine, Acridin orange) girer. Akridin boyaları (CG) → (AT) veya (AT) → (TA) şeklinde transversiyonlara sebep olurlar. Bunlar rekombinasyon esnasında bir iplikçığı kopan DNA molekülüne bağlanarak, iplikçiklerin onarılmasında yanlışlıklara sebep olur.

Ayrıca delesyon ve addisyona sebep olur. Diğer taraftan çift DNA sarmalındaki bitişik baz çiftleri arasında yanlışlıklara da sebep olurlar. İnterkalasyon yapan bu ajanların, CGCGCGCG gibi tekrarlayan diziler içindeki değişmiş baz çiftlerini de stabilize ettiği görülür.

Mutajen ajanlarla DNA'da oluşturulan hasarların yanısıra, düşük oranda olmakla birlikte DNA molekülünde spontan bozulmalar oluşabilmektedir. Bozulmalar pürin bazlarının kopması (depürinasyon) veya amino gruplarının uzaklaşması (deaminasyon) şeklinde olmaktadır. İster mutajen ajanlarla olsun, ister kendiliğinden meydana gelmiş olsun hücre fonksiyonunun devam edebilmesi, yani replikasyonun ve transkripsiyonun devam edebilmesi oluşan hasarın tamir edilmesi ile mümkün olacaktır(30,87).

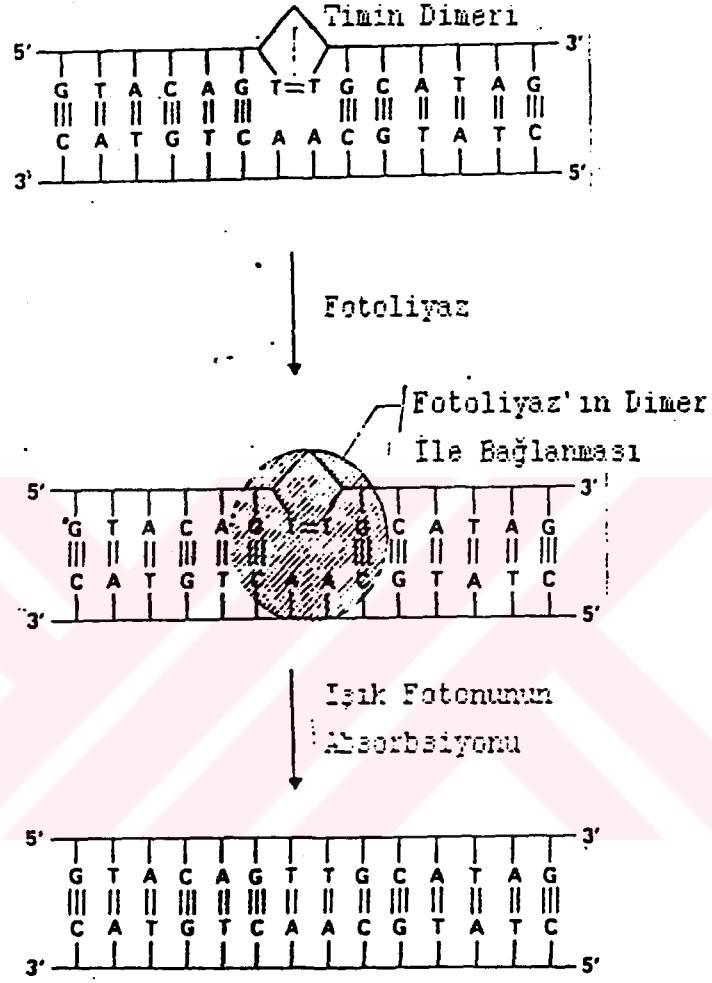
#### *DNA Tamir Mekanizmaları:*

Tüm organizmalar DNA ipliklerinden birinde oluşmuş olan hasarı giderecek en azından bir enzimatik sisteme sahiptir. Böyle bir mutasyon tamiri, genotipin bilgi içeriğinin korunmasına yardım etmektedir. E.coli dimer mutasyonlarının tamiri için üç tamir sistemine sahiptir.

#### *1- Fotoreaktivasyon:*

Primidin dimerlerine spesifik olan DNA tamir sistemi fotoreaktivasyondur. Bu nedenle U.V. ve kimyasal ajanlar tarafından oluşturulan dimerlerin fotoreaktivasyonla tamiri, diğer eksizyon tamirlerinden farklıdır.

254 nm U.V. ışığı, iki komşu timin arasında dimer oluşturmaktadır. 300-600 nm. arasında ışığa maruz kalındığında fotoliz (photolyase) enzimi dimere bağlanarak monomerlerine ayırmaktadır. Monomerize olan timinler DNA'da kalır. Bu işlemde DNA'dan materyal çıkartılmaz (Şekil 8a).



Şekil 8a: DNA'nın Fotoreaktivasyon Mekanizması ile Tamiri(74)

### 2- Kesip-Çıkartma Tamiri (Excision repair):

Bu mekanizmada ışığa ihtiyaç yoktur. Eksizyon tamirde iki yol vardır. Bunlar nükleotid ve baz kesip çıkartma tamiridir.

Nükleotid çıkartma; pirimidin dimerleri çıkartılır, yerine yeni sentezlenen polinükleotid eklenir.

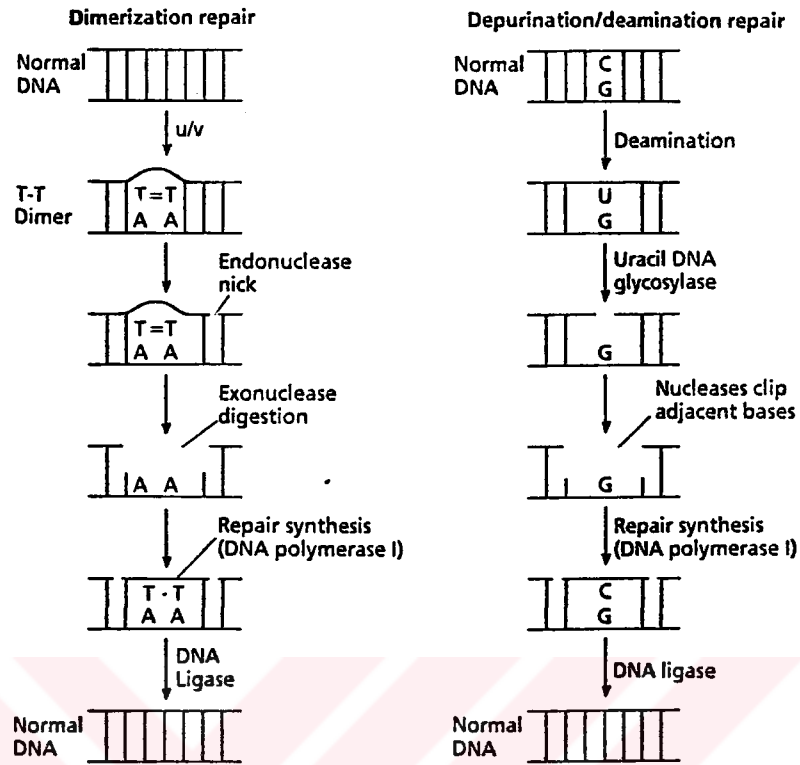
Baz kesip çıkartma; alkilasyon veya deaminasyon gibi küçük derecelerde modifikasyon geçiren bazlar DNA'dan çıkartılır, yenileri ilave edilir.

İlk aşamada endonükleaz, dimerleri tanır ve serbest uçlar oluşturarak bozulan DNA kısmını keser. Bu serbest uçlar, serbest uçlardan başlayarak nükleotidleri kesen ekzonükleaz tarafından kesilir. DNA polimeraz komplemanter ipliği kullanarak çıkartılan DNA kısmını tekrar sentezler. Yeni sentezlenen iplik eski ipliğe ligazla bağlanır. Bu sırada nükleozomal yapının geçici bir süre için açılarak gerekli enzimlerin hatalı bölgeleri tanıyıp ilavesi gerekmektedir. Hatalı bölge düzeltildiğinde DNA'da herhangi bir değişim gözlenmeyecektir (Şekil -8b)

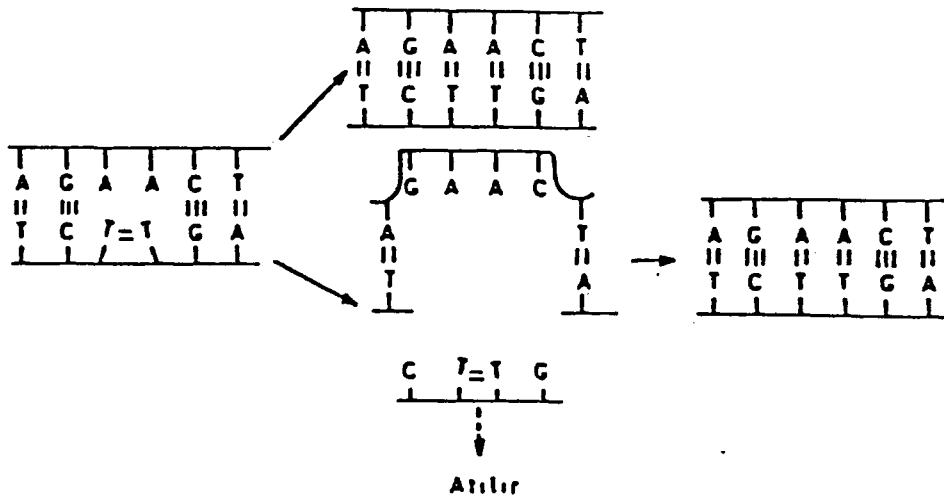
### ***3- Replikasyon Sonrası Tamir (Post Replication Repair)***

Fotoreaktivasyon ve eksizyon tamirleri mümkün değilse hasar gören DNA ipliği replikasyon esnasında kalıp görevi yapamayacaktır. Çünkü dimerler diğer bazlarla çift oluşturamazlar. Bu nedenle, yeni sentezlenen DNA ipliğinde bir boşluk, bir aralık meydana gelecektir. Bununla beraber dimer oluşumu ile bozulan genetik bilgi yeni sentezlenen DNA'da eski iplik boyunca devam edecektir. Bu bilgi, hasar görmüş DNA ile yer değiştirecek olan, bozulmamış kopyanın oluşumu için kalıp vazifesi göreceklerdir (Şekil 8c). Bazen komşu DNA örnek alınarak tamir yapılabilir. O zaman yeni birleşim türleri yani kromozom mutasyonları meydana gelebilir.

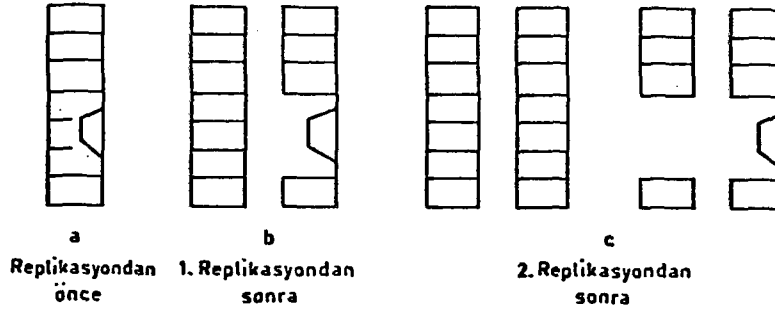
Çeşitli ajanlar tarafından DNA'nın tek ipliği üzerinde ya da farklı iplikler arasında oluşturulan dimerler DNA'dan uzaklaştırılmadığı veya tamir edilemediğinde dimerlerin olduğu bölge bir sonraki replikasyonda kalıp vazifesi göremeyeceğinden komplemanter iplik tamamlanamayacak, ikinci replikasyonda kırık şeklinde görülecektir (Şekil 8d)(87).



Şekil - 8b: DNA'nın Kesip-Çıkartma Tamir (Excision Repair) Mekanizması İle Tamiri(17)



Şekil - 8c: DNA'nın Post Replikasyon Tamir Mekanizması İle Tamiri(60)



Dimer oluşumundan sonra meydana gelen kırık oluşumu  
 a) Dimer oluşumu, b) İlk replikasyonda timin dimerlerinin karşısında komplementer bazların bulunmaması, c) İkinci replikasyonda bölünme ürünü olarak DNA'nın devamsızlığı

Şekil - 8d : Dimer Formasyonu Sonrası Kırık Formu(60)

= **KROMOZOMAL ANOMALİLER** =

Kromozomal anomalileri "Sayısal Anomaliler" ve "Yapısal Anomaliler" olmak üzere 2 ana gruba ayırabiliriz.

#### **A- Sayısal Anomaliler:**

Hücre bölünmesindeki hataya bağlı olarak ortaya çıkar. Mayozda kromozomların birbirinden ayrılamaması (non-disjunction) ve anafazda geri kalması (anafaz lag) ile gametlere az veya çok sayıda kromozom gider. Sayısal anomaliler "Euploidi", "Aneuploidi" ve "Mosaizm" olmak üzere üç alt gruba ayrılır.

##### **1. Euploidi:**

Hücrelerdeki kromozom sayısı organizma türü için normal olan haploid sayının tam katı şeklinde artmıştır. Haploid sayının 3 kat artması (3n) triploidi, 4 kat artması (4n) tetraploididir. Endomitoz, endoreduplikasyon, c-mitozu gibi hücre bölünmesi kusurları ile ortaya çıkar. Buradaki

temel kusur, hücre çekirdek bölünmesi olduğu halde stoplazma bölünmesinin olmamasıdır.

### **2. Aneuploidi:**

Normal kromozom sayısının bir veya birkaç sayı artması ya da azalması olayıdır. İkinci mayoz bölünme anında iki ayrı hücreye ayrılarak gitmesi gereken bir kromozom çiftinin her iki üyesinin birbirinden ayrılmadan (non disjunction) tek bir hücreye gitmesi ya da hücre bölünmesi ve kromozomların birbirinden ayrılmasından sonra kutuplara hareket anında kromozomlardan birinin yeni oluşan hücrenin dışında kalarak kaybolması veya diğer kromozom eşi ile onun hücresine katılması (anafaz lag) sonucu trizomi veya monozomik zigotlar oluşur.

Aynı kromozomdan iki tane bulunan gamet başka bir karşı cins gamet ile birleştiğinde ( $2n+1$ ) trizomik hücre oluşur. Bu kromozomu içermeyen gamet ise başka bir gamet ile birleştirildiğinde ( $2n-1$ ) monozomik zigot oluşur.

### **3- Mosaizm:**

Bir organizmada aynı zigotun birbirini takip eden bölünmelerinden birinde oluşan bir hata sonucu kromozom yapıları farklı hücre gruplarına denir. Burada da sebep ayrılamama veya anafazda geri kalma ile oluşan hatalı bölünmedir.

### **B Yapısal Anomaliler:**

Kromozomlardaki yapısal değişikliklerin (izokromozomlar hariç) bölünme mekanizması ile ilgisi yoktur. DNA replikasyonu sırasında meydana gelen hasarların tamir edilememesi sonucu oluşurlar.

Kromozomlar radyasyon ışınının değişik formlarına ve tabii ki kimyasallar ve virüslere maruz kaldığında sekonder konstriksiyon zayıflaması, akromatik bölge ya da gap ve kırıklar gibi indüklenmiş lezyonlara sebep olur(27). Oluşan hasarlar hücre siklüsündeki dönemine göre üç grub altında incelenir.

1) Kromozom Tipi Düzensizlikler: DNA eşleşmesinin sonunda veya mitozun sonu ile  $G_1$  fazında oluşur.

2) Kromatid Tipi Düzensizlikler:  $G_1$  fazı ve sonu, S ve  $G_2$  fazları arasında oluşur. Kimyasal ajanların büyük bir çoğunluğu hücre siklüsünün S fazı boyunca kromatid kırıkları meydana getirirler. Gaplerin ise  $G_2$  fazında ışınlandırılmış veya kimyasal ajanlarla virüslere maruz bırakılmış hücrelerde çok sık görüldüğü kaydedilmiştir.

3) Subkromatid Tipi Düzensizlikler: Erken profaz safhasında meydana gelen hasarların oluşturduğu kısmi kırılma şekilleridir(74,87).

**1) Kromozom Tipi Düzensizlikler:**

Kromozom (cs) düzensizliği, aynı lokustaki tek bir kromozomun her iki kromatidini içerir. Bunlar;

a) Kromozomal Gap (csg): Tek bir kromozomdaki her iki kromatidin aynı lokusundaki akromatik lezyon olan boya almayan bölgedir. Kromozomal gap; izolokus gap veya izokromatid gap olarak da isimlendirilir.

b) Kromozomal Kırık (csb): Tek bir kromozomun her iki kromatidinin aynı lokusundaki kırıklarıdır. Asentrik bir fragment ve bir anormal monosentrik kromozom ortaya çıkar. İzolokus kırık ve izokromatid kırık terimleri de kullanılır.

c) Kromozomal Exchange (cse): İki ya da daha çok kromozom lezyonlarının sonucudur. Aynı ya da diğer kromozomun yeni bir pozisyonu olan tek bir kromatidin subsequent yeniden yerleşimi simetrik (yani resiprokal translokasyon), ya da asimetric yani (disentrik formasyonu) olabilir.

d) Minute (min): Tek bir kromatidin genişliğinden daha küçük asentrik bir fragmenttir. Tek ya da çift olabilir. Tümör hücreleri gibi özel durumlarda, "multiple double minute"ler olarak bulunur ve kısaca "dmin" olarak kullanılır.



e) Pulverizasyon (puz): Kromatid ve/veya kromozom gap ve kırıklarının ve normal olmayan exchange durumlarında ortaya çıkar. Özellikle bir hücredeki bir ya da daha çok kromozom, normal kromozomlar ortaya çıkarken pulverize olur.

f) Prematür Kromozom Kondansasyonu (Pcc): Bir interfaz nükleusu mitoz içinde erken indüklendiğinde oluşur. Bu genellikle diğer hücrenin stoplazması içinde yer alır. Bu hücrenin nükleusu daha ileri bir mitoz aşamasına sahiptir. Pcc replike olmayan  $G_1$  ya da  $G_2$  nükleusuna sahiptir. Pcc'nin Sfazı nükleusunun kromatini sıklıkla pulverize olur.

### 2) Kromatid Tipi Düzensizlikler:

Kromatid (ct) düzensizliği, bir lokustaki bir kromozomun sadece bir kromatidini içerir.

a) Kromatid Gap (ctg): Kromatidin minimal düzensizliğidir. Tek bir kromatidin boya almayan (akromatik lezyon) bölgesidir.

b) Kromatid Kırık (ctb): Bir kromatidde açıkça görülen sıra düzensizliğidir.

c) Kromatid Exchange (cte): İki ya da daha çok kromatid lezyonunun ve kromatid materyalinin subsequent düzenlenmesi sonucu oluşur. Exchange, farklı kromozomların kromatidleri arasında (interchange), ya da bir kromozomun kromatidleri içinde ya da arasında (intrachange) olabilir. İnterchange vakalarında üç kolu bulunduğu "triradial" (tr), dört kolu bulunduğu "quadriradial" (qr), ya da dörtten çok kolu varsa "complex" (cx) konfigurasyon olarak belirtilir. Sentromer sayısı parentez içinde (1 cen, 2 cen, gibi) belirtilmelidir. Gerektiğinde exchange daha detaylı olarak sınıflandırılır.

**- Gap ve Kırıkların Karşılaştırılması**

Gap ve kırıkların ayırt edilmesi her zaman tartışma konusu olmuş ve bu konuda çeşitli öneriler getirilmiştir. Birçok araştırmacı, yaptıkları gözlemlere dayanarak gap ve kırıkların bazı özelliklerini belirlemişlerdir.

Kırık, kromozomun bir parçasının, komple ayrılması olarak izah edilmektedir. Kromozom matriks ya da diğer faktörlerden dolayı tamamlanamazlar. Ayrılan parça kolayca görülür, ya da alandan tamamen yok olur (Şekil 9).

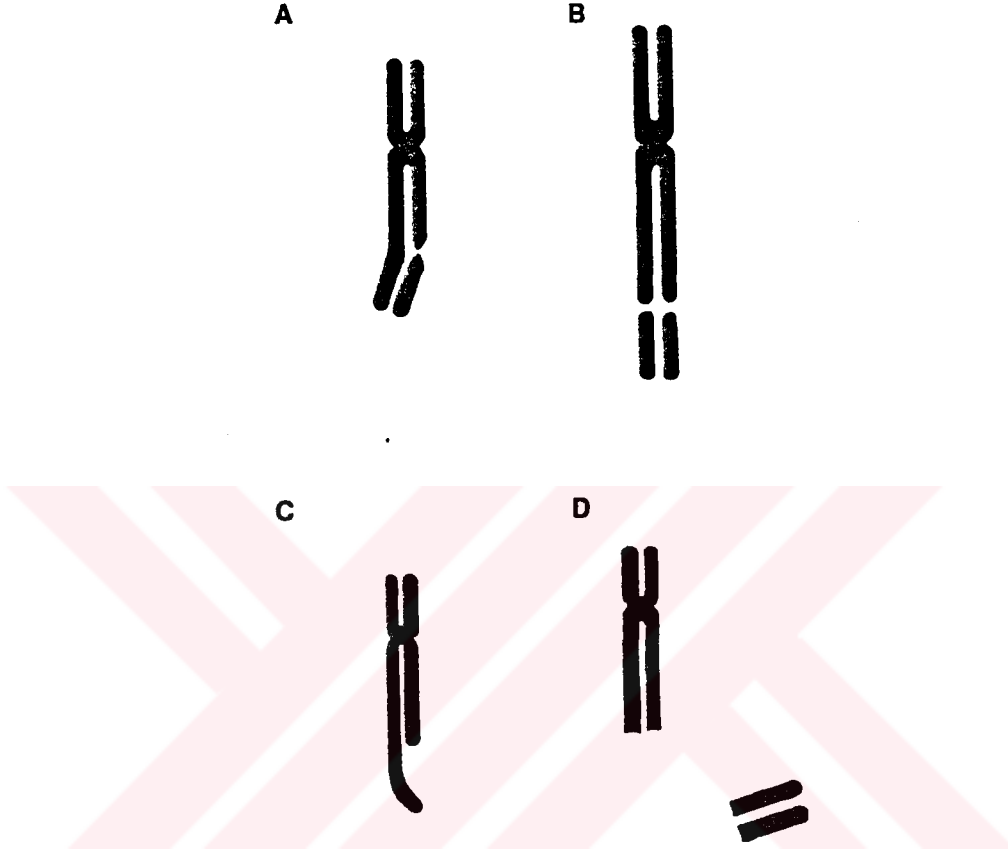
Gap ise kromatidin bir bölümü incelendiğinde oluşur. Buda kendisini bir devamsızlık şeklinde gösterir. Işık mikroskobu ile bakıldığında, gaplerin yer değiştirmedeği ve sıklıkla gerçek devamsızlıktan çok sadece bir hipokromatik bölge olarak görülürler. Bu tip kromozomlarda iki yakın bölge hala birbirine bağlıdır, fakat DNA iplikleri çok incelmıştır. Genellikle bu gap bölgesindeki DNA yapısında bazı değişiklikler meydana gelir. Yapılan ultrastructurel çalışmalar sıklıkla gap bölgelerinde kromatid ipliklerinin bulunduğunu göstermiştir (Şekil 10).

Gapler o bölgenin sıkıca kondanse olup, kromozomun metafaz formuna geçebilme yeteneğini etkiler.

Gapleri kırıklardan ayıran bir başka özellik de anafazda sentrik ve asentrik fragmentlere ayrılmamalarıdır. Oysaki kromozomal kırıklarda asentrik bir fragment ve anormal yapıda sentrik bir kromozom ortaya çıkar.

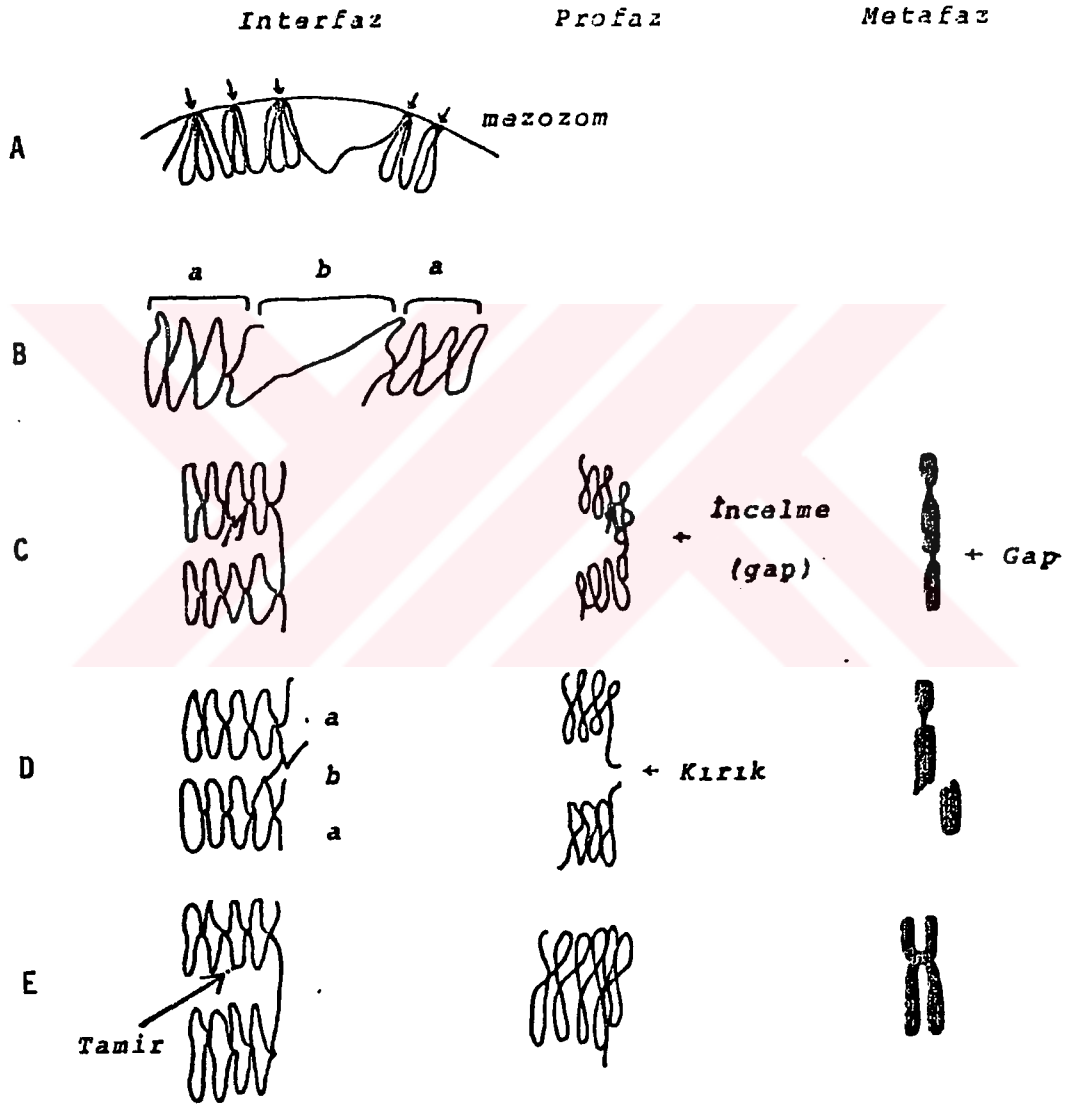
Kırık ve gap formasyonu klinik olarak önemlidir. Çünkü kromozomun küçük bir parçası ya da asentrik kromozom bu olay sırasında kaybolabilir. Bu kırılmalar sonucu I.M (Işık mikroskobu) ile gözlenebilen delesiyonlar ve kırılan kromozomların uçlarının birbirleri ile birleşmeye olan eğilimleri sonucunda, halka (ring) kromozomlar, duplikasyonlar, inversiyon-

lar, çeşitli translokasyonlar ve disentrik kromozomlar oluşabilir (Şekil 11)(27,36,69).

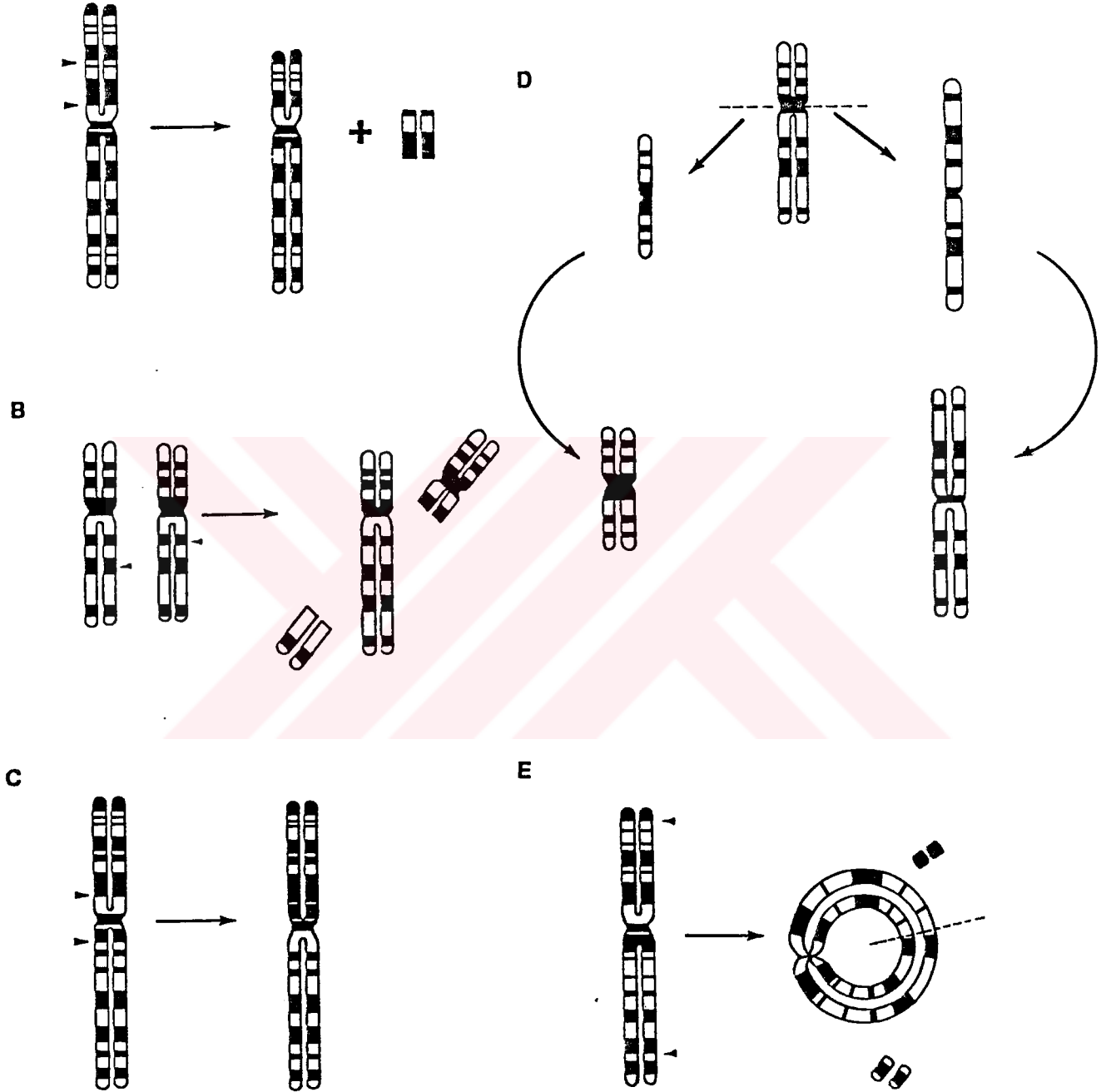


Şekil 9 : Gap ve Kırıklar(69).

- (A) Kromatid tipi gap - parça kaybı yok
- (B) Kromozom tipi gap - parça kaybı yok
- (C) Kromatid tipi kırık - materyal kaybı var
- (D) Kromozom tipi kırık - parça (fragment) kopması var.



Şekil 10 : Gap ve Kırıkların Oluşum Mekanizması(27)



Şekil 11 : Kırılan Kromozomların Yeniden Düzenlenmesi(69)

(A) Delesyon; (B) Duplikasyon; (C) İnverson;

(D) İzokromozom formasyonu; (E) Halka

## F- KEMOTERAPİ, ANTİNEOPLASTİK AJANLAR VE ETKİ MEKANİZMALARI

Kemoterapi girişimleri 1865'te Lissauer'in Fowler solüsyonu ile başlasa da, modern görüntüsünü 1940 yılında Huggins ve Hodges'in prostat kanserinde östrojenin etkisini göstermesi ile almıştır. 1945 yılında C.P.Roads Nitrogen Mustard'ın önemli bir antikanser etkisinin bulunduğunu gösterdi. 1950 yılında yeni ajanlar bulunmuş ve 1960 yılında tümör hücre biyolojisinin ve farmakolojisinin araştırmaya açık hale gelmesi ile yeni ajanlar ilave edilmiştir. Günümüzde tıpta bilinen 80'i aşkın antineoplastik ajandan 50 kadarı kemoterapi alanında kullanılmaktadır(21,23).

Kanser tedavisinin vazgeçilmez metodlarından biri olan kemoterapide kullanılan ajanlar tek tek ya da birkaçı bir arada kullanılır. Bu uygulamada farklı etkileri olan ilaçlar birleştirilerek daha çok tümör hücresi öldürülür. Kombine kemoterapi ile dirençli hücrelerin üremesine fırsat verilmemiş olur(23).

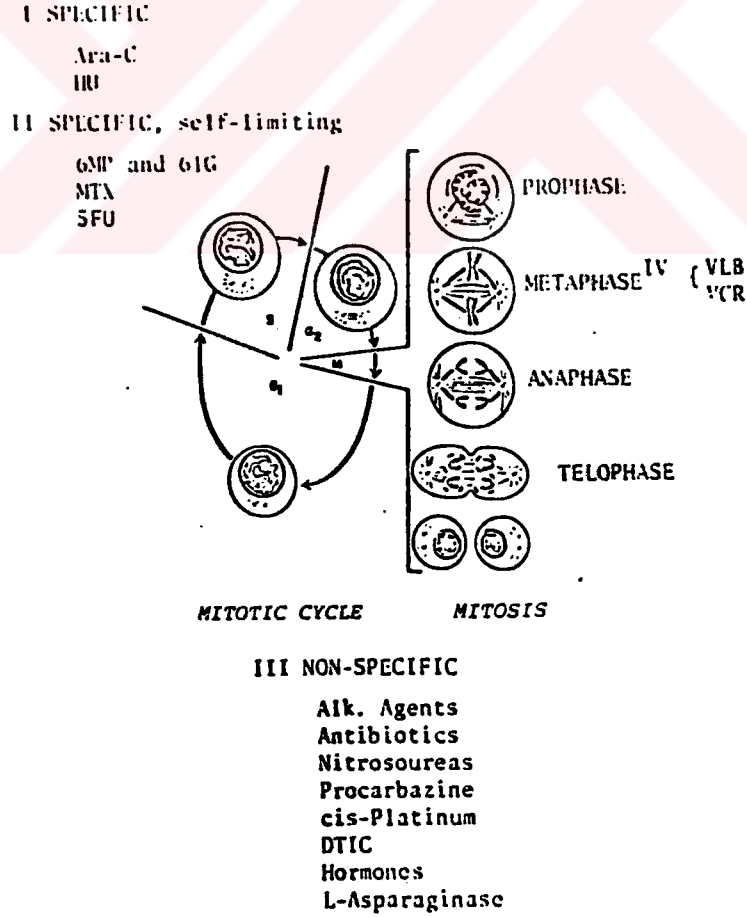
Ancak kanser kemoterapisinde önemli bir faktör bulunur, o da uygulanacak dozdur. Kanser kemoterapik ajanlarının doz derecesi ve dozun etkileri çeşitli klinik durumlarda ve *invivo* sistemde deneysel olarak gözden geçirildiğinde, birçok kemoterapik ajanın doza cevap eğrisinin dik olduğu görülmüştür. Doza cevap eğrisindeki diklik verilen bir ilacın tümöre hassasiyetine bağlıdır. Yani çok hassas tümörlerde eğri genellikle dik ve lineardir. Bununla birlikte hassas olmayan tümörlerde doz az etkili olabilir(24).

Klinikte yararlı olan antikanser ilaçları, tümör üreten organizmanın normal hücrelerinden ziyade duyarlı tümör hücrelerine toksik etki gösterirler. Böylece bir ölçüde selektif toksisiteden söz edilebilir. Bunun sebebi, kanserli hücrelerle normal hücrelerin çoğalmasındaki farklı kinetik ve biyokimyasal özelliklerden kaynaklanabilir(21).

Genellikle, kemoterapik ajanların etki mekanizması aşağıdaki beş şekilde olur.

- 1) Nükleik asit biyosentezinin inhibisyonu
- 2) Nükleik asit yapısının bozulması
- 3) Protein sentezinin inhibisyonu
- 4) Mitozun inhibisyonu
- 5) Hormonal çevrenin değişmesi

Kullanılan ilaçların hedefi daha çok DNA sentezi veya fonksiyonlarıdır. En büyük toksik antitümör etkilerini hücre siklusu içinde DNA sentezine giden hücreleri inhibe etmek suretiyle yaparlar. Kemoterapide kullanılan ilaçlar hücre siklusu fazlarından birinde veya bir kaçında etkili olmaktadır. Buna bağlı olarak da bu ajanlar üç büyük grupta toplanmıştır (Şekil 12).



Şekil 12 : Antikanser İlaçların Etki Mekanizmasının Hücre Siklusunun Fazları İle İlişkisi(23)

**1- Hücre Siklüsüne Spesifik Olanlar (Siklüs Spesifik)**

Toksik etkilerini, bir siklusun herhangi bir evresinde olan hücreler üzerinde gösterirler. Fakat G<sub>0</sub> gibi dinlenme periyodunda olan hücreleri etkileyemezler; Metotoraxat (MTX), 5-Fluorourasil (5-FU), L-Asparaginase (L-Asp) gibi.

**2) Faza Spesifik Olanlar (Faz Spesifik):**

Siklüsün belirli bir fazında etkilidirler. Örn: Cytosine Arabinoside (Ara-C) sadece S fazındaki hücrelere, Vinca alkaloidleri; Vinblastine (VBL), Vincristine (VCR) M fazındakilere etkilidirler.

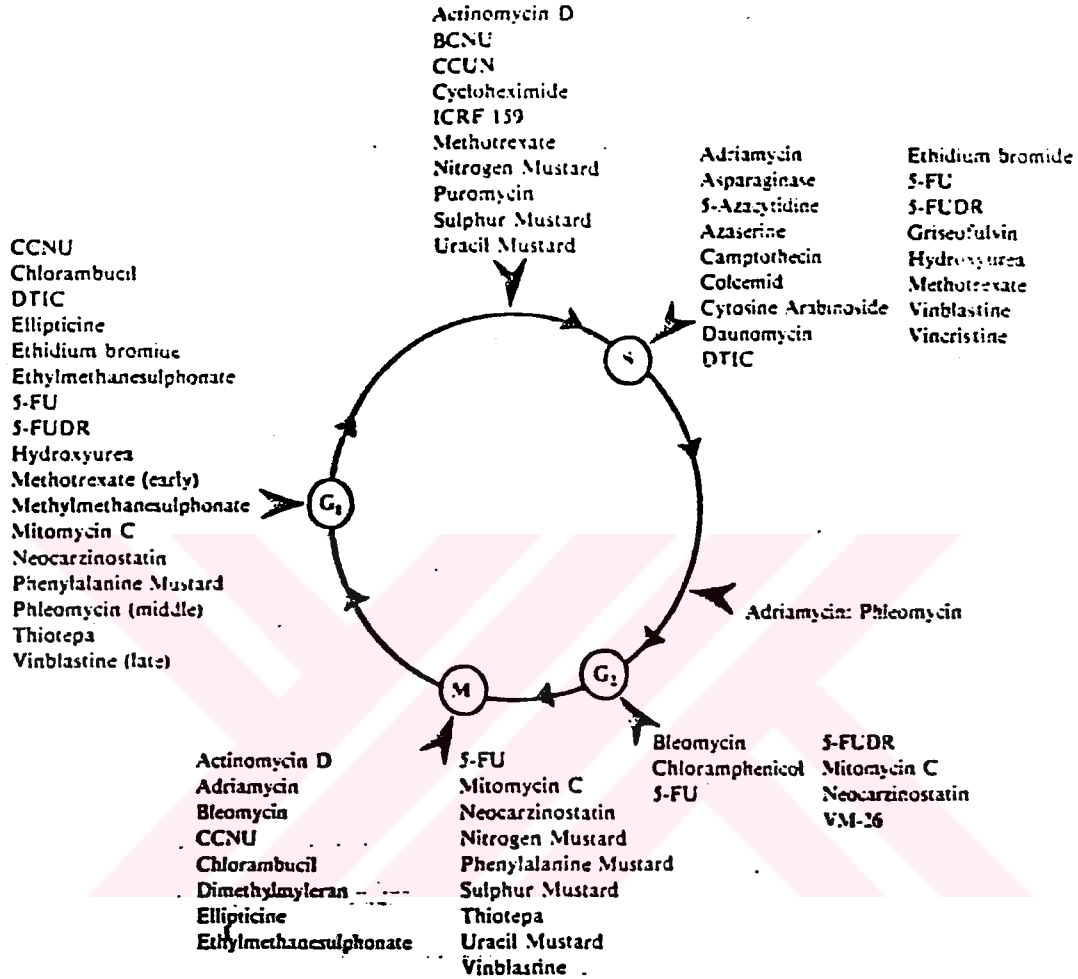
**3) Hücre Siklüsüne Spesifik Olmayanlar (Siklüs non spesifik):**

Hem çoğalan hem de dinlenme halindeki hücrelerin tümüne toksik etkiye bulunurlar; Mitomycin-C (MMC) Cyclophosphamide (CTX), Chlorombusil gibi.

Antineoplastik ajanların tümör hücrelerini ortadan kaldırma mekanizması gözönünde tutularak şöyle bir sınıflandırma yapılmıştır(21,23,24).

- 1) Alkilleyiciler
- 2) Antimetabolitler
- 3) Bitki alkaloidleri
- 4) Antibiyotikler
- 5) Nitrosoüreler
- 7) Çeşitli sentetik ajanlar
- 8) Hormonlar





Şekil 13 : Hücre Siklüsünde Antikanser İlaçların Etki Yerleri(23)

### 1) Alkilleyiciler:

Çift zincirli DNA'nın her bir zincirini diğerine alkil grupları aracılığı ile bağlayarak meydana getirdikleri çapraz replikasyona engel olurlar. Alkilleyici ajanların büyük çoğunluğu DNA bazlarının reaktif kısımlarına etkili metil hidroksil gibi bazı yan grupların eklenmesine sebep olurlar. Alkilleyici ajanlar özgül olarak Guanin'in N7 pozisyonunu etkileyerek bu azotu alkilerler. Bu etki sonunda DNA yapısındaki "deoksiribozid" bağlantısı gevşer ve 7 alkil guanin DNA'dan ayrılır. Bunun sonucu DNA yapısında bir "pürin aralığı" oluşmaktadır. Boşalan bu noktaya diğer dört bazdan

biri geçerek transisyon ve transversiyon tipi mutasyonlar meydana gelmektedir; Chlorambusil (CLB), Cyclophosphamide (CTX) ve onun yapısal izomerleri olan İfosfamide ve Trofosfamide gibi(23,62).

### **2) Antimetabolitler:**

Bu grup ilaçlar kendi metabolitlerinin yapısına benzerler. Hücresel enzimlerle kolayca karşılıklı etkileşim gösterirler. Fakat fonksiyon açısından hücre metabolizmasını bozarlar. Bu gruba giren ilaçlardan bazıları şunlardır. Cytosine Arabinoside (Ara-C), Metatoraxat (MTX), 6-Merkaptopurin (6-MP), 6-Thioguanin (6-TG) Fluoracil (5-FU)

### **3) Bitki Alkaloidleri:**

Bu maddeler hücre bölünmesini mitozda durdurur ve hücrenin ölümüne yol açar. Vincristine, vinblastin gibi vinca alkaloidleri bu gruba dahildir.

### **4) Antibiyotikler:**

Bunlar genellikle streptomyces grubu mantarlardan elde edilmişlerdir. DNA molekülünün bazıları arasına girerek replikasyona engel olmak suretiyle tümör hücreleri üzerine etkili olduğu gibi (Actinomycin-D gibi), DNA'ya bağlanarak RNA yapımını engelleyerek de (Daunorubicine Doxorubicin, Mithramycin gibi) etki gösterirler.

### **5) Nitrosoüreler:**

Çift zincirli DNA'yı çapraz olarak bağlarlar. Lipitlerde süratle eridikleri için kas, beyin bariyerini kolayca aşabilirler. Carmustine, Lomustine bu gruba ait ilaçlardır(21,23).

### **6) Enzimler:**

En sık kullanılan L-Asparaginase (L-Asp)'dir. Asparagine'in Aspartik asit ve Ammoniyak'a hidrolizini kataliz eder. Asparagine essential bir aminoasittir. Tümör hücreleri böylece L-asparagin kullanamaz. Protein sentezi bozulur. RNA ve DNA'nın sentezleri engellenmiş olur. L-Aspa-

raginase hücre siklüsünün postmitotik evresi ( $G_1$ )'ne etki yaparak zararlı olur(79).

#### 7) Çeşitli Sentetik İlaçlar:

Bu ilaçlardan biri olan Cisplatinum (CPDD) DNA sentezini inhibe ederken, Dacarbazine (DTIC) (Dimethyl-triazeno-imidazole-carboxamide) ise DNA'ya bağlanıp RNA yapımına engel olurlar.

#### 8) Hormonlar:

Bazı tümör hücrelerinin hormonal mikro çevresini bozarak bunların çoğalmasını engellerler. Bu gruba giren ilaçlardan bazıları, Tamoxifen, Mafoxidin, Prednisoldur(21,23,24).

Yapılan deneysel çalışmalarda, anti tümör ajanların büyük bir kısmı olan alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, antitümör antibiyotikler, vinca alkaloidleri ve bazı procarbozine ve dimethyl triazeno - imidazol - carboxamide (DTIC)'nin doza cevap eğrileri diktir. Anthrocyclinler ve alkilleyici ajanlardan oluşan non-cell spesifik ajanlar nispeten yavaş gelişen tümörlere karşı etkilidirler. Bununla birlikte mitotik aktiv komponentleri tahrip eden birçok cell cycle spesifik ajanların doza cevap eğrisi siklus içindeki hücrelerin iyileşmesine göre iyi bir diklik kazanır(24).

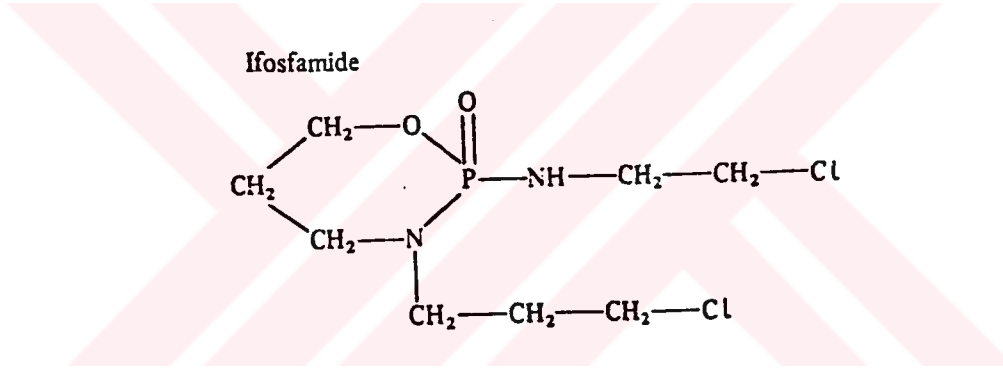
İnvitro doku kültürü çalışmalarında alkile edici antineoplastik ilaçların kromatid kırığı ve asentrik parçalar oluşturduğuna dair bulgular vardır. Bunun yanında izokromozom kırıkları, disentrik ve ring kromozom oluşumunun ise nadir olduğu bildirilmektedir. Yapılan bir çalışmada bu gruptan cyclophosphamidin, istatistiksel olarak kırık oluşumunda artışa sebep olmadığı, fakat mitotik indexi çok azalttığı görülmüştür.

İnvitro lenfosit kültürlerinden çeşitli antitümör ilaçların uygulanması ile yapılan bir çalışmada cyclophosphamide ve methotrexate dışındaki diğer ilaçların (FUDR, TEM, Tremman, Thio-tepa,  $A_2$ ) artan dozlarında eksponential olarak kromozom aberasyonlarının arttığı görülmüştür.

Daha sınırlı olan invivo bulgulardaysa farklı sonuçlar gözlenmektedir. Bununla beraber alkile edici ajanlar ile tedavi edilmiş kanser hastalarında ilaca bağlı olarak lösemilerin geliştiği bilinmektedir. Alkile edici ajanların DNA kırıkları yaptığı, DNA protein bağlarını bozduğu, gen mutasyonları oluşturduğu biliniyorsa da hangi tip lösemiye sebep olduğu tam kesin değildir.

Antineoplastik ilaçların sebep olduğu kromozom kırıklarının tekrar tamir edilme hızı, ilaçlara göre farklılık göstermektedir. Uzun süre tamir edilen hücrelerde kanser eğilimi daha da artmaktadır(1).

### G- İFOSFAMİDE



Şekil 14

Bir kemoterapik ajan olan ifosfamide invivo aktive olması gereken alkilleyici oxazafosforin aliesinin bir üyesidir. Nitrojen atomlarından birinin üzerinde bir kloroetil grubu bulunan cyclophosphamidin yapısal bir izomeridir. İfosfamide oxazafosforin halkasındaki siklik fosfamide nitrojen atomuna nitrojen mustard molekülünden bir 2-cloroetil grubunun transfer olması ile cyclofosfamidden kimyasal olarak farklılık gösterir(3,13,86).

İfosfamide, cyclophosphamide ve aynı nitrojen atomuna bağlı olmayan iki fonksiyonel kloroetil gruplarına sahip diğer nitrojen mustarddan farklıdır. Cyclophosphamide için doğru olduğu gibi ifosfamide de toksik değildir. Fakat etkili olması için enzimatik aktivasyonu gerekmektedir.

İfosfamide genellikle cyclophosphamidden daha aktivedir. Fakat cyclophosphamide kadar, enjekte edilen antijenlere immun cevabın baskılanmasında etkili değildir(36).

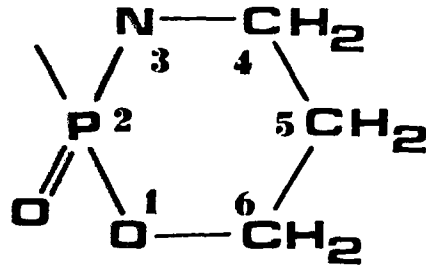
1965'den beri sentezlenmektedir. 1977'den daha önceleri Avrupa'da klinik olarak uygulanıyordu. Fakat kullanan hastalarda doza bağlı hemorajik sistit ve böbrek yetmezliği ortaya çıkınca kullanımını yaygınlaşmadı. 1980'de (sodyum 2 mercapto ethane-sulfonat) Mesna'nın keşfi ile ürotoksik oxazafosfarin metaboliti olan acrolein detoxifiye edilebildiği için daha yüksek dozlarda ifosfamide kullanılmaya başlandı(13,86). Ticari ismi Holoxan (ASTA-Pharma) olarak kullanılmaktadır. Çocuklarda 2-3 g/m<sup>2</sup> ifosfamide 24 saatlik serumla infüzyon yapılarak uygulanır. Uygulama üç gün üst üste yapılır. Böylece toxisitesinin daha az olduğu görülmüştür.

Klinik kullanımını yaygın olan ifosfamid hastalara uygulanırken bir kürde kullanılan total doz 250-300 mg/kg'dır. Genel olarak günde 50-60 mg/kg'lık bir dozun beş gün arka arkaya uygulanması ile bir kür tamamlanır. Bu uygulama bazen gün aşırı da yapılabilir. Ya da daha küçük dozlarda 25-30 mg/kg olmak üzere on gün arka arkaya uygulanarak kür tamamlanabilir. Bazı dirençli olgularda günde 80 mg/kg'lık doz birbirini izleyen iki-üç günde kullanılabilir.

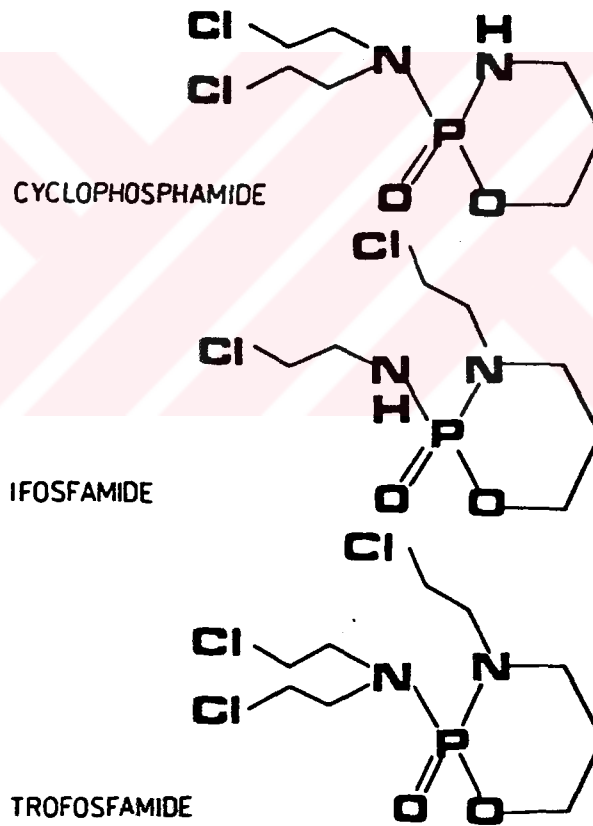
Kullanıldığı yerler, küçük hücreli olmayan (non small cell) akciğer kanseri, bronş karsinoma, over karsinomu, testiküler karsinoma, meme karsinomu, yumuşak doku sarkomu, pankreas karsinomu, hipernefroma, endometris karsinomu, melenoma ve non Hodgkin lenfoma şeklinde sıralanabilir.

#### *Etki Mekanizması:*

Oksijen atomları, fosfor, nitrojen ve karbondan oluşan altı üyeli bir heterosiklik halka olan oxazaphosphorin ailesine üye birçok sitostatik ilaç bulunmaktadır. Oxazaphosphorine-2 oksid yaygın kullanılan sitostatik ilaç cyclophosphamide ve onun izomerleri ifosfamide ve trofosfamid'in ana yapısını oluşturur (Şekil 15).



... tetrahydro-2H-1,3,2-oxazophosphorine-  
-2-oxide

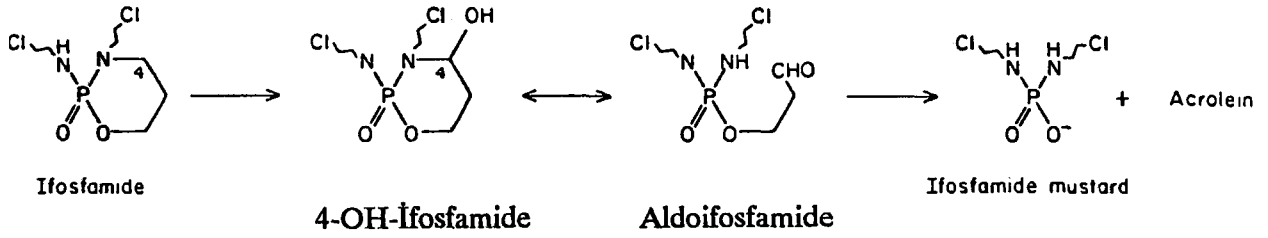


Şekil 15 : Oxazaphosphorine-2 oksit, Cyclophosphamide, Ifosfamide ve Trofosfamide Yapısal Formülleri(45).

Açık formülü [3 (2chloroethyl)- 2 -(2chloroethylamino) tetrahydro-2H-1,2,3 oxazaphosphorine oxide] olan ifosfamide cyclophosphamidin nitrojen mustard türevidir. Etki mekanizması da nitrojen mustard gibidir. İfosfamide bir kloroetil grubunun nitrojen halkasına bağlanması, onda fizikokimyasal farklılığına yol açar. Bu da ifosfamidin daha yüksek suda çözünebilirliği demektir(10,45). Nitrojen mustardın bu 2-kloroetil grubunun reaksiyona girme yeteneği vardır. Bu durum nitrojen atomunda bulunan ve 2-kloroetil grubunu bağlayan bir çift elektron tarafından gerçekleştirilir.

Nitrojen mustard etkisini Guaninin N<sub>7</sub> pozisyonunu etkileyerek gerçekleştirir. Bu kloroetil kolunu guanin bazının N<sub>7</sub> pozisyonuna bağladıktan sonra diğer kloroetil kolunu diğer guaninin aynı yerine bağlar. Böylece bir çapraz bağlantı meydana getirmiş olur. Bu bağlantı aynı zincir üzerindeki guaninler arasında da olabilir. Fakat aynı zincirdeki bağlantının özellikle iki DNA zinciri arasında olması hücrede sitostatik etkinin ortaya çıkması için gerekli esas reaksiyondur. Alkilleyici ajanlar tarafından bağlanmış olan esas parçanın G-G olması şart değildir. DNA'daki primidin ve pürin bazlarının diğer nükleofilik yerleri ile ve fosfat grupları ile de bağlantı yapabilirler. Fakat çapraz bağlantının % 90'ının DNA'nın zinciri ya da zincirleri arasında G-G bazlarında olduğu kabul edilir. Bu durum kesinlikle DNA'nın normal fonksiyonunu etkileyecektir. Aralarında çapraz bağlantı olan DNA zincirleri bir birinden ayrılamayacak ve replikasyona giremeyecektir. DNA'nın replike olamaması hücre aktivasyonunu o noktada durduracaktır. Bunun sonucu DNA'nın ürünü olacak madde oluşamayacaktır(23).

İlacın aktive olabilmesi için karaciğerin mikrozomal mikst fonksiyonlu oksidaz sistemi tarafından metabolik aktivasyona ihtiyacı vardır. İfosfamid metabolizmasında esas aşama 4 karbon pozisyonundaki oksidasyondur. Birleşim, karaciğerde 4-hidroksiifosfamide ve onunla dengede olan aldoifosfamide dönüşür. Aldoifosfamidin daha ileri bir enzimatik oksidasyonu ile karboksi ifosfamid ortaya çıkar. 4-hidroksiifosfamid'in dehidrojenasyonu ile 4 keto ifosfamide oluşur. Son aşamada ise antitümör ajan olan alkilleyici ifosfamid mustard, acrolein oluşur(10,12,23) (Şekil 16).



Şekil 16 : İfosfamidin Metabolizması ve Aktivasyonu(10)

İfosfamidin akciğerde de metabolize olabildiği 1973'de Hill ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Metabolik yol nitelik olarak aynı bulunmuştur. Ancak sayısal olarak farklılıklar bulunmaktadır. İfosfamide kullanan hastalarda 1. günden 5.güne kadar ifosfamide klearansında % 76 oranında artış görülmüştür. Bu da ifosfamide metabolizmasında 5. günün üzerinde zamana bağlı artış bulunduğunu göstermiştir (L.D.Lewis ve ark. 1990).

İfosfamid metabolizmasının büyük bir kısmı karaciğerde sitokrom P-450 sistemi tarafından gerçekleştirildiğinden metabolizmadaki ifosfamid klearansının düşüklüğüne sebep olan, zamana bağlı değişikliğin karaciğer kan dolaşımındaki değişiklikten dolayı değil, karaciğer enzim aktivitesindeki artıştan dolayı olduğu gösterilmiştir(46).

İfosfamidin 4 hidroksi metabolitlerinin serum yarılanma ömrü 4-6 saattir. Aktive olmuş ifosfamid 30 dakikadan daha az bir zamanda kandaki en yüksek düzeyine ulaşır. 5 g/m<sup>2</sup> ifosfamidin verilmesinden sonra 15 saatlik çok uzun bir yarılanma ömrü bildirilmiştir.

Yine aynı metodla 3.8 ile 5 g/m<sup>2</sup>/gün dozdan sonra idrarda % 53 değişmeyen ifosfamide bulunmuştur. Bu oran 1,6 ile 2,4 g/m<sup>2</sup>'de bir ile üçgünlük dozdan sora % 15 olarak bulunmuştur(10,51).



İfosfamid metabolizmasının son ürünü olan acroleinin çok yüksek sitotoksitesi olduğu gösterildi ve bu ilacın antitümör aktivitesinde bir rol oynayabileceği sunulmuştur. Çünkü bu ilacın n-trimethylene grubu anti-tümör aktivitede önemlidir ve acrolein de n-trimethylene grubundan oluşur(3,36).

### ***Toksik Etki***

İfosfamide çok yaygın kullanılan bir antitümör ajan olması ile birlikte çok yüksek toksisiteye sahiptir. Bu yüzden de son yıllarda gündemde olan bir ilaçtır. Özellikle ürolojik etkileri sözkonusudur. Çok sık olarak hemorajik sistite rastlanır. Yapılan bir çalışmada rbdomyosarkoma teşhisi konulan bir hastada ifosamide kullanılmış ve proximal renal tubular asidozis, fosfat üri, glikozüri ve aminoasidüriye sebep olan önemli renal toksisiteye yol açmıştır (R.A. Newbury Ecob ve ark.). İntradermal olarak farelere uygulanan ifosfamide deri ülserlerine sebep olmuştur(52).

İntravenöz verilen İfosfamide bazı zamanlarda ensefalopati ya da daha hafif olarak Merkezi Sinir Sistemi ile ilişkilidir. Ağız oylu ile verildiğinde ise vakaların % 50'sinde bir reversible ensefalopatiye yol açmaktadır.

Ayrıca bulantı, kusma, alopesi, alyuvar, akyuvar ve trombosit sayısında düşme görülebilir(15,52,63,78,86).

Oxazaphosphorine sitotoksik ilaçların toksik etkileri bunların serumdaki konsantrasyon piklerine bağlıdır. En uzun serum yarılanma ömrüne sahip ilaçlar 15,2 saatte (beta faz) ifosfamide, ya da ~ 7 saatte cyclophosphamidedir. Kademeli uygulanan günlük dozlar, yüksek pik oluşturacağından, tek doz uygulamalardan daha az toksik olabilir. Hayvanlarda gerçekleştirilen subakut toksisite çalışmalarında cyclophosphamide ile karşılaştırıldığında ifosfamide daha az toksik bulunmuştur(10,40).

***Teratoloji ve Mutajenite:***

Yapılan çalışmalar acroleinin teratojenik olduğunu göstermiştir. Yine fenil keto isofosfamid ile yapılan hayvan deneylerinde yayaşan tüm sıçan embriyolarının malforme olduğu görülmüştür. Hypoplastik prosensefalon şeklide gözlenen major malformasyon ve gelişme geriliği şeklinde olmaktadır. Bu teratojenik ifosfamid mustard metabolitleri ile olmaktadır(33,55,56).

Nicholson, sitotoksik tedavilerinin teratojenik etkilerinin uygulama zamanına bağlı olduğunu vurgulamıştır. Alkilleyici ajanların, nükleoproteinlerdeki radikalleri çabuk alkilemesi ile ortaya çıkan mitotik zehirlenme, gelişme anındaki dokuları etkiler. Doğal olarak malformasyon ortaya çıkar(39).

Sıçan hepatositleri ve insan leukemia hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada, acroleinin DNA single strand kırıklarına sebep olan yüksek bir aktiviteye sahip olduğu görülmüştür(18).

Bir başka çalışmada ifosfamid uygulanan farelerde teratospermia gelişmiştir (I.Quinto ve ark. 1988). Bunun ya genetik mekanizmalar, yani sperm morfolojisi için çalışan genlerdeki mutasyonlar ya da enzimlerin, hormonların yada ischemic faktörlerin interaksyonu olan epigenetik mekanizmalardan dolayı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca metabolik aktivasyonu takiben Salmonella typhimunum'da yapılan mutajenite testinde mutajenite göstermiştir. R.D.Morte ve ark. yaptığı bir başka çalışmada da ifosfamidin kromozomal düzensizlikleri, onkogenik transformasyonları ve mutasyonları indükledikleri gösterilmiştir. Bu ilacın Drosophila melenogaster ve lenfositlerde klastojenik etkisi olduğu rapor edilmiştir. Bu da abnormal spermlerin üretiminde mutasyonun etkisinin olabileceğini göstermiştir. Özellikle ifosfamidin major üriner metabolitleri mutajenik bulunmuştur. Chinese hamster hücreleri ile yapılan bir başka çalışma da ifosfamidin aktif formu olan ifosfamid mustardın gen mutasyonlarını indüklediği gösterilmiştir(9,19,59,67).

## MATERYAL VE METOD

### A. Materyal

#### *I. Deney Hayvanları:*

İfosfamid'in (Holoxan) uygulanan farklı dozlarının *Rattus norvegicus* (Wistar albino) kemik iliği mitotik kromozomları üzerine etkisini araştırmak için yaptığımız bu çalışmada DETAM (İ.Ü.Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi)'dan temin edilen, sexüel maturiteye erişmiş 10-12 haftalık, ağırlıkları 120-180 gr. arasında değişen deney hayvanları kullanıldı.

Çalışmamız süresince ilaç verilen denek grupları ile kontrol grupları normal laboratuvar şartlarında tutuldu. Deney hayvanlarının beslenmeleri için standart laboratuvar yemi (pellet) kullanıldı.

Kullandığımız Wistar Albino sıçanların diploid kromozom ( $2n$ ) sayısı 42'dir.

#### *II. Deney Grupları:*

Deneye alınan erkek ve dişi sıçanların sayısı eşit tutularak her bir doz için 10'u denek, 5'i kontrol 15 hayvan olmak üzere toplam 45 sıçan kullanıldı.

**I. Doz Grubu (5 erkek, 5 dişi):**

25 mg/kg'lık ifosfamide uygulanan bu doz grubunda ilaç, 200 gr. ağırlığındaki Wistar Albino sıçan için 5 mg ifosfamide 0,5 cc steril sulandırma solusyonunda çözülecek şekilde hazırlandı.

**II. Doz Grubu (5 erkek, 5 dişi)**

100 mg/kg'lık ifosfamide uygulanan bu doz grubunda, ilaç 200 gr. ağırlığındaki Wistar Albino sıçan için 20 mg ifosfamide 0,5 cc steril sulandırma solüsyonunda hazırlandı.

**III. Doz Grubu (5 erkek, 5 dişi)**

400 mg/kg'lık ifosfamide uygulanan bu doz grubunda ilaç, 200 gr. ağırlığındaki Wistar Albino sıçan için 80 mg. ifosfamide 0,5 cc sulandırma solusyonunda çözülerek hazırlandı.

**Kontrol Grubu (7 dişi, 8 erkek):**

15 sıçandan oluşan kontrol grubunda 2,5 cc/kg dozunda, ilacı hazırlamada kullanılan steril sulandırma solusyonundan uygulandı. 200 gr. sıçan için 0,5 cc olacak şekilde vücut ağırlığına göre verildi.

**B. Metod**

Belirlenen dozlardaki ifosfamide 10 sıçandan oluşan grublarda sıçanlara insülin enjektörü ile intraperitoneal olarak uygulandı. Hergün üç hayvan kullanıldı. Bunlardan ikisi denek (biri erkek, diğeri dişi), diğeri ise kontrol idi. Böylece deneklerle kontrolleri aynı laboratuvar şartlarında tutarak, eşit şartlarda strese soktuk.

İlacın verilmesinden sonra 20. saatte insülin enjektörü ile intraperitoneal olarak colchicine uygulandı. Colchicine - Sigma (C-9754) den 1 mg/kg.lık dozda uygulanan bir grup *Rattus norvegicus*'da kemik iliğinden yaptığımız preparatlarda yeterli sayıda metafaz plağı elde ettiğimizden deneyimizi aynı dozda devam ettirdik. 200 gr. ağırlığındaki Wistar Albino için 0,5 cc olacak şekilde hazırlanarak, sıçanlara uygulandı. Colchicine verildikten 4 saat sonra, yani ilaç verilmesinden 24 saat sonra hayvanlar sakrifiye edildi.

### ***Kemik İliği Direk Metodu***

a) Materyalin alınışı ve hipotonik şok: Sakrifiye edilen sıçanların her iki femuru da çıkarılıp, yumuşak dokudan temizlendi. Sonra makasla femurun her iki ucu kesilip, distal ucuna yumuşak ve kemik çapından daha dar polietilen boru takıldı. Borunun diğer ucuna ise (içinde 8 ml 0,075 M KCl bulunan) 37° C'de ısıtılmış hipotonik şok solüsyonu içeren enjektör takıldı. Bu enjektörün pistonu yardımı ile basınç yapılarak kemik iliği hipotonik şok solüsyonu ile birlikte 15 cc'lik bir santrifüj tübüne alındı. Materyal vortexde iyice homojenize edildi. Etüvde 37°C'de 20 dakika inkübe edildikten sonra 600 rpm'de 6 dakika santrifüj edildi. Supernatal atıldı.

b) Fiksasyon: Dipte çöken hücrelere (pellet) o anda taze hazırlanmış 3:1 metanol/asetik asit karışımından oluşan carnoy fiksatifinden 7 ml. ilave edildi. Hücrelerin birbirine yapışmamları için vortex yardımı ile azar azar ilave edildi. Parafilm ile ağızları kapatılan tüpler buzdolabında (+4°C'de) bir gece bekletildi. Ertesi gün çıkarılan tüpler 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatal atıldı. Pellet üzerine 5 ml taze hazırlanmış fiksatif ilave edildi. 5 dakika 1200 rpm'de santrifüj edildi. Bu işlem 5 kez daha tekrarlandı. Üst sıvı atıldıktan sonra tüpün dibindeki pellete 2-3 cc fiksatif ilave edildikten sonra hücre suspansiyonu hazırlandı.

c) Preparatların Hazırlanması: Cam kalemi ile numaralandırılan lamlar, iyice temizlendikten sonra metanolden geçirildi ve distile su ile yıkandı. İçinde distile su bulunan cam şalede (+4°C)'de bekletildi.

Soğuk ve ıslak lamlar üzerine (suyun fazlası filtre kağıdına alındı) hazırlanan fiksatif hücre suspansiyonundan bir iki damla yaklaşık 20 cm yükseklikten hızla damlatıldı. Lamlar oda ısısında kurutuldu.

Her hayvan için en az iki preparat hazırlandı. Artan doz gruplarında bu sayı altıya kadar çıktı.

d) Boyama: Hazırlanan lamlar Giemsa boyası ile solid boyandığı gibi, GTL (G:G bandı, T: Tripsin L: Leishman) ile de bantlandı.

**1- Giemsa:**

Hazırlanan lamlar Giemsa boyasında 7 dakika boyandı.

Giemsa boyası : 90 cc distile su

1,5 cc NH<sub>4</sub> OH

100 cc'ye süzölmüş Giemsa ile tamamlandı.

Boyama süresi biten preparatlar akarsu ile yıkandı. Havada kurutuldu. Böylece ışık mikroskobu ile incelenecek hale getirildi.

**2- GTL Bantlama (G: G Bandı, T: Tripsin, L:Leishman)**

- Preparatlar 5-20 saniye tripsinle muamele edildi.

- Salinle, daha sonra da buffer ile yıkandı

- 5 dakika 1/5 oranında Leishman ile boyandı,

- Tekrar buffer ile yıkanarak oda ısısında kurumaya bırakıldı.

**Solüsyonlar**

Saline : 9 gr. NaCl 1000 ml. distile suda çözdüröldü.

Tripsin : 0,02 mg. tripsin 100 cc salinde çözdüröldü.

Buffer : 3,4 gr. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 ml distile suda çözdüröldü.

pH : 6,8 olacak şekilde ayarlandı.

**Boya:**

Stok; 0,3 gr. Leishman 200 ml metanolde 70°C'de bir gece bekle-tildi.

Kullanım solüsyonu; Stok boyadan süzölerek 1:5 oranında buffer ile dilue edildi.

*e) Mikroskopta İnceleme ve Değerlendirme Kriterleri:*

Preparatlar Letiz-Orthoplan ve Zeiss-Axioskop ışık mikroskobunda x100 akromat objektifte incelendi.

Fotoğraflar Zeiss-MC 100 otomatik kamarada AGFA-ORTHO film ile 25 ve 50 ASA'da çekilmiştir.

Bazı preparatlarda intakt metafazların az oluşu nedeni ile her hayvan için en az 22 en çok 50 metafaz plağı incelendi. x100 büyütmede incelenen metafazlar Preston ve arkadaşlarının (1987) modifiye ettiği "Kromozom ve Kromatid aberasyon analiz şemasından" yararlanılarak hipoploidi, poliploidi, hiperploidi gibi sayı anomalileri, kromozom ve kromatid tipi kırık, ring kromozom, gap gibi morfolojik anomaliler yönünden değerlendirildi (Tablo 1)(66).

Mitotik (MI); Giemsa ile boyanan preparatlarda ışık mikroskobunda, her deney hayvanında 1000 hücre sayılarak bunların arasında profaz başlangıcından telofaz sonuna kadar bölünme gösteren hücreler kaydedildi. Mitotik index mitoz/1000 hücre formülüne göre hesaplandı.

Kromozomların solid karyogramları boylarına göre altışarlı sıralar halinde dizilerek hazırlandı(7).

Bantlı karyogramı ise Gallimore ve Richardson'ın, 1973'de yaptığı idiograma göre hazırlandı(62) (Şeki 17).

Bulunan bu değerler C.T.F Biyoistatistik Bilimdalı yardımı ile istatistik bakımdan değerlendirildi.



Şekil 17 : Sıçan kromozomlarının bantlı idiogramı. (Gallimore ve Richardson, 1973)(62)



Tablo 1 : Metafaz kromozomlarının analiz formu

CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ BİYOLOJİK BİLİMLER BÖLÜMÜ  
GENETİK ANABİLİM DALI  
SİTOGENETİK BİRİMİ

TARİH: 9./10/93

İnceleyen: Dilhan Kuru Mikroskop: ZEISS

Hasta: WA(400)4 ♀

Prot.No:

Lab.No:

Sıra No	Prep.No.	Pozisyon	Not	Formül
1	4a / 1	103 / 9-112 3 / 7-10		42, XX
2	F A	94 / 7-101 3 / 6-9	U ctb 2crg	41
3	F A	91 / 5-96 4 / 10-14	ctg	40
4	F	96 / 9-105 5 / 10-14	ctb	43
5		100 / 6-106 4 / 6-10	ctb	41
6		104 / 1-105 4 / 5-9	ctg ctb	42, XX
7		106 / 2-108 5 / 10-14	ctg	42, XX
8		115 / 7-122 6 / 3-9	ctb, ctg, ctb	42, XX
9		124 / 5-129 6 / 3-9	ctb, ctb, ctb, ctb	41
10		115 / 2-117 6 / 9-15		42, XX

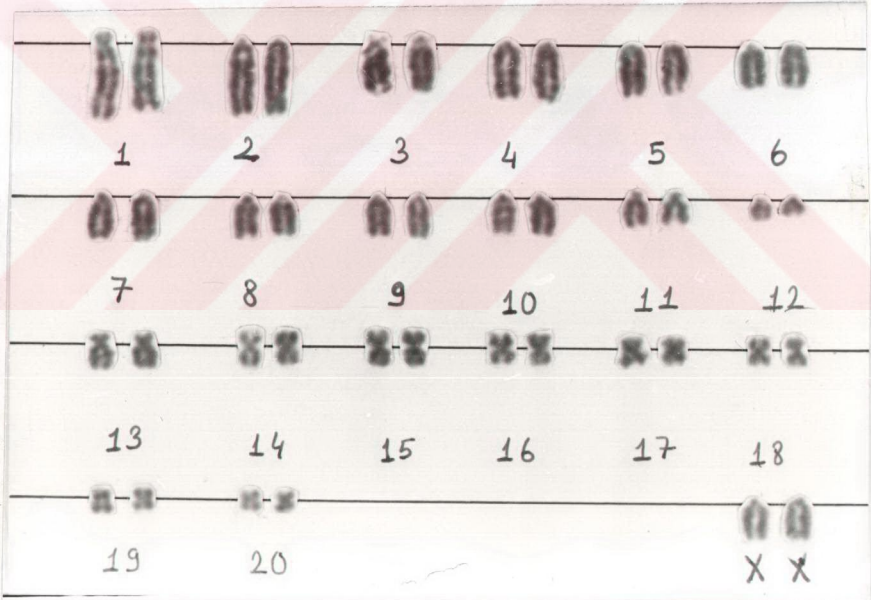
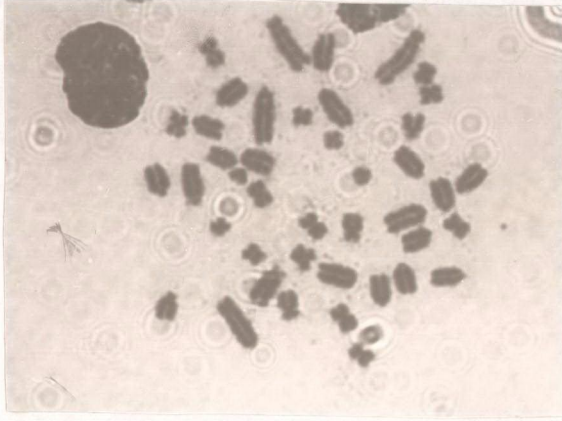
## B U L G U L A R

---

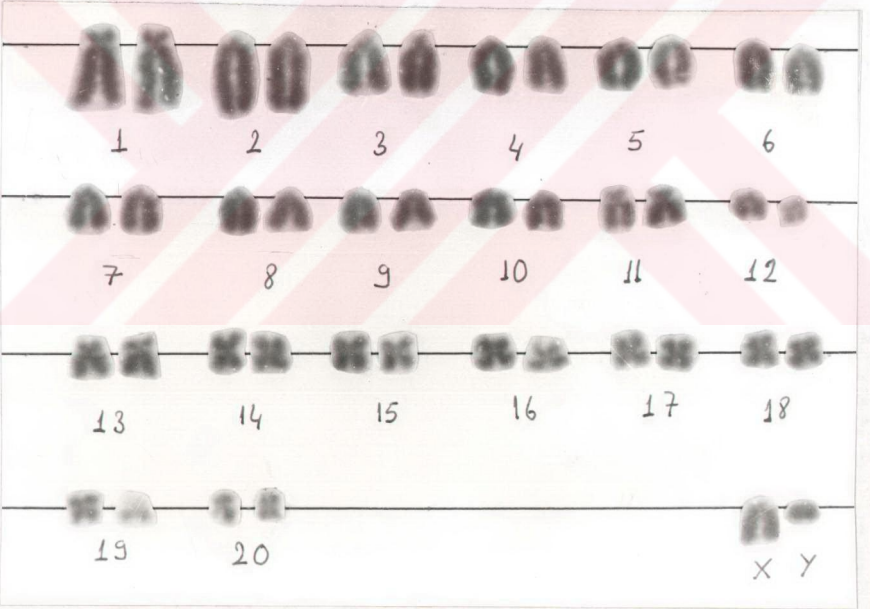
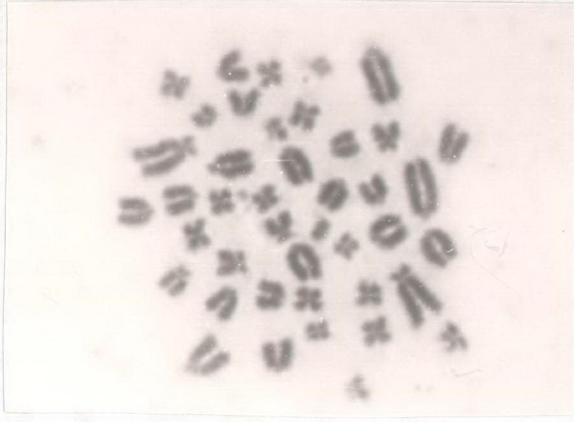
### "İfosfamide"nin Dozlarına Göre Mitotik İndeks ve Kromozomal Düzensizlikler

15 kontrol ve 30 denek olmak üzere toplam 45 Wistar Albino sıçanın kullanıldığı bu çalışmada kemik iliğinden direk kromozom preparatları hazırlandı. Giemsa boyası ile solid boyanan bu preparatlarda mitotik indeks, kromozom yapısı ve sayı düzensizlikleri incelenerek, karyogramları yapıldı (Resim 1, 2). Ayrıca preparatlara uygulanan GTL bantlama yöntemi ile bantlı kromozomlar elde edilerek, karyogramları hazırlandı (Resim 3).

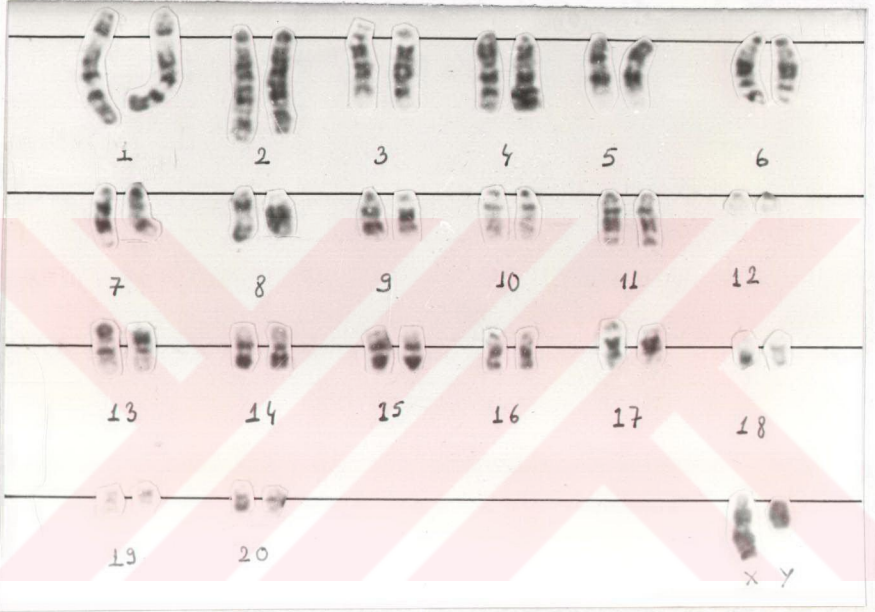
Araştırmamızın sonuçları Tablo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9'da görüleceği üzere ilaç dozlarına göre aşağıda özetlenmiştir. Bulgulara ait örnekler resimlerde gösterilmiştir (Resim 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24).



Resim 1: Dişi Wistar Albino sıçanının Giemsa boyama yöntemi ile metafaz kromozomlarının ışık mikroskopunda görünümü ve hazırlanan karyogramı.  
Karyotip: 42, XX



Resim 2: Erkek Wistar Albino sıçanının Giemsa boyama yöntemi ile metafaz kromozomlarının ışık mikroskopunda görünümü ve hazırlanan karyogramı.  
Karyotip: 42, XY



Resim 3: Erkek Wistar Albino sıçanının Tripsin-Giems a bantlama yöntemi (G bandı) ile hazırlanan metafaz kromozomlarının karyogramı.  
Karyotip: 42, XY



### *Kontrol Grubu:*

7 dişi 8 erkek olmak üzere 15 sıçan kullanıldı. Her deney hayvanında 1000 hücre sayılarak incelenen toplam 15000 hücrede 2906 mitoz rastlanılmıştır (Resim 4).

Her bir sıçan için 50 alan olmak üzere 750 metafaz plağı incelendi. Bunlardan 741 alanda  $2n=42$  kromozom sayılırken, 5 alanda 40 ve 4 alanda 41 kromozom olmak üzere 9 alanda hipoploidi bulundu. Poliploidi ve hiperploidiye rastlanmadı. Kromatid ve kromozom tipi gap ve kırıklara rastlanmadı. Ayrıca kromatid exchange ve kromatin fragmenti gibi diğer kromozomal anomalilerde bulunmadı (Tablo 2,3).

### *I. Doz Grubu:*

25 mg/kg dozunda ifosfamide uygulanan birinci doz grubunda 5 dişi ve 5 erkek olmak üzere 10 sıçan kullanıldı. Her deney hayvanında 1000 hücre sayılarak incelenen 10.000 hücrede 2163 mitoz rastlanılmıştır.

Her hayvan için 50 saha olmak üzere toplam 500 alandan 450'sinde normal  $2n=42$  sayım bulunurken, bir alanda  $3n=63$  ve 4 alanda  $4n=84$  sayım yapılarak 5 alanda poliploidi bulundu. 11 alanda 40 ve 24 alanda 41 kromozom sayılarak 35 alanda hipoploidi tesbit edildi. 10 alanda 43 kromozom tesbit edilerek hiperploidi bulundu.

Yapısal anomaliler açısından incelendiğinde, 14 alanda kromatid tipi gap, 7 alanda kromatid tipi kırık bulundu. Ayrıca 3 alanda kromozom tipi gape rastlandı. 1 alanda kromatid exchange ve 2 alanda kromatin fragmentlerine rastlandı. Bu doz grubunda kromozom tipi kırıklara rastlanmadı (Tablo 4). İncelenen bazı metafaz alanlarında bir kaç tip yapısal anomaliye bir arada rastlandığından, incelenen kromozom sayısı açısından da değerlendirmeye alındı. İncelenen toplam 21153 kromozomdan 17'sinde kromatid tipi gap, 1 tanesinde kromatid tipi kırık ve 3 tanesinde de kromozom tipi gap bulundu (Tablo 5) (Resim 6,7,8,9,10,11,12). Bu doz grubunda kromozomal anomaliler % 0,080 kromatid tipi gap % 0,047 kromatid tipi kırık ve % 0,014 kromozom tipi gap şeklinde dağılmaktadır.

### II. Doz Grubu:

100 mg/kg dozunda ifosfamide uygulanan ikinci doz grubunda da 5 dişi ve 5 erkek olmak üzere 10 sıçan kullanıldı. Her deney hayvanında 1000 hücre sayılarak incelenen 10.000 hücrede 457 mitoz rastlanılmıştır.

İki hayvanda yeterli metafaz bulunamadığından 50 sayıma ulaşılamadı, ancak diğer 8 hayvanda 50'şer metafaz alanı bulunarak, toplam 491 metafaz alanı incelendi. 393 alanda  $2n=42$  olan normal kromozom sayısı bulundu.  $3n=63$  kromozom sayımlı alan hiç bulunmazken, 3 alanda  $4n=84$  kromozom sayımı bulundu. 15 alanda 40 ve 61 alanda 41 kromozom sayılarak toplam 76 hipoploidili alan bulundu. 16 alanda 43, 3 alanda 44 sayım bulunarak toplam 19 hiperploidili alan tesbit edildi.

Yapısal anomaliler açısından incelendiğinde 25 alanda kromatid tipi gap ve 27 alanda kromatid tipi kırık, 4 alanda kromozom tipi gap ve 4 alanda kromozom tipi kırık tesbit edildi. Ayrıca 3 alanda kromatid exchange ve 5 alanda kromatin parçacıklarına rastlanıldı (Tablo 6).

İncelenen kromozom sayısı açısından değerlendirmeye alındığında 21055 kromozomdan 30'unda kromatid tipi gap, 38'inde kromatid tipi kırık, 4'ünde kromozom tipi gap ve 5'inde kromozom tipi kırık bulundu (Tablo 7).

Bu doz grubunda da birçok metafaz alanında bir kaç yapısal anomaliler bir arada tesbit edildi (Resim 13,14,15,16). Tesbit edilen kromozomların yapısal anomalileri % 0,018 kromatid tipi kırık, % 0,14 kromatid tipi gap ve % 0,02 kromozom tipi kırık ve % 0,018 kromozom tipi gap şeklinde dağılım göstermektedir.

### III. Doz Grubu:

400 mg/kg dozunda ifosfamide uygulanan üçüncü doz grubunda 5 dişi ve 5 erkek olmak üzere toplam 10 sıçan kullanıldı. Her sıçanda 1000 hücre sayılarak incelenen 10.000 hücrede 224 mitoz rastlanılmıştır. Mitotik indeksin çok düşmesi ve uygun metafaz alanlarının çok azalması nedeni

ile her hayvanda 50 metafaz alanı incelenemedi (Resim 5). Bununla birlikte toplam 453 metafaz alanı incelendi. 453 alanın 353'ünde normal  $2n=42$  kromozom bulundu.  $3n=63$  kromozomlu alana rastlanmadı. 5 alanda  $4n=84$  kromozomlu alan tesbit edildi (Resim 17).

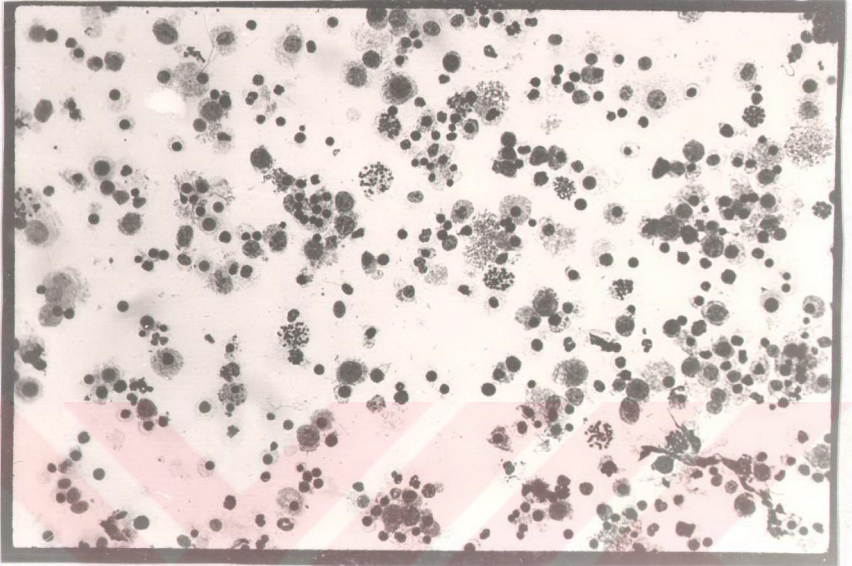
40 kromozomlu 12 ve 41 kromozomlu 57 alan olmak üzere toplam 69 hipoploidili alan bulundu. 43 kromozomlu 24 ve 44 kromozomlu 2 alan olmak üzere 26 hiperploidili alan tesbit edildi.

Yapısal anomaliler açısından incelendiğinde 86 alanda kromatid tipi gap, 157 alanda kromatid tipi kırık, 9 alanda kromozom tipi gap ve 33 alanda kromozom tipi kırık bulundu. İncelenen bir alanda 2 metasentrik kromozomun sentromerlerinden kırılarak, parça kaybına uğramadan dörtlü bir formasyon oluşturduğu görüldü (Resim 18). İki alanda kromatid exchange, 17 alanda kromatin parçaları tesbit edilmiştir (Tablo 8).

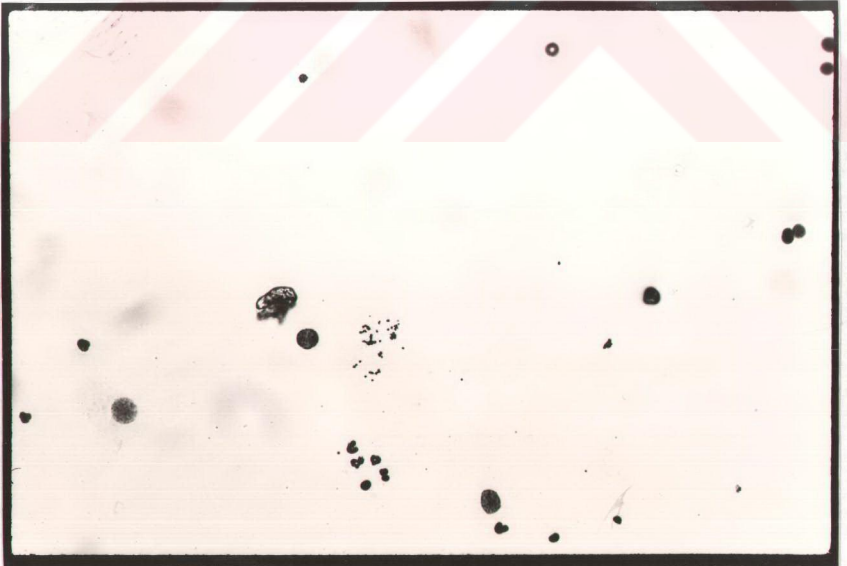
İncelenen kromozom sayısı açısından değerlendirildiğinde, incelenen toplam 19476 kromozomun 104'ünde kromatid tipi gap, 49'unda kromozom tipi kırık, 282'sinde kromatid tipi kırık ve 10'unda kromozom tipi gap tesbit edilmiştir (Tablo 9).

Bu doz grubunda da incelenen birçok metafaz alanında gap ve kırıklar bir arada görülmüştür (Resim 19,20,21,22,23,24). Tesbit edilen kromozom anomalilerinin dağılımı, % 1,44 kromatid tipi kırık, % 0,53 kromatid tipi gap, % 0,05 kromozom tipi gap ve % 0,25 kromozom tipi kırık şeklindedir.





Resim 4: Işık mikroskopunda kontrol grubuna ait mitozların görünümü



Resim 5: Işık mikroskopunda, 400 mg/kg'lık doz grubuna ait mitozların görünümü

Tablo 2 : Kontrol grubunun, Mitotik İndeks, Kromozom sayı ve yapı anomalilerini içeren metafaz alanlarına göre incelenmesi.

KONTROL GRUBU			SAYISAL ANOMALİLER						YAPISAL ANOMALİLER				Mitotik İndeks %
Uygulanan Steril su Miktarı	Denek No ve Cinsiyeti	İncelenen Mitoz Alanları	Normal	Poliploidi		Aneuploidi		Kromatid		Kromozom	Kromatid Exchange	Kromatin Fragmenti	
				63	84	Hipoploidi	Hiperploidi	Cup	Kırık				
	WA1/D	50	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	324
	WA2/D	50	49	-	-	1	-	-	-	-	-	-	225
	WA3/E	50	49	-	-	1	-	-	-	-	-	-	171
2,5 cc/kg	WA4/D	50	48	-	-	1	1	-	-	-	-	-	409
Steril su	WA5/D	50	48	-	-	-	2	-	-	-	-	-	244
Uygulandı	WA6/E	50	48	-	-	1	1	-	-	-	-	-	342
	WA7/E	50	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	395
	WA8/D	50	49	-	-	1	-	-	-	-	-	-	287
	WA9/D	50	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	116
	WA10/E	50	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	151
	WA11/E	50	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	205
	WA12/E	50	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	205
	WA13/E	50	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	170
	WA14/E	50	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	198
	WA15/D	50	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	184
TOPLAM	15	750	741			5	4						2906

Tablo 3 : Kontrol grubunun, kromozomal yapı anomalilerini içeren kromozom sayısına göre incelenmesi

Uygulanan Steril Su Miktarı	Denek No ve Cinsiyeti	İncelenen Kromozom Sayısı	Kromatid		Kromozom	
			Gap	Kırık	Gap	Kırık
Kontrol Grubu	WA1/D	2100	-	-	-	-
	WA2/D	2098	-	-	-	-
2,5 cc/kg Steril su Uygulandı	WA3/E	2098	-	-	-	-
	WA4/D	2097	-	-	-	-
	WA5/D	2098	-	-	-	-
	WA6/E	2097	-	-	-	-
	WA7/E	2100	-	-	-	-
2,5 cc/kg Steril su Uygulandı	WA8/D	2098	-	-	-	-
	WA9/D	2100	-	-	-	-
	WA10/E	2100	-	-	-	-
	WA11/E	2100	-	-	-	-
	WA12/E	2100	-	-	-	-
	WA13/E	2100	-	-	-	-
	WA14/E	2100	-	-	-	-
	WA15/D	2100	-	-	-	-
TOPLAM	15	31486	0	0	0	0



Tablo 4 : 25 mg/kg'lık I. doz grubunun, Mitootik İndeks, Kromozom sayısı ve yapı anomalilerini içeren metçaz alanlarına göre incelenmesi

I.DOZ GRUBU			SAYISAL ANOMALİLER						YAPISAL ANOMALİLER						Mitootik İndeks % <sub>o</sub>
Uygulanan İföfamide Dozu	Denek No ve Cinsiyeti	İncelenen Mitoz Alanları	Normal	Poliploidi		Aneuploidi		Kromatid		Kromozom		Kromatid Exchange	Kromatin Fragmenti		
				63	84	Hipoploidi	Hiperploidi	Gap	Kırık	Gap	Kırık				
25 mg/kg dozunda İföfamide Uygulandı	WA1E	50	45	-	1	4	-	1	1	2	-	-	-	169	
	WA2/D	50	45	-	1	2	1	-	3	-	-	-	-	191	
	WA3/D	50	43	-	-	1	4	2	-	4	1	-	-	172	
	WA4/E	50	48	-	-	-	-	2	-	3	1	1	-	318	
	WA5/E	50	45	-	2	1	2	-	-	-	-	-	-	297	
	WA6/D	50	45	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	173	
	WA7/E	50	45	1	-	-	2	2	-	-	1	-	-	283	
	WA8/D	50	45	-	-	2	2	1	-	-	-	-	-	139	
	WA9/D	50	46	-	-	1	2	1	-	2	2	-	-	188	
	WA10/E	50	43	-	-	3	3	1	-	1	1	-	1	-	233
TOPLAM	10	500	450	1	4	11	24	10	-	14	7	3	-	2163	

Tablo 5 : 25 mg/kg/günlük I. doz grubunun, kromozomal yapı anomadilerini içeren kromozom sayısına göre incelenmesi

Uygulanan İfosfamide Dozu	Denek No ve Cinsiyeti	İncelenen Kromozom Sayısı	Kromatid		Kromozom	
			Gap	Kırık	Gap	Kırık
I.Doz Grubu 25 mg/kg dozunda İFOSFAMİDE Uygulandı	WA1/E	2138	2	2	2	-
	WA2/D	2139	4	-	-	-
	WA3/D	2096	4	1	-	-
	WA4/E	2102	3	1	1	-
	WA5/E	2180	-	-	-	-
	WA6/D	2093	-	-	-	-
	WA7/E	2121	-	1	-	-
	WA8/D	2095	-	-	-	-
	WA9/D	2097	3	3	-	-
	WA10/E	2092	1	2	-	-
	TOPLAM	10	21.153	17	10	3



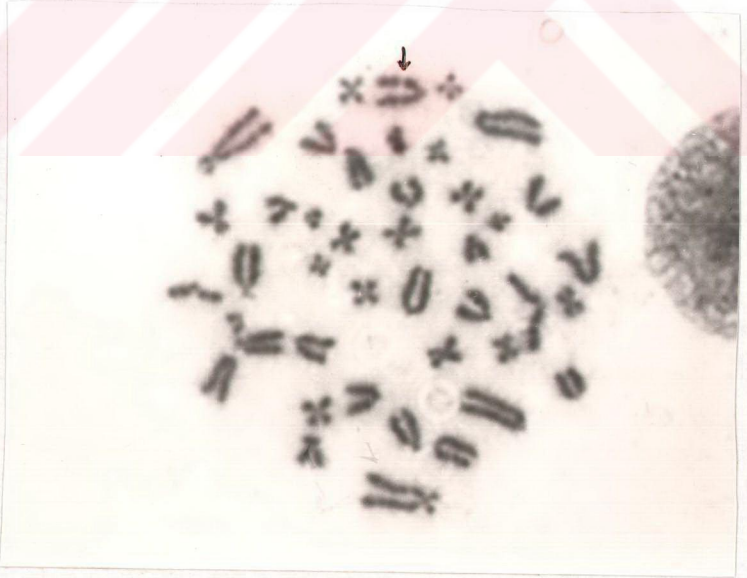
Resim 6 : 25 mg/kg'lık doz grubuna ait kromatid tipi kırık



Resim 7 : 25 mg/kg'lık doz grubuna ait kromatid tipi gap



Resim 8 : 25 mg/kg'lık doz grubuna ait kromatid exchange ve kromatid tipi kırık.  
 $2n-1=41$  (Hipoplöidi)



Resim 9 : 25 mg/kg'lık doz grubuna ait kromatid tipi gap





Resim 10: 25mg/kg'lık doz grubuna ait kromozom ve kromatid tipi kırıklar.  $2n+1= 43$  (Hiperploidi)



Resim 11: 25 mg/kg'lık doz grubuna ait kromozom ve kromatid tipi kırıklar, kromatin parçaları





Resim 12 : 25 mg/kg'lık doz grubuna ait kromozom tipi gap

Tablo 6 : 100 mg/kg'lık II. doz grubunun, Mitotik İndeks, Kromozom sayı ve yapı anomalilerini içeren metafaz alanlarına göre incelenmesi

II.DOZ GRUBU			SAYISAL ANOMALİLER										YAPISAL ANOMALİLER					Mitotik İndeks %
Uygulanan İfosaunide Dozu	Denek No ve Cinsiyeti	İncelenen Mitoz Alanları	Normal	Poliploidi	Aneuploidi		Kromatid		Kromozom		Kromatid Exchange	Kromatin Fragmenti						
					Hipoploidi	Hiperploidi	Gap	Kırık	Gap	Kırık								
100 mg/kg dozunda İfosfamide uygulandı	WA1/D	50	44	-	-	4	2	-	2	1	1	-	-	1	39			
	WA2/E	42	35	-	-	1	2	2	6	7	-	-	-	1	35			
	WA3/D	50	41	-	2	1	4	2	-	4	6	2	3	1	51			
	WA4/E	50	41	-	-	3	5	1	-	5	-	-	1	-	48			
	WA5/D	50	44	-	-	1	3	2	-	3	2	-	-	1	61			
	WA6/E	50	38	-	-	-	9	3	-	-	3	-	-	-	58			
	WA7/E	50	40	-	-	4	6	-	-	1	2	-	-	-	30			
	WA8/D	49	37	-	1	1	8	1	1	2	1	1	-	-	36			
	WA9/D	50	39	-	-	3	7	1	-	1	4	-	-	-	39			
	WA10/E	50	34	-	-	1	13	2	-	1	1	-	-	1	60			
TOPLAM	10	491	393	-	3	15	61	16	3	25	27	4	4	3	457			

Tablo 7 : 100 mg/kg'lık II. doz grubunun, kromozomal yapı anomalilerini içeren kromozom sayısına göre incelenmesi

Uygulanan İfosfamide Dozu	Denek No ve Cinsiyeti	İncelenen Kromozom Sayısı	Kromatid		Kromozom	
			Gap	Kırk	Gap	Kırk
II.Doz Grubu	WA1/D	2096	2	1	1	-
	WA2/E	1766	6	12	-	-
	WA3/D	2180	6	8	2	4
	WA4/E	2090	5	-	-	1
	WA5/D	2097	3	3	-	-
	WA6/E	2472	-	4	-	-
	WA7/E	2086	1	2	-	-
	WA8/D	2093	5	1	1	-
	WA9/D	2088	1	6	-	-
	WA10/E	2087	1	1	-	-
<b>TOPLAM</b>	10	21055	30	38	4	5



Resim 13 : 100 mg/kg'lık doz grubuna ait kromatid exchange



Resim 14: 100 mg/kg'lık doz grubuna ait kromozom ve kromatid tipi kırık ve kromatid tipi gap





Resim 15: 100 mg/kg'lık doz grubuna ait kromozom ve kromatid tipi kırık ve kromatid tipi gap,  $2n+2=44$  (Hiperploidi).



Resim 16: 100 mg/kg'lık doz grubuna ait kromatid tipi kırık

Tablo 8 : 400 mg/kg'lık III doz grubunun, Mitotik İndex, Kromozom sayı ve yapı anomalilerini içeren metafaz alanlarına göre incelenmesi

III.DOZ GRUBU			SAYISAL ANOMALİLER						YAPISAL ANOMALİLER											
			Normal			Aneuploidi			Kromozom			Kromatid Exchange			Kromatin Fragmenti			Mitotik İndeks %60		
						Poliploidi	Hipoploidi	Hiperploidi												
Uygulanan İfosanide Dozu	Denek No ve Cinsiyeti	İncelenen Mitoz Alanları	42	63	84	40	41	43	44	Gap	Kırık	Gap	Kırık	Gap	Kırık	1	2	28		
400 mg/kg dozunda İfosanide Uygulandı	WA1/E	40	32	-	-	-	6	2	-	13	13	-	1	-	-	1	2	28		
	WA2/D	50	34	-	-	2	12	2	-	3	6	-	-	-	-	-	4	16		
	WA3/E	50	37	-	-	-	3	8	2	-	-	-	2	-	-	1	33			
	WA4/D	50	36	-	-	-	3	7	4	-	19	28	4	7	-	1	37			
	WA5/E	50	32	-	1	2	9	6	-	8	18	-	-	-	3	26				
	WA6/D	50	43	-	-	-	-	6	1	-	4	10	-	1	-	2	25			
	WA7/E	50	40	-	-	-	1	4	5	-	14	23	1	9	-	-	20			
	WA8/E	41	37	-	-	3	-	1	-	-	9	22	1	3	-	3	5			
	WA9/D	22	19	-	-	-	-	1	1	1	5	16	1	7	1	1	4			
	WA10/D	50	43	-	1	1	3	1	1	1	11	21	2	3	-	-	30			
TOPLAM	10	453	353	-	5	12	57	24	2	86	157	9	33	2	17	224				

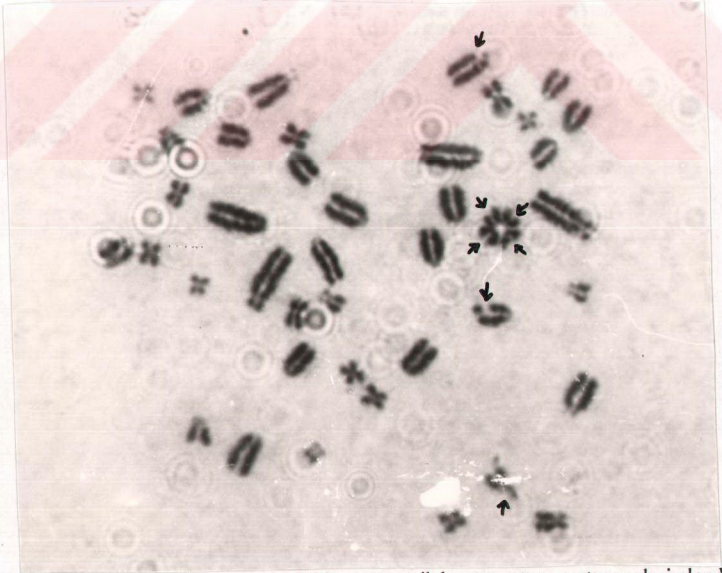
Tablo 9 : 400 mg/kg'lık III doz grubunun, kromozomal yapı anomalilerini içeren kromozom sayısına göre incelenmesi

Uygulanan İfosfamide Dozu	Denek No ve Cinsiyeti	İncelenen Kromozom Sayısı	Kromatid		Kromozom	
			Gap	Kırk	Gap	Kırk
III.Doz Grubu  400 mg/kg dozunda İfosfamide Uygulandı	WA1/E	1676	19	18	-	1
	WA2/D	2086	4	7	-	-
	WA3/E	2088	-	-	-	2
	WA4/D	2091	21	48	4	9
	WA5/E	2135	7	24	-	-
	WA6/D	2095	4	12	-	2
	WA7/E	2099	17	55	1	16
	WA8/E	2140	12	47	1	5
	WA9/D	926	6	42	1	12
	WA10/D	2140	14	29	3	2
TOPLAM	10	19.476	104	282	10	49





Resim 17: 400 mg/kg'lık doz grubuna ait poliploidi  $4n=84$



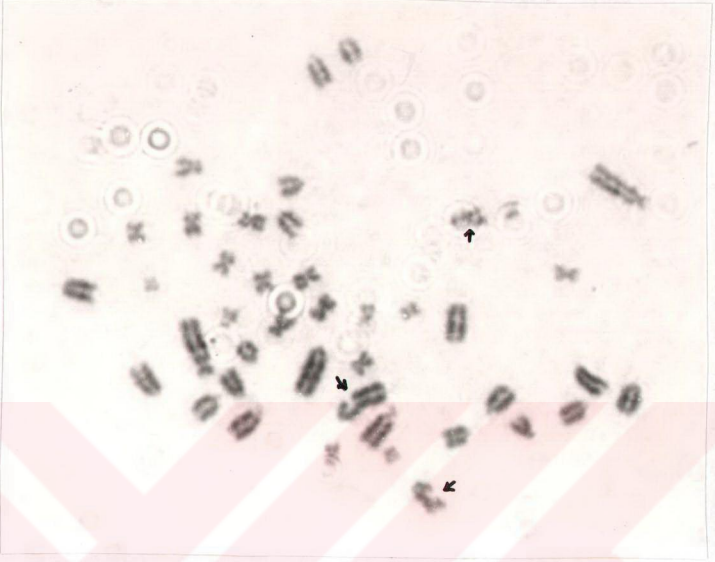
Resim 18: 400 mg/kg'lık doz grubuna ait iki metasentrik kromozomun sentromerlerinden kırılarak oluşturdukları dörtlü formasyon. Kromatid tipi kırık ve gapler.



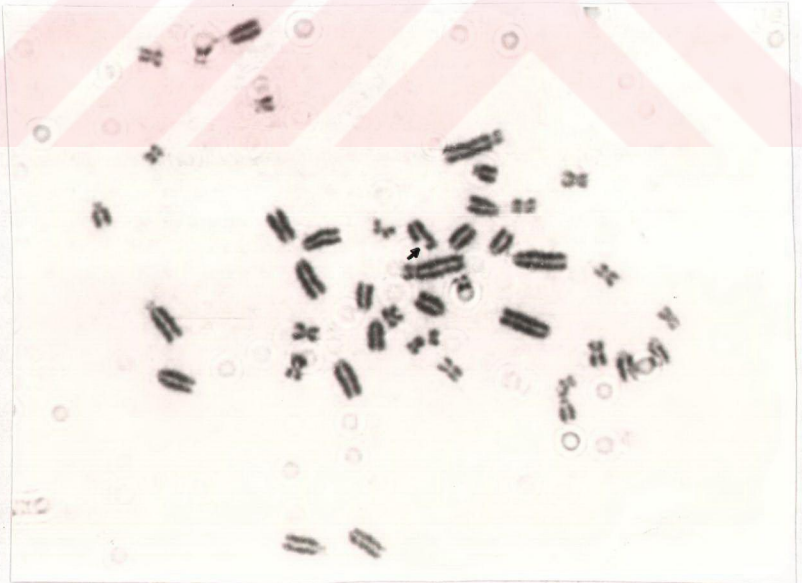
Resim 19: 400 mg/kg'lık doz grubuna ait kromozom ve kromatid tipi kırık, kromatid tipi gap



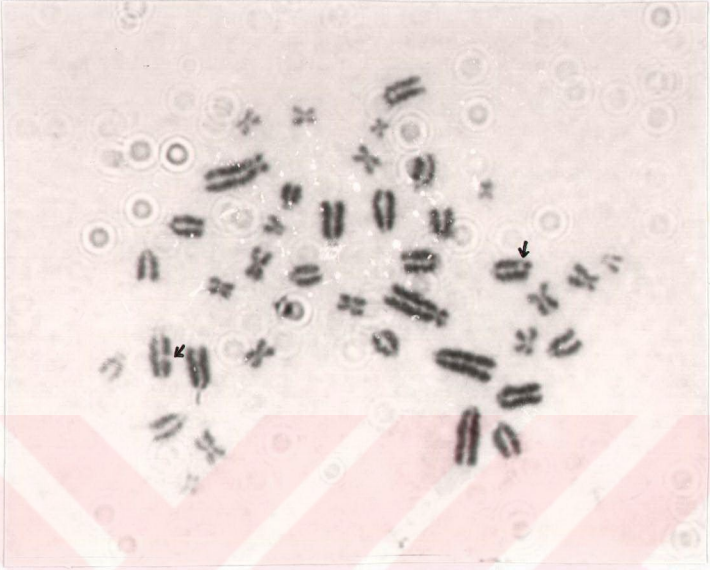
Resim 20: 400 mg/kg'lık doz grubun ait kromatid exchange, kromozom ve kromatid tipi kırık.  
 $2n-1=41$  (Hipoplöidi)



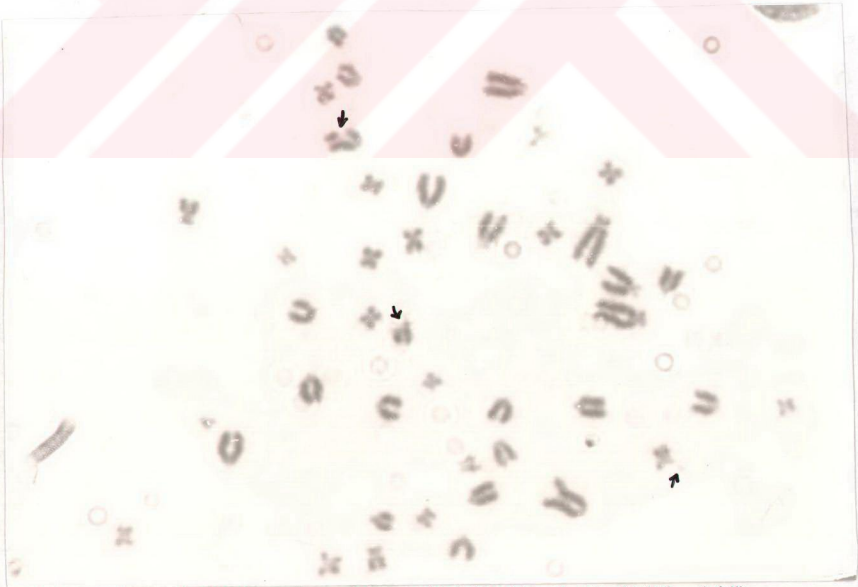
Resim 21: 400 mg/kg'lık doz grubuna ait kromatid tipi kırık ve gapler.



Resim 22: 400 mg/kg'lık doz grubuna ait kromatid tipi kırık  $2n+1=43$  (Hiperploidi)



Resim 23: 400 mg/kg'lık doz grubuna ait kromatid tipi gapler



Resim 24: 400 mg/kg'lık doz grubuna ait kromatid tipi kırıklar.  $2n+1=43$  (Hipoplöidi)

### ***Bulguların İstatistik Değerlendirmesi:***

Daha önce özetlenen bulguların istatistik değerlendirilmesi araştırmamızı oluşturan üç ayrı doz grubunun kontrol grubu ile ve birbirleri ile karşılaştırılması şeklinde yapılmıştır.

Mitotik indeks bakımından ortalama değerlerin hesaplanması varyans analizi ile yapılmıştır. Doz grupları kontrol grubu ile ve birbirleri ile karşılaştırıldığında, kontrol grubu ile I. doz grubu arasında ve II. ile III. doz grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Kontrol grubu ile II. doz grubu ve kontrol grubu ile III. doz grubu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Yine I. doz grubu ile II. doz grubu ve I. doz grubu ile III. doz grubu karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Bu değerlendirmeye göre kontrol grubu I. doz grubunun mitotik indeks değerleri benzer olmakla beraber, II. ve III. doz grubunun mitotik indeks değerlerinden anlamlı derecede büyük bulunmuştur.

Üç farklı dozda ifosfamid uygulanan denek gruplarının normal hücreleri ile sayısal anomalili hücreleri kontrol grubundaki aynı özelliklere sahip hücrelerle ve üç doz grubu birbirleri ile  $X^2$  (ki kare) testine göre karşılaştırıldı. Kontrol grubu ile I. II. ve III. doz grupları tek tek karşılaştırıldığında  $p < 0,001$  düzeyinde ileri derecede anlamlılık bulundu. Aynı şekilde üç doz grubu kendi aralarında karşılaştırıldığında ileri derecede anlamlılık bulunmuştur.

Kontrol grubu toplam 40 kromozom içeren metafaz alanları bakımından I. II. ve III. doz grupları ile üç doz grubu kendi arasında  $X^2$  testine göre karşılaştırıldı. Kontrol grubu ile I. doz grubu arasında  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı bir fark bulundu. Kontrol grubunun II. ve III. doz grupları ile karşılaştırılmalarında ise  $p < 0,001$  düzeyinde ileri derecede anlamlı fark bulunmuştur. Üç doz grubu kendi arasında karşılaştırıldığında ( $p > 0,05$ ) anlamlı bir fark bulunmamıştır.



Bir diğ er hipopluidi olan toplam 41 kromozom içeren hücreler açısından kontrol grubu üç farklı doz grubu ile Fisher, doz grupları birbirleri ile  $X^2$  (ki kare) testine göre karşılaştırıldı. Kontrol grubu ile I. II. ve III. doz grupları arasında  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı farklılık bulundu. Doz grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise  $p < 0,001$  düzeyinde ileri derecede anlamlılık bulunmuştur.

Kontrol ve üç farklı denek grupları hiperpluidi açısından karşılaştırılmıştır. Toplam 43 kromozom içeren metafaz alanlarına sahip üç doz grubu tek tek kontrol grubu ile Fisher testine göre, kendi aralarında  $X^2$  (ki kare) testine göre karşılaştırıldığında  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı bir fark bulunmuştur.

Toplam 44 kromozom içeren metafaz alanlarına sahip üç doz grubu kontrol grubu ile tek tek Fisher testine göre, kendi aralarında ise  $X^2$  (ki kare) testi ile karşılaştırılmış ve anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ).

Kontrol ve üç farklı doz grubu poliploidi açısından karşılaştırıldı. Kontrol grubu ile  $3n=63$  kromozoma sahip I. doz grubu Fisher testine göre karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

$4n=84$  kromozoma sahip 3 doz grubu kontrol grubu ile Fisher testine göre, kendi aralarında  $X^2$  (ki kare) testine göre karşılaştırıldı. Kontrol grubu ile II. ve III. doz grupları arasında  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı bir fark bulunurken, kontrol grubu ile II. doz grubu ve üç doz grubu kendi arasında anlamlı bir farklılık göstermemiştir ( $p > 0,05$ ).

Üç farklı dozda ifosfamid uygulanan denek grupları kontrol grubu ile yapısal anomaliler bakımından incelenen metafaz alanları ve incelenen kromozom sayısı olmak üzere iki açıdan karşılaştırılmıştır.

Üç farklı doz grubunun kromatid tipi gap taşıyan metafaz alanları kontrol grubunun normal metafaz alanları ile Fisher, üç doz grubu kendi arasında  $X^2$  (ki kare) testine göre karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu ile I., II. ve III. doz grupları arasında  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Üç doz grubu kendi arasında  $p < 0,001$  düzeyinde ileri derecede anlamlılık göstermiştir.

Aynı şekilde doz gruplarının kromatid tipi gap taşıyan kromozom sayısı, kontrol grubunun kromozom sayısı ile  $X^2$  (ki kare) testi ile karşılaştırıldı. Doz gruplarının birbirleri ile karşılaştırılmasında da  $X^2$  (ki kare) testi kullanıldı. Kontrol grubu ile I., II. ve III. doz grupları arasında ve üç farklı doz grubu kendi aralarında  $p < 0,001$  düzeyinde ileri derecede anlamlı fark göstermiştir.

Kromatid tipi kırığa sahip metafaz alanları bakımından üç farklı doz grubu kontrol grubu ile Fisher testine göre karşılaştırıldı ve  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı bir fark gösterdi. Doz grupları kendi aralarında  $X^2$  (ki kare) testine göre karşılaştırıldığında  $p < 0,001$  düzeyinde ileri derecede anlamlılık bulundu.

Doz gruplarının kromatid tipi kırığa sahip kromozomlarının sayısı kontrol grubu ile  $X^2$  (ki kare) testine göre karşılaştırıldığında  $p < 0,001$  düzeyinde ileri derecede anlamlı fark bulundu. Aynı şekilde doz grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında da  $p < 0,001$  düzeyinde ileri derecede anlamlılık bulundu.

Üç farklı doz grubu, kontrol grubu ve birbirleri ile kromozom tipi gap ve kırıklar açısından karşılaştırılmıştır. Kromozom tipi gap taşıyan metafaz alanlarına sahip üç farklı doz grubu kontrol grubu ile Fisher, birbirleri ile  $X^2$  (ki kare) testi ile karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu ile I. doz grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Kontrol grubu ile II. ve III. doz grupları arasında  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı fark bulunurken, doz grupları kendi aralarında anlamlılık göstermemiştir ( $p > 0,05$ ).

Kromozom tipi gap taşıyan kromozom sayıları açısından kontrol grubu ile doz grupları  $X^2$  (ki kare) testine göre karşılaştırıldığında, kon-



trol grubu ile I. ve II. doz grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ancak II. doz grubu ile karşılaştırıldığında  $p < 0,001$  düzeyinde ileri derecede anlamlılık bulunmuştur. Fakat doz grupları birbirleri ile  $X^2$  (ki kare) testine göre karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ).

Kromozom tipi kırık bulunan metafaz alanları bakımından üç doz grubu kontrol grubu ile Fisher testine göre karşılaştırıldı. Kontrol grubu ile I. doz grubu arasında anlamlı bir fark bulunmazken, II. ve III. doz grupları arasında  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı fark bulundu. Doz grupları kendi aralarında  $X^2$  (ki kare) testine göre karşılaştırıldı ve  $p < 0,001$  düzeyinde ileri derecede anlamlılık gösterdi.

Kromozom tipi kırık taşıyan kromozom sayıları bakımından üç doz grubu, kontrol grubu ile ve birbirleri ile  $X^2$  (ki kare) testine göre karşılaştırıldı. Kontrol grubu ile I. doz grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmazken, II. doz grubu ile kontrol grubu arasında  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı bir fark bulunmuştur. Kontrol grubu ile III. doz grubu arasında  $p < 0,001$  düzeyinde ileri derecede anlamlı fark bulunmuştur. Doz grupları kendi aralarında da  $p < 0,001$  düzeyinde anlamlılık göstermiştir.

Üç farklı dozda ifosfamid uygulanan denek grupları, kontrol grubu ve birbirleri ile kromatid exchange ve kromatin fragmenti bakımından da karşılaştırılmıştır.

Kromatid exchange tesbit edilen üç doz grubu kontrol grubu ile Fisher testine göre karşılaştırılmış ve ( $p > 0,05$ ) anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Doz grupları birbirleri ile de Fisher testine göre karşılaştırılmış yine anlamlı bir farklılık göstermemiştir ( $p > 0,05$ ).

Kromatin fragmenti tesbit edilen üç doz grubu kontrol grubu ile Fisher, birbirleri ile  $X^2$  (ki kare) testine göre karşılaştırılmıştır. Kontrol grubu ile I. doz grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmazken, II. ve II. doz grupları arasında  $p < 0,05$  düzeyinde anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Doz grupları kendi aralarında  $p < 0,001$  düzeyinde ileri derecede anlamlılık göstermiştir.

## T A R T I Ő M A

---

Kanser tedavisinin vazgeçilmez metodlarından biri de kemoterapidir. Etki mekanizması farklı olan bu ajanlar tek tek ya da birkaçı bir arada kullanılarak daha çok tümör hücresi öldürülür. Kullanılan ilaçların hedefi daha çok DNA sentezi veya fonksiyonlarıdır. Hücre siklüsü fazlarından birinde veya bir kaçında etkili olan kemoterapide kullanılan ilaçlar toksik ve antitümör etkilerini DNA sentezini inhibe ederek gösterirler. Sitostatik olan bu ajanlar yıllardır malign hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmakla beraber, bunların ürünlerinin insan kromozomlarına etkileri yıllardır araştırma konusu olmuştur(23,34).

Biz araştırma konusu olarak bu ilaçlardan "İfosfamide"i seçtik. İfosfamide antineoplastik ajanların alkilleyiciler sınıfına dahildir. Nitrojen mustard türevi olan ifosfamidin kendisi toksik değildir. Son metabolik ürünü olan acroleinin çok yüksek sitotoksitesi olduğu ve bu ilacın antitümör aktivitede rol oynayabileceği bildirilmiştir(3,36). Yapılan çalışmalar acroleinin teratolojik ve mutajenik olduğu yolundadır(18,24,33,55,56).

Bifonksiyonel nitrojen mustard kanser tedavisinde önemli bir ajan grubu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu sınıf ilaçların alkilleyici değişik üyelerinde yapısal benzerlikler olmasına rağmen aminin farklı dizilişine bağlı olarak farklı kimyasal reaktiviteye ve klinik kullanıma sahiptirler. Fakat tüm bu ilaçlarla hücrelerin muamelesini takiben partiküler ve iplik-

ler arası çapraz bağlantı gibi bazı DNA hasarlarının olduğu fetal oluşumlar ortaya çıkmıştır(71).

Bizim çalışmamızda İfosfamide Wistar-Albino sıçanlarına üç farklı dozda uygulandı. Dozlarımızı kg başına 25 mg, 100 mg ve 400 mg olarak tesbit ettik. İlacımızı bir gün uygulayıp 24 saat sonra da hayvanlarımızı sakrifiye ettik.

Klinik kullanımı yaygın olan İfosfamide hastalara uygulanırken bir kürde kullanılan total doz 250-300 mg/kg'dır. Genel olarak günde 50-60 mg/kg'lık bir dozun 5 gün arka arkaya uygulanması ile bir kür tamamlanır. Bu uygulama bazen gün aşırı da yapılabilir. Ya da daha küçük dozlarda, 25-30 mg/kg olmak üzere 10 gün arka arkaya uygulanarak kür tamamlanabilir. Bazı dirençli olgularda günde 80 mg/kg'lık doz birbirini izleyen 2-3 günde kullanılabilir.

Bazı kimyasal maddelerin ve ilaçların mitotik aktiviteyi azalttığı gözlenmiştir(31). Bizim çalışmamızda da aynı sonucu gördük. I. doz olan 25 mg/kg ifosfamid uygulanan sıçanlarda kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulamadık. Fakat kontrol grubu ile II. ve III. doz grupları karşılaştırıldığında mitotik indexin anlamlı bir şekilde düştüğünü gözledik. Bu düşüş birinci doza göre anlamlılık gösterirken, ikinci ile üçüncü doz benzer sonuçlar ortaya koydu.

Birçok kimyasal, fiziksel ve biyolojik ajanların DNA hasarının yanısıra hücre bölünmesi sırasında kromozomların kusurlu ayrılmasına neden olarak sayısal kromozom değişikliklerine yol açtığı birçok çalışma ile gösterilmiştir(48). Biz de yaptığımız çalışmada kromozomların sayısal anomalilerinde ileri derecede anlamlı bir artış bulduk. Bu düzensizlikler dozların artışına bağlı olarak fazlalaşmıştır. Sayısal düzensizlikler poliploidi ve aneuploidi şeklinde görülür.  $4n=84$  bulduğumuz hücrelerin sayısı 25 mg/kg'lık ve 400 mg/kg'lık doz gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gösterdi. Ancak dozlar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Hipoploidi açısından incelediğimizde hem 40 hem de 41 kromozomlu hücrelere rastladık. Kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda anlamlı farklılık bulduk. Ayrıca 41 kromozomlu hücreler kendi aralarında karşılaştırıldıklarında da dozun artışına bağlı olarak ileri derecede anlamlı bir fark bulunmuştur. Kontrol grubunda da birkaç alanda 40 ve 41 kromozomlu alanlar görülmüştür. Bu az sayıdaki değişiklik uygulanan colchicine (Colchicine mitoz esnasında iğ iplikçiklerinin tubular formasyonunu bozmaktadır(48)) den kaynaklanabilir. Biz de kromozomları metafazda yakalamak için Colchicine kullandığımızdan, kontrol grubundaki kromozom eksikliklerini buna bağladık.

Alkille-yici ajanlar, antimetabolitler ve antibiyotikleri içeren çeşitli kanser kemoterapik ajanlarının uygulandığı araştırmalarda ilaç verilışinden 24 saat sonra çeşitli kromozomal aberasyonlara sebep oldukları gösterilmiştir. Bu aberasyonların başında kromatid tipi kırık ve gapler, fragmentler, kromatid exchangelar gelmektedir. Bu çalışmalarda fare ve hamsfer hücrelerinden faydalanılmıştır(8). Yine bir başka çalışmada sitostatik ajanlarla tedavi olan testiküler kanserli hastaların periferik kan kültürlerinde kemoterapiye bağlı olarak kromozomal hasarlara rastlanılmıştır(72). Rapor edilen başka bir çalışmada da kullanılan antikanser ilaçların kromozom anomalilerine sebep olduğu bildirilmiştir(73). Antikanser ilaçların kromozomal aberasyon yaptığını gösteren klinik bulguların yanısıra, bu konuda yapılan hayvan deneyleri de mevcuttur. Örneğin ribavirin uygulanan farelerin kemikiliğinde yapılan sitogenetik incelemelerde kromozomların yapısal anomalilerinde büyük bir artış gözlenmiştir. Kromatid tipi gap ve kırıklar, kromozom tipi gap ve kırıklar ve exchange figürler rapor edilen başlıca yapısal anomalilerdir(68).

Hodgkin hastalarında yapılan bir çalışmada da kullanılan alkille-yici ajanların kromozom kırıklarına yol açtığı rapor edilmiştir. Burada kullanılan birkaç ajandan biri de ifosfamidin yapısal izomeri olan Cyclophosphamidedir(77). Fare ve hamster hücreleri ile yapılan kanser kemoterapik ajan çalışmalarından birinde cyclophosphamide ve ifosfamide kullanılmıştır. "Salmonella microsome testi" denilen ve kanser kemoterapik ajanların

mutajenitesinin araştırıldığı bu çalışmada, ajanların karsinojenik kapasite-leri ile yol açtıkları kromozomal hasarlar arasında yüksek bir korelasyon bulunduğunu göstermiştir. İfosfamidin metabolitlerinin bir çoğunun mutaje-nik olduğu rapor edilmiştir(9). Bu raporu destekleyen bir başka çalışmada Morte, R.D ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Burada da ifosfamidin kromozomal düzensizlikleri, onkojenik transformasyonları ve mutasyonları indükledikleri gösterilmiştir(59). Çin hamster hücreleri ile yapılan bir baş-ka çalışmada da, ifosfamidin aktif formu olan ifosfamid mustardın gen mutasyonlarını indüklediği gösterilmiştir(19).

Bizim yaptığımız çalışmada da uygulanan ifosfamidin üç ayrı dozu için de anlamlı yapısal anomaliler bulundu. Kromatid tipi gap ve kırık açısından incelenen metafazlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her üç doz grubu için de anlamlı farklar bulundu. Dozlar birbiri ile karşı-laştırıldığında ise ileri derecede bir fark ortaya çıktı. Bu doz grupları kro-matid tipi gap ve kırık taşıyan kromozom sayıları açısından kontrol grubu ve birbirleri ile karşılaştırıldıklarında ileri derecede anlamlı bir fark bulun-muştur. Bu da bize ifosfamidin en düşük dozu olan 25 mg/kg'ın (Bu doz 10 günlük bir kürde hastaya verilen günlük endüyük doza uymaktadır.) kroma-tid tipi kırık ve gap yapma oranı çok yüksektir. Bu sıklık, doz 100 ve 400 mg/kg'a çıktıkça artmıştır.

Aynı incelemeyi kromozom tipi gap ve kırıklar bakımından da yaptık. Kromozom tipi gap taşıyan metafaz alanları her üç doz grubu için kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 100 ve 400 mg/kg doz grupları için anlamlılık göstermiştir. Kromozom tipi gap taşıyan kromozom sayıları kar-şılaştırıldığında 400 mg/kg doz grubu ileri derecede anlamlı bir fark göster-miştir. Böylece, yüksek dozda uygulanan ifosfamidin kromozom tipi gap yapabileceği de gösterildi. Bir kürde kullanılan total dozun 250-300 mg/kg olduğunu dikkate alırsak, uyguladığımız II. doz olan 100 mg/kg bu dozla-rın altında kaldığı halde kromozomal gap yapma potansiyeline sahiptir. Kromozom tipi kırık taşıyan metafazlara sahip üç farklı doz grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, düşük dozda anlamlı bir sonuç alınmazken 100 ve 400 mg/kg'lık doz gruplarında anlamlı sonuçlar alındı. Ayrıca doz arttırıldıkça kırık oranının da arttığı görüldü. Kromozomal kırık içeren kromozomların sayısını değerlendirdiğimizde II. doz grubunda anlamlı, III. doz grubunda ise ileri düzeyde anlamlı sonuçlar aldık. Doz arttırıldıkça

kromozomal kırıklara sahip kromozomların da arttığını gördük. İlacımız hücre siklüsüne spesifik olmayan ilaçlar grubuna dahil olduğundan, hücre siklüsünün hangi aşamasında ortama girdiyse hasar meydana getirmiş, bunun sonucu olarak da kromatid ve kromozom tipi kırık ve gapler ortaya çıkmıştır.

Daha önce belirtilen, antikanser ilaçların yaptığı kromozomal anomalilerinden diğer ikisi olan kromatin fragmenti ve kromatid exchange figürlerine bizde rastladık. Ancak kromatid exchange rastlanılan üç doz grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir sonuç ortaya çıkmadı. Kromatin fragmenti açısından yaptığımız karşılaştırma 100 ve 400 mg/kg'lık dozlarda anlamlı sonuçlar görüldü. Üç doz grubu kendi arasında karşılaştırıldığında ise ileri derecede anlamlı fark bulunmuştur.

Ayrıca bu çalışmada albino sıçanların bantlı karyogramları yapıldı. Ancak literatürlerde bu konuya dair bir bilgi bulunmadığından kırık noktaları karşılaştırılamamıştır.

Bu kırıkların tamiri ortamdaki nitrojen mustardın guaninin N-7 pozisyonunda oluşturduğu çapraz reaksiyonların (crosslink) sayısına ve onların tamir için gösterecekleri dirence bağlıdır. Çünkü, çapraz bağlantılar sonucu DNA replikasyonunu gerçekleştiremeyecektir. Bu hasar tamir edilebilse bile kalıcı hasar bir replikasyon ya da transkripsiyonda yanlış bilgi transferine yol açabilir.

25, 100 ve 400 mg/kg olmak üzere üç farklı dozda ifosfamide uyguladığımızda sıçanlarda mitotik indekste, kromozom ve kromatid tipi kırık ve gaplerde anlamlı sonuçlar bulduk. Mitotik indeksin düşüşü ve kromozomal düzensizliklerin anlamlılık kazandıkları 100 mg/kg'lık doz hastalara uygulanan toplam kürden daha azdır. Kromatid düzensizliklerin en küçük doz olan 25 mg/kg'da dahi anlamlı sonuçlar vermesi bir diğer düşündürücü durumdur. Elde ettiğimiz sonuçları yapılan daha önceki çalışmalarla destekleyerek, ilacımız olan İfosfamid'in yüksek mutajen ve bilhassa klastojen etkisinin olduğu gösterilmiştir.

## Ö Z E T

---

---

---

---

DNA'nın çoğalması ve hücre bölünmesi kimyasal mutajen ajanları tarafından etkilenecek bozulabilir. Buna bağı olarak kromozomlarda yapısal ve sayısal düzensizlikler görülür.

Kimyasal mutajenlerin önemli bir grubunu da ilaçlar oluşturmaktadır. Bu ilaçlar arasında alkilleyici ajanlar, nükleik asit analogları, sitotoksik ilaçlar ve antibiyotikler sayılabilir.

Bu çalışmada İfosfamid'in herhangi bir mutajenik etkisinin olup olmadığını inceledik. İfosfamide antineoplastik ajanlardan alkilleyiciler sınıfına dahil oxazaphosphorine ailesinin sitotoksik bir üyesidir. 15 kontrol ve 30 denek olmak üzere toplam 45 Wistar Albino kullanıldı. 25 mg/kg, 100 mg/kg ve 400 mg/kg dozlarında İfosfamide denek gruplarına *invivo* uygulanarak kemik iliğinden direk kromozom preparatları hazırlandı. Bu preparatlarda mitotik indeks, kromozom yapı ve sayı düzensizlikleri incelendi.

Mitotik indeks 100 mg/kg ve 400 mg/kg'lık doz gruplarında anlamlı olarak düştü. Tüm doz gruplarında sayısal düzensizlikler, kromozom ve kromatid tipi gap ve kırıklarda anlamlı sonuçlar alındı. Dozun artışına bağı olarak bu düzensizliklerde de artış gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar, yapılan daha önceki çalışmalarla desteklenerek İfosfamid'in yüksek mutajen ve bilhassa klastojen etkisinin olduğu gösterildi.



## S U M M A R Y

---

---

---

Chemical mutagens intrupt DNA replication and cell division and may cause chromosome aberrations, both structural and numerical.

A major group of chemical mutagens are drugs. These include alkylating agents, nucleic acid analogues, cytotoxics and antibiotics.

In this study the mutagenic effect of Ifosfamide has been tested. Ifosfamide is a cytotoxic alkylating antineoplastic agent belonging to oxazaphosphorine family chromosome analysis has been performed on direct bone marrow preparations of 45 Wistar Albino rats (15 controls and 30 subjects) after in vivo application of 25 mg/kg, 100 mg/kg and 400 mg/kg of Ifosfamide. Mitotic index, chromosome structure and number changes has been compared in doses groups.

Mitotic index has decreased significantly in the 100 mg/kg and 400 mg/kg groups. A significant increase in chromosome and chromatid type gaps and breaks, and numerical aberrations has been noted in all dosis groups. Increase in aberrations was proportional to the increase in dosis. As a result Ifosfamide has been found to have a highly mutagenic and especially clastogenic effect, supporting the previous findings.

## KAYNAKLAR

---

- 1- Akbaş,F. Radyoterapinin Periferik lenfositler üzerindeki sitogenetik etkisi. Yüksek lisans tezi. İ.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı 1993.
- 2- Akker,J. van D., Gorin,N.C. Chromosome abnormalities, after autologous bone marrow transplantation with marrow treated by Cyclophosphamide derivatives. The Lancet May. 25; 1 (8439):1211-2 (1985).
- 3- Alarcon,R.A., Meienhofer,J. Isophosphamide as new Acrolein-producing antineoplastic isomer of Cyclophosphamide Cancer Research 32, 2519-2523, November (1972).
- 4- Alderton,P.M., Gross,J. Comparative study of Doxorubicin, Mitoxantrone, and Epirubicin in combination with ICRF-187 (ADR-529) in a chronic cardiotoxicity animal model. Cancer Research 52, 194-201. (1992).
- 5- Ames,B.N. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. Science vol.204, 11 May 1979.
- 6- Başaran,N. Tıbbi Genetik Anadolu Üniversitesi Tıp Fak. Eskişehir 1986.

- 7- Bemirschke, K. *Tc Atlas of mamalian chromasoms. Vol.1, Folio 18, New York, 1967.*
- 8- Benedict,W.F., Banerjee A. *Induction of morphological transformati-on in mouse C<sub>3</sub>H/10T 1/2 clone 8 cells and chromosomal damage in Hamster A (T<sub>1</sub>)Cl-3 cells by cancer chemotherapeutic agents Cancer Research 37, 2202-2208, 1977.*
- 9- Benedict,W.F., Baker,M.S.: *Mutagenicity of cancer chemotherapeutic agents in the Salmonella/Microsome Test Cancer Research 37, 2209-2213, 1977.*
- 10- Brade,W.P., Herdrich,K.: *Ifosfamide-pharmacology, safety and thera-peutic potential. Cancer Treatment Reviews 12, 1-47, 1985.*
- 11- Bryant,B.M., Ford,H.T.: *Prevention of isophosphamide-induced urot-helial toxicity with 2-mercaptoethane-sulphonate sodium (Mesna) in patients with advanced carcinoma. The Lancet 2:657-659, 1980.*
- 12- Cardinalli,G., Agrifoglia,M.F.: *The cholchicine method in the study of bone marrow cell proliferation. Blood 18:328-335, 1961.*
- 13- Cavalli,F.: *Ifosfamide: an Old drug recently rediscovered. Eur. J. Can-cer Clin Oncol Vol.24.No.6 pp.959-961. 1988.*
- 14- Cenani,A.: *Ist. Ün. Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölü-mü, Teratoloji Ders Notları. 1989.*
- 15- Cerny,T.: *Bioavailability of oral ifosfamide in patinets with bronchial carcinoma. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 18, 261-264. 1986.*

- 16- Colin, W.L., Trask, M.A.: Radiation-induced Lung Fibrosis after treatment of Small Cell Carcinoma of the Lung with very high dose Cyclophosphamide. *Cancer* 55:57-60. 1985.
- 17- Connor, J.M., Ferguson-Smith, M.A.: *Essential Medical Genetics*. 1993.
- 18- Crook, T.R., Souhami, R.L.: Cytotoxicity, DNA cross-linking, and single breaks induced by activated cyclophosphamide and Acrolein in human leukemia cells. *Cancer Research* 46, 5029-5034, 1986.
- 19- Dochmer, J., Seidel, F.: Genetically engineered V79 Chinese Hamster cells metabolically activate the cytostatic drugs cyclophosphamide and Ifosfamide *Environ Health Perspect.* Vol. 88 pp.63-65. 1990.
- 20- Dowd, G., Dunn, K. Chromosome studies in normal and leukemic Rats. *Blood*, Vol. 23, No.5 (May) 564-571. 1964.
- 21- Ekşinozlugil, Z.: Cytosine Arabinoside'in Mitotik indexi ve kromozomlar üzerindeki etkisinin in vitro periferik lenfosit kültüründe incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü 1988.
- 22- Epstein, S.S., Swartz, J.B.: Carcinogenic risk estimation. *Science*, Vol: 240, 1043-1045, 1988.
- 23- Erkorkmaz, K: Cyclophosphamide'in mitotik indeksi ve kromozomlar üzerindeki etkisinin in vitro periferik lenfosit kültüründe incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. İ.Ü. Onkoloji Ens. 1988.
- 24- Fre, E., Canellos, G.: Dose: A critical factor in cancer chemotherapy. *The American Journal of Medicine* Vol.69, 585-594. 1980.
- 25- Freigelder, D., Malancinski, G.M. *Essentials of Molecular Biology*. Second Edition. 1993.

- 26- Genesca,A., Caballin,M.R. Human Sperm Chromosomes Long term effect of cancer treatment. *Cancer Genet. Cytogenet* 46:251-260, 1990.
- 27- German J.: *Chromosomes and Cancer* 1974.
- 28- Gold,L.S., Slone,T.H.: Rodent carcinogens: Setting Priorities. *Science* Vol: 258, 261-265. 1992.
- 29- Greene,M.H., Boice,J.D.: Acute nonlymphocyte leukemia after therapy with alkylating agents for ovarian cancer. *Cancer*, Vol: 307, No.23. 1416-1421, 1982.
- 30- Günalp,A., Ayfer Ő.: *Tıbbi Biyoloji Ders Kitabı*. Ankara - 1992.
- 31- Hacıhanefioğlu,S.: Bazı viral hastalıkların kromozomlara etkisinin çeşitli sitogenetik yöntemlerle incelenmesi. Doktora tezi. İst.n. Cerrahpaşa Tıp Fak. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı 1984.
- 32- Hales,B.: Relative mutagenecity and teratogenicity of cyclophosphamide and two of its structural analogs. *Biochem Pharmacol* 32, 3791-3795 1983.
- 33- Hales,B.F., Ludeman,S.M.: Embryotoxicity of Phenyl Ketone analogs of Cyclophosphamide. *Teratology*, 39:31-37 (1989).
- 34- Hampel,K.E., Kober,B.: The action of cytostatic agents on the chromosomes of human leukocytes in vitro. *Blood*, Vol. 27, No.6 (June), 816-823 (1966).
- 35- Harnden,G., Path,F.R.C.: *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Report of the Standing Comittee on Human Cytogenetic Nomenclature ISCN-1985.*

- 36- Hemminki,K.: Binding of metabolites of cyclophosphamide to DNA in a rat liver microsomal system and invivo in mice. *Cancer Research*, 45, 4237-4243, 1985.
- 37- Herskowitz,I.H.: Principles of Genetics, Collier Macmillan. Publishers, London 1977.
- 38- Hill,D.L., Laster,R.: Metabolism of lphosphamide [2-(2-chloroethylaminin)-3-(2- chloroethyl) tetrahydro-2H-1, 3, 2-oxazophosphorine 2 oxide] and production of a toxic lphosphamide metabolite. *Cancer Research*, 33, 1016-1022. 1973.
- 39- Kirshon,B., Wasserstrum,N.: Teratogenic effects of first trimester cyclophosphamide therapy. *Obstet Gynecol* 72:462-464, 1988.
- 40- Klein,H.O., Wickramanayake,P.D.: Therapeutic effects of single-push fractionated injections or continuous infusion of Oxazaphosphorines (Cyclophosphamide, Ifosfamide, Asta Z 7557). *Cancer* 54:1193-1203, 1984.
- 41- Kleinrok,Z., Chmielewska,B.: Pharmacological evaluation of Ifosfamide and its enantiomers in laboratory animals. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 34, 293-303, 1986
- 42- Kraker,J., Voûte,P.A.: Experience with ifosfamide in paediatric tumours. *Cancer Chemother Pharmacol* 24 (Suppl):S28-S29, 1989.
- 43- Krishna,G., Nath,J.: In vivo and invivo/invitro kinetics of Cyclophosphamide induced sister-chromatid exchanges in mouse bone marrow and spleen cells. *Mutation Research*, 204, 297-305 (1988).
- 44- Kushner,B.H., Cheung,N.K.V.: Cyclophosphamide versus Ifosfamide in paediatric oncology. *The Lancet* July 28, 336 (8709):253-254. 1990.

- 45- Kusnierczyk,H., Radzikowski,C.: Antitumor activity of optical isomers of Cyclophosphamide, Ifosfamide and Trofosfamide as compared to clinically used racemates. *Journal of Immunopharmacology*, 8 (4), 455-480, 1986.
- 46- Lewis,L.D., Fitzgerald,D.L.: Fractioned ifosfamide therapy produces a time - dependent increase in ifosfamide metabolism. *Br. J. Clin Pharmac.* 30(5) 725-732, 1990.
- 47- Lewis,L.D., Meanwell,C.A., Ifosfamide pharmacokinetics and neurotoxicity. *The Lancet*, Vol 335, 175-176, 1990.
- 48- Liang,J.C., Satya-Prakash,K.L.: Induction of aneuploidy by mitotic arrestants in mouse bone marrow. *Mutation Research*, 155, 61-70, 1985.
- 49- Lind,M.J, McGown,A.T.: The effect of Ifosfamide and its metabolites on intracellular Glutathione levels in vitro and invivo. *Biochemical Pharmacology*. Vol.38, No.11, pp 1835-1840, 1989.
- 50- Lind,M.J., Margison,J.M.: Comparative pharmacokinetics and alkylating activity of fractionated intravenous and oral ifosfamide in patients with Bronchogenic carcinoma. *Cancer Research*, 49, 753-7557, February, 1989.
- 51- Lind,M.J., Margison,J.M.: The effect of age on the pharmacokinetics of ifosfamide. *Br.J.Clin. Pharmac* 30, 140-143, 1990.
- 52- Marnocha,R.S.M., Hutson,P.R.: Intradermal Carboplatin and Ifosfamide extravasation in the mouse. *Cancer*, 70:850-853, 1992.
- 53- Masurel,D., Houghton,P.J.: Efficacy, toxicity, pharmacokinetics, and in vitro metabolism of the enantiomers of Ifosfamide in mice. *Cancer Research*, 50, 252-255, 1990.



- 54- Mehta,J.R., Przybylski,M.: Alkylation of Guanosine and Deoxyguanosine by phosphoramidate mustard. *Cancer Research*, 40, 4183-4186, 1980.
- 55- Mirkes,P.E., Greanaway,J.C.: Role of Acrolein in Cyclophosphamide teratogenicity in rat embryos in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 72, 281-291, 1984.
- 56- Mirkes,PE: Cyclophosphamide Teratogenesis: A review Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis. 5:75-88, 1985.
- 57- Maloney,W.C., Boschetti,A.E.: Observations on Leukemia in Wistar and Wistar Furth rats. *Blood*, Vol. 26, No.3 1965.
- 58- Moore,M.M., DeMarini,D.M.: Mammalian cell mutagenesis, Banbury Conference. *Mutation Research*, 203, 69-78, 1988.
- 59- Morte,R.D., Belisario,M.A.: In vitro activation of Isophosphamide and Trophosphamide to metabolites mutagenic for bacteria. *Toxicology Letters*, 31, 183-188, 1986.
- 60- Motuisky,V.: *Human Genetics Problems and Approaches*. Springer-Verlag Heidelberg-Germany, 1979.
- 61- Mueller,A.E.H., Robert,F.: *Elements of Medical Genetics (Student Notes)* Emery, 7.Edition 1992.
- 62- Neubert,D.,Merker D.J.: *Methods in Prenatal Toxicology-Evaluation of Embryotoxic Effects in Experimental Animals Teratology Workshop* April Berlin, 1977.
- 63- Newbury-Ecob,R.A., Noble,V.W.: Ifosfamide-Induced Fanconi syndrome. *The Lancet*, June 10:1 (8650):1328, 1989.

- 64- Peadersen-Bjergaard, J.: Risk of Acute Nonlymphocytic Leukemia and preleukemia in patients treated with cyclophosphamide for Non-Hodgkins Lymphomas. *Annals of Internal Medicine*, 103:195-200, 1985.
- 65- Powers, J.F., Sladek, N.E.: Cytotoxic activity relative to 4-hydroxycyclophosphamide and phosphoramidate mustard concentrations in the plasma of cyclophosphamide treated rats. *Cancer Research* 43, 1101-1106, March, 1983.
- 66- Preston, R.J., Dean, B.J.: Mammalian in vivo cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. *Mutation Research*, 189, 157-165, 1987.
- 67- Quinto, I. Marini, DeE: Induction of sperm abnormalities in mice by ifosfamide and trofosfamide. *Mutation Research*, 201, 113-116, 1988.
- 68- Rao, K.P.S., Rahiman, M.A.: Cytogenetic effects of ribavirin on mouse bone marrow. *Mutation Research*, 224, 213-218, 1989.
- 69- Richardson, A.: *The Act Cytogenetics Laboratory Manual. Second Edition.* Editor: Margaret J. Barch. London 1991.
- 70- Rigaud, O., Guedeney, G.: Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on the circulating lymphocytes of breast cancer patients. I. Chromosome aberrations induced in vivo. *Mutation Research*, 242, 17-23, 1990.
- 71- Ross, W.E., Ewig, R.A.G.: Differences between Melphalan and Nitrogen mustard in the formation and removal of DNA Cross-Links. *Cancer Research*, 38, 1502-1506, June, 1978.
- 72- Ruiters, E.B., Jong, B.: Chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of patients treated for testicular cancer. *Human Genetics*, 84:191-194, 1990.

- 73- Sadamori,N., Honda,T.: Chromosome abnormalities in skin fibroblasts probably induced by an anti-cancer drug. *The Journal of Dermatology*, Vol. 17:155-158, 1990.
- 74- Sağcı,G.: Ceftriaxone (cephalosporin) uygulanan. Wistar Albino sıçanlarda sitogenetik incelemeler Yüksek Lisans Tezi. İ.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 1990.
- 75- Sargent,L.M., Roloff,B.: Mechanisms in cyclophosphamide induction of cytogenetic damage in human lymphocyte cultures. *Cancer Genet Cytogenet* 29:239-243, 1987.
- 76- Seidenfeld,A.M., Smythe,H.A.: Acute Leukemia in Rheumatoid Arthritis treated with cytotoxic agents. *The Journal of Rheumatology*, 11:5, 1984.
- 77- Sen,P., Bailey,N.M.: Induction of Chromosome breaks and sister chromatid exchanges in patients with Hodgkin's disease by two combination chemotherapy regimens of different leukemogenic potential. *Cancer Research* 50, 558-562, February 1, 1990.
- 78- Shaw,P.J., Eden,T.: Ifosfamide in paediatric oncology: tried but not tested? *The Lancet*. Apr. 28; 335 (8696):1022-1023, 1990.
- 79- Sipahioğlu,H., *Medikal Onkolojide Tedavi Prensipleri ve Protokoller* Ankara, 1981.
- 80- Sozzi,G., Dragani,T.A.: Kinetics of sister-chromatid exchange induction by different carcinogens in C57BL/6J and DBA/2 mice. *Mutation Research* 156, 177-180, 1985.
- 81- Stricberger,M.W.: *Genetics*, Macmillan Publishing Second Edition, London, 1976.

- 82- Sula,K., Nouza,K.: Modulation of the effects of cyclophosphamide on the lymphoid system of mice by double-stranded RNA. *Folia Biol.* 31, 1:59-62, 1985.
- 83- Therman,E.: *Human Chromosomes Structure, Behavior, Effects* 1985.
- 84- Trasler,J.M., Hales,B.F.: Paternal cyclophosphamide treatment of rats causes fetal loss and malformations without affecting male fertility *Nature*, Vol.316, 144-146. 1985.
- 85- Tucker,M.A., Coleman,C.N.: Risk of second cancers after treatment for Hodgkin's disease. *The New England Journal of Medicine*, Vol:318, No.2 pp:76-81, 1988.
- 86- Watson,R.A.: Ifosfamide: Chemotherapy with new promise an new problems for the urologist. *Urology*. Vol: XXIV, N.5, 465-468.
- 87- Yanar,Z.U.: Conalbumin in (ovotransferrin) insan lenfosit kültüründe mutajenite yönünden incelenmesi. Yüksek Lisans tezi. İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fak. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı. Genetik ve Teratoloji Bilim Dalı 1985.
- 88- Zellweger H., Simpson,J.: *Chromosomes of Man*. Spastic International Medical Publications. London 1977.