

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ALBİNO İSVİÇRE FARELERİNDE DOĞRUDAN TESTİS İÇİNE
ENJEKTE EDİLEN MİTOMİSİN C'NİN MEİOTİK KROMOZOMLAR ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Biyolog Nurhan Cücer
DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Bekir Sıtkı Şaylı

1991 ANKARA

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2. 1. Erkek Genital Sistemi ve Meiotik Bölünme	6
2.2 Mitomisin -C	12
3. MATERYAL VE METOD	15
4. BULGULAR	19
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ	57
7. TÜRKÇE ÖZET	59
8. İNGİLİZCE ÖZET	61
9. KAYNAKLAR	63
10. EKLER	70

KISALTMALAR

- MC** : Mitomisin C
- MI** : Diakinez - Metafaz I
- MII** : Metafaz II
- PMM** : Premeiotik Metafaz

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Mitomisin-C (MC) organizmaya girdikten sonra alkilleyici bir metabolit haline dönüşerek DNA sentezini etkileyen bir antibiyotiktir (2,20,38,44). İlk kez *Streptomyces caesipitosus* adlı mantardan elde edilen MC hem mono, hem bifonksiyonel alkilleyici ajan gibi davranır. DNA çift sarmalının komplementer zincirleri üzerindeki guanin bazlarına bağlanarak çapraz bağlar oluşturur ve DNA biyosentezini inhibe eder. Tek zincirli DNA nükleotidlerine ise kovalan bağlanan antibiyotik böylece kromozom kırıklarına yol açar (2,7,31,37,58). Hücre içinde indirgendikten sonra etkinlik kazanan MC'nin etkisi, döneme özgü olmamakla birlikte, somatik hücrelerde geç G1 (Gap 1) ve erken S dönemlerinde, primer spermatositlerde ise S (DNA biyosentezi) dönemi ve erken profazda en yüksek düzeydedir (2,7,30,31,37,58).

Periton içine enjeksiyonla verilen değişik dozlardaki MC'nin insan ve diğer memeli hücrelerinde kromozom düzensizliklerine yol açtığı, fare spermatogonyumunda spesifik nokta mutasyonlarını indüklediği gösterilmiştir (1,2,6,35,44). Manyak ve Schleiermacher (44) periton içine enjekte edilen değişik dozlardaki MC nin NMRI farelerde kemik iliği ve spermatogonyada kromatid değişimlerine (exchange) ve terminal delesyonlara yol açtığını saptamışlardır.

Adler (1,35) 101 XC3H farelerde enjeksiyonu izleyen 6, 18 ve 24.

saatlerde kromozom anomelilerine rastlanmadığını bildirmiştir. Ayrıca spermatogonyal mitoz plaklarının sayısındaki azalmayı ve 50-60ıncı gün preparatlarında primer spermatositlerin hemen yok denecek sayıda bulunmasını ilacın sitotoksik etkisi ile açıklamıştır. Aynı araştırmacı daha sonra MC nin indüklediği kromozom sapmalarının periton içi enjeksiyonu izleyen 10-13üncü günlerden itibaren görülmeye başladığını rapor etmiştir. Yazar, anormal kromozomlu primer spermatosit sayısının 27-30uncu günlerde maksimuma ulaşmış ve daha sonra 31-34üncü günlerde ovumun fertilize olma yeteneğinin % 60-70 azaldığını bildirmektedir. Adler MC nin primer spermatosit kromozomlarında neden olduğu translokasyonların farkedilmelerinin, homolog olmayan parçaların küçüklüğü ve multivalanların meydana gelememesi yüzünden zor olacağını ileri sürmüştür.

Allen ve arkadaşları (7) MC nin indüklediği kromozom düzensizliklerini sinaptonemal kompleks analizi ile araştırmışlardır. Sonuçta sapmaların zigoten ve pakitende normal sinapsların yanısıra desinaps, tam olmayan sinaps, homolog olmayan parçaların sinapsları ve kromozomun kendi üzerine katlanarak yaptığı hatalı sinapslara yol açtıkları anlaşılmıştır.

McIlree (18) ve Chandley (47) gibi yazarlar spermatogonyal kök hücrelerinden fertilizasyona kadar geçen süre içinde kromozom bozukluğu içeren gametlerin elimine edildiklerini bildirmişlerdir. Ancak bu mekanizma riskin tümü ile ortadan kalkması için yeterli değildir (27,57). Klinik olarak fark edilen gebeliklerin %10-15 kadarı spontan düşükle sonlanmaktadır. Spontan düşüklere % 50 kadarında fetus anormal karyotiplidir ve anormal karyotipli gebeliklerin canlı doğumla sonlanma

riski % 0.25-2 kadardır (9,57). Spontan düşük materyalinden yapılan incelemeler düşüğe neden olan Robertson tipi translokasyonların daha çok anne, diğer kromozom anomalilerinin ise daha çok baba kaynaklı olduklarını göstermiştir (9,19,40). Heterozigot taşıyıcı babadan kaynaklanan kromozomal sapmaların yol açtığı spontan düşük, ölü doğum, düşük doğum ağırlığı, çocuk ölümü ve konjenital malformasyonlu ya da taşıyıcı çocukların doğumu çeşitli yazarlarca kabul edilmekte ya da olası sayılmaktadır (9,10,12,14,19,40,43,55,70).

Hamster yumurtası/ insan spermi modeli ile çalışan Bradriff ve arkadaşları (11) eğer motilite ya da fertilize etme yeteneğini etkileyen bir mutasyon içermiyorsa, çok ağır kromozomal bozukluklar taşıyan spermilerin fertilizasyona katılmada, anormal morfolojilere nazaran daha başarılı olabildiklerini göstermişlerdir. Böyle bir başarı çeşitli fare soylarında insandakinden çok daha yüksek düzeydedir (26,53,55).

Meiotik kromozomları ve çeşitli mutajenlerin bunlar üzerine etkilerini araştıran pek çok çalışma vardır (4,5,29,36,52,60,62). Bunların önemi erkeğin mutajenik ajanlara maruz kalması halinde yavrular için malignite ya da konjenital malformasyon riski doğmasından kaynaklanmaktadır (7,65).

Buraya kadar özetlenen çalışmalarda ilacın organizmaya verilmiş yolu periton içine enjeksiyondur. Böylelikle ilaç metabolize olduktan sonra kan dolaşımı ile hedef organlara gitmektedir. İlacın klinikte uygulama şekilleri çeşitlidir. Örneğin mesane tümörlerinde kateter aracılığı ile doğrudan mesane içine verilebilmektedir (23).

Amacımız doğrudan testis içine enjekte edilen MC nin meiotik kromozomlar üzerine etkilerini albino isviçre farelerinde araştırmaktır.



2.GENEL BİLGİLER

Meioz bölünme üzerine sitogenetik çalışmaların en yaygın uygulama alanı yapısal kromozom düzensizliği taşıyıcılarının belirlenmesi, bunların dengesiz gamet verme olasılığının araştırılmasıdır (24,45). Meiotik kromozomların incelenmesi ayrıca somatik kromozomlardan elde edilemeyecek bilgiler sağlar. Transpoze olan segmentlerin sinaptik davranışlarından yola çıkılarak yeni düzenlenmiş kromozomların kiazma sıklıkları belirlenip yapısal heterozigotların verebilecekleri gametler öngörülebilir (25). Meiotik kromozomal segregasyon konusunda yeterli çalışma bulunmamaktadır, oysa insan bu alanda hatalara oldukça yatkın bir memelidir (60). Başta translokasyon olmak üzere morfolojik düzensizlikleri taşıyan bireylerde meiotik ayrılama (non-disjunction) nedeni ile 3:1 ve 4:0 gibi anormal segregasyonlar olabilmektedir (12,34). Dengesiz kromozomlu gametlerin frekansı ilgili kromozoma, kırılma yerlerine, kiazma sayısı ve lokalizasyonuna bağlıdır (12,34).

Meiotik kromozomların incelenmesinin yararlı olabileceği diğer bir durum monogenik resesif oligokiazma sonucu ortaya çıkan infertiliteye kesin tanı koyabilmektir (34). Buna karşılık örneğin XXY (Klinefelter sendromu) bireylerde genellikle infertil olmaları ve böyle bireylerden kendileri gibi erkeklerin meydana gelme olasılığının düşüklüğü yüzünden meiotik analizler zorunlu sayılmaz (34).

Bazen anne ve baba normal karyotipli buldukları halde yavruda ekstra bir kromozom gözlenebilir. Bu kromozom de novo olup eşlerin

birinde mayoz bölünme sırasındaki bir yenidüzenlenmeden ileri gelebilir. Ancak bunu destekleyecek bir örneğe henüz rastlanmamıştır (34).

2.1-Erkek Genital Sistemi ve Meiotik Bölünme

Erkekte genital sistem, testisler, boşaltıcı kanallar, eklenti bezleri, ürogenital kanal ve penisten oluşmaktadır (3,21). Testisler bu sistemin ana organlarıdır (Bunlara sitojenik bez denilebilir). Testisler fetal karın boşluğunda, genital taslak üzerinde gelişmelerini tamamlayıp ayrı birer organ haline gelirler. Doğumdan sonra karın boşluğundan aşağı inerek skrotum içine yerleşirler (descensus testicularum). Fonksiyonel olarak biseksüel fetusta testislerin gelişimi, Y kromozomundaki testis determine edici faktörlerin varlığına bağlıdır (64).

Testisler puberteden itibaren 2 ayrı fonksiyon gösterirler:

a)Hipofizer gonadotropik hormonların uyarısı ile androjen sentezlenmesi veya endokrin fonksiyon,

b)Spermatogonyal hücrelerden spermatogenez ve spermiyogenez sonucu spermatozoonların oluşumu veya sitojenik fonksiyon.

Farede testisler yuvarlak-oval ve yanlardan biraz basık organlardır. Böylece iki uç, iki yüz ve iki kenarlarının olduğu söylenebilir. Bu kenarlardan biri üzerine epididimis (kaput, korpus ve kauda denilen 3 bölümü ile) yerleşmiştir. Testis tunika albuginea denilen beyaz, fibröz bir zarla çevrilidir ve bu zar epididimisin oturduğu kenar boyunca testis içine uzunlamasına bir bölme gönderir (Mediastinum testis). Bu uzantı testisi bölmelere ayırır (Septula testis).

Testislerde sitojenik fonksiyonun gerekleŖtiđi yer çok ince, zigzaglı seminifer kanallardır (tubuli contorti seminiferi). Septula içine yerleŖebilmek için kıvrımlar yapan kanallar kaput epididimisin bulunduğu u mediastinumda bir ađ oluŖtururlar (rete testis). Rete testisten çıkan kıvrımlı kanalıklara ductuli efferentis denir. Bunlar lobcuklar halinde toplanarak kaput epididimise, sonra kaputtan çıkarken tek bir kanala (duktus epididimis) dnŖürlr. Bu kanallar önce korpus epididimisi, bitiŖ yerine doğru da kauda epididimisi meydana getirirken incelik ve duktus deferens adını alırlar. Sağ ve sol testislerden gelen bir çift duktus deferens inguinal kanallardan geçip karın boŖluđuna girdikten sonra idrar kesesi üstünde birbirlerine yaklaŖarak sağlı sollu vezikula seminalislerle birleŖip uretraya açılırlar. Uretra arkus iskiadikusa kadar medyan olarak ilerleyip glandula bulbouretralis açılır, sonra pelvisten çıkar çıkmaz penise geçer (24).

Her bir testis lobcuğunda 1-3 kanalık bulunur. Kanallar dıŖtan bazal lamina ile sarılı olup iç kısımda lümeni evrelerler. Lmene bakan yüz morfoloji ve fonksiyon bakımından farklı 2 epitel hcreti ile sarılır:

- a) Sertoli hcretleri b)Gonad hcretleri.

Sertoli hcretleri bazal membranın hemen üzerinde bulunurlar, gonad hcretlerine besin ve desteklik sağlarlar. Gonad hcretleri ise seminiferz kanallarda diziler oluŖturan, kromatinden zengin hcretlerdir. GeliŖme basamaklarına göre farklı terimlerle adlandırılırlar, çünkü farklı özellikleri vardır.

1-Spermatogonyal hcretler: Seminifer kanalıkların duvarlarında bulunurlar. Sonradan ard arda mitoz bölünmelerle lümene doğru çoğalarak

primer spermatositleri oluştururlar. Bölünme eş zamanlıdır ve eş zamanlılık plazma köprüleri aracılığıyla sağlanır. Böylece diploid sayı $2n$ 'in katları kadar fazla kromozom içeren metafazlar gözlenir. Kromozomların kondensasyon farkından dolayı bu metafazların farklı boyandıkları ileri sürülmüştür (3). Bu hücrelerde oluşan yapısal yenidüzenlemeler (daha çok translokasyonlar) dominant letal mutasyonlara ekivalan sayılırlar (44). MC nin mutajenik etkisine duyarlı değildirler (1).

2-Primer spermatositler: Spermatogonyal hücrelerden daha küçük, fakat onlar gibi yuvarlak, çekirdekleri kromatinden zengin ve birden çok çekirdeğe sahip hücrelerdir. Meiotik bölünmeye girmeden önce bir S fazı geçirerek büyürler. Bu faz premeiotik S fazlarından 3 kat daha uzun sürer (39), geç leptotene kadar sonlanmaz (30,31). S fazında nukleusta çok az sayıda inisiasyon noktasının bulunması belki de yalnız sinaps ve kros-over için gerekli proteinler üretildiği içindir (39). Genomun G-C zengin bölgeleri de geç leptotende replike olmaktadır (30,31). Birinci meiotik bölünmeyi geçiren primer spermatositler, sekonder spermatositleri oluştururlar.

3-Sekonder spermatositler: Tüpcük duvarlarından iyice uzakta bulunan bu hücreler, primer spermatositlerle aynı görünümde ancak daha küçüktürler. Haploid sayıda kromozomlu bu hücreler ikinci meiotik bölünmeyi geçirirler. Bir ve ikinci meiotik bölünmeler arasında S fazı yoktur.

4-Spermatidler: Sekonder spermatositlerden, ikinci meiotik bölünme sonucu oluşurlar. Çok küçük kondanse nükleuslu ve olgunlaşarak spermatozoonları meydana getiren haploid hücrelerdir.

Spermatogonyal hücrelerden spermatidlerin oluşumuna kadar olan sürece spermatogenez, spermatidlerden spermatozoonların oluşumuna da spermiyogenez denir.

Birinci ve ikinci meiotik bölünmelerde, mitoz bölünmedeki gibi dörder faz ayırt edilir. Ancak birinci meioz bölünmenin bazı farklılıkları vardır. Profaz uzun sürerken leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diakinez evrelerini içerir. Leptotende kromatin materyali kısalıp kalınlaşarak kromozoma dönüşür. Zigotende homolog kromozomlar karşılıklı çiftler oluştururlar. Farenin kromozom sayısı $2n=40$ olduğu için bu evrede 20 çift (sinaptik kompleks) oluşur (3). Bunlardan 19 tanesi otozomal, biri XY çiftidir. XY çifti otozomal olanlardan farklı biçimde, nukleusun periferinde lokalize seks vezikülü denilen yapıyı meydana getirirler (42,59). Memelilerde X ve Y kromozomları arasında homologinin bulunduğu, 200-5000 kb uzunluğundaki kesime psödootozomal bölge adı verilir (16,56). Bu bölge insan ve farede homologisi korunan, ayrıca X ve Y arasındaki sinaps ve kıasmaların lokalize olduğu alandır (16,56). Profaz I'de X ve Y kromozomları bivalanı yerine univalans saptanıyorsa bunun nedenlerinden biri translokasyondur (66). Farede yapısal anomalilerde örneğin delesyonla sonuçlanan kırıklar ökromatinde lokalize ise, sinaps sırasında, delesyon bölgesinde sinaps oluşmayacağından bir ilmek meydana gelir bu olaya sinaptik düzeltme denir. Ancak, kırıklar heterokromatinde lokalize ise homologe aranmaksızın sinaps gerçekleşir, buna da non-homolog sinaps adı verilir (8). Sinaptik bozuklukla sonuçlanan mutasyon eğer meiotik ise bir hücredeki tek bir kromozomu, birden fazla veya tüm kromozomları tutabilir, fakat tüm hücreleri tutmak zorunda değildir (66).

Pakitende, çift oluşturmuş homolog kromozomların kardeş

kromatidleri dörtlü bir görüntü verir ve tetrad diye anılırlar. Zigoten ve pakiten üzerine biyokimyasal çalışmalar iki evrede de protein sentezi yapıldığını göstermiştir (32). Sentezlenen proteinler, büyük olasılıkla, kros-over için kırılan DNA'nın tamirinde rol oynayan enzimlerdir (32). İnsan ve farede erken pakitende, NOR içeren otozomal sinaptik komplekslerin XY bivalanına yakın lokalize oldukları saptanmıştır (63). Diplotende homolog kromatidlerde transvers kırılmalar ve parça alışverişi (kros-over) yapılır. X ve Y kromozomları arasında yalnızca psödootozomal bölgede gerçekleşen bu olayın meydana geldiği noktalara kiazmata denir. Kros-over son bulana kadar tamir mekanizmasının görevi sürer. Eğer birinci meioz bölünmede sürekli rastgele kırıklar oluşuyorsa, dolayısıyla kiazma yoksa ve normal metafaz II (M II) plakları gözlenemiyorsa, tamir mekanizmasında bir bozukluk düşünülür (32,54). Kiazma sayısı, kromozom uzunluğuna, heterokromatin miktarına ve replikasyon zamanına bağlı olup sentromerden telomere ya da aksi yönde olabilir (33). Ring kromozomlar univalanlara yol açmaktadırlar, çünkü kiazma için uçların serbestliği gerekir (48). Erkek farelerde kromozomların ayrılamaması iğ ipliklerine göre pozisyona ve kromozomun rölatif uzunluğuna olduğu kadar kiazma pozisyonuna da bağlıdır (13).

Homolog çiftlerin birbirlerinden ayrılması diplotende başlar. Kiazma sonlanması denilen bu süreçte yer yer kiazma noktalarındaki ilişki devam eder, hatta metafaz I (M I) ortalarına kadar gözlenir. Metafaz sonlarında homolog kromozomlar karşılıklı dizilmiş durumdadırlar. Anafazda longitudinal sentromer bölünmesi olmaksızın homolog çiftler ayrılarak farklı kutuplara gidecek şekilde birbirlerinden uzaklaşırlar. Telofaz I'de sitokinezin gerçekleşmesi ile her biri haploid kromozom sayısı (farede 19 otozom ve X ya da Y) içeren iki yavru hücre oluşur. Birinci meiotik bölünmedeki ayrılmama olayları, ikinci meiotik metafazda sayısal

anomali şeklinde belirir. İkinci bölünme mitotik bölünmedir. Yani her kromozomda longitudinal bölünen sentromerin iki parçası farklı kutuplara gider. Böylece bölünmeye giren bir primer spermatositin meiotik verimi 4 spermatiddir.

Mitotik kromozomlara bakarak meiotik kromozomların incelenmeleri zor olsa da, diakinez-metafaz I plaklarından bilgi edinmek mümkündür. Bivalan büyüklüğü homolog kromozomların büyüklüğü ile doğru orantılıdır. Metafaza yaklaştıkça kiazma noktaları azalacağından homologların bivalan içindeki pozisyonlarını ışık mikroskopunda anlamak kolaylaşır. Robertson tipi translokasyon trivalan, resiprok olanlar ise kuadrivalan oluşumuyla ayırt edilebilir. Univalanlar ökromatide daha çok olmak üzere homolojiyi bozan yapısal anomalilerin göstergesidir (3). Kuadrivalanlar zincir ya da halka şeklinde görünürler. En kolay ayırt edilen çift X-Y'dir. Bu çiftin boyları farklı ve sinapsları yalnız psödotozomal bölgeyi içerdiğinden, bivalanın görüntüsü karmaşık değildir, fakat yalnızca psödotozomal bölgenin anomalileri hakkında bilgi verir. Kiazma oluşumu sırasında bivalanlar sentromerleri karşılıklı ya da zıt yönlerde gelecek şekilde düzenlenirler. X-Y çiftinde telomer telomere, otozomal çiftlerde ise bir doğru üzerinde homolog kromatidlerin tümü ile ya da distal bölgeleri ile paralel oluşturmaları (haç şekli) ve doğrusal ya da haç şeklinin U, V ya da O biçiminde kıvrılması gibi kromozom boyuna bağlı konumlar gözlenir. Kiazma sayısı kromozom boyuna bağlı kaldığından bir hücredeki tüm kiazmalar eş zamanlı sonlanmaz. Bu nedenle bivalanlar metafaz sonlarında 3 değişik durum gösterirler. Birincisi ayrılması tamamlanmış tip olup telomerleri arasındaki uzaklık, kromatid kalınlığından fazladır. İkinci tipte ayrılma tamamlanmamış olup homolog telomerler arasında kromatid kalınlığından daha az uzaklık vardır. Üçüncüde ise daha önce anlatılan yerleşimlerden

biri görülür ve kiazma sürmektedir.

İkinci metafaz plaklarında kromatidlerdeki kontraksiyon ve spiralizasyon yüzünden morfolojik analiz yapmak olanaksız gibidir. Kromatidler arasındaki açı 45-180 derecedir. Bu plaklarda ancak sayısal sapmalar araştırılabilir.

2.2-Mitomisin-C (MC)

Mitomisinler, girişte belirtildiği üzere, streptomyces caesipitosusun fermentasyon ürünlerinden filtrasyonla elde edilen antibiyotik niteliğinde maddelerdir. Hata ve arkadaşları mitomisin-A ve B'yi, Wakaki ve arkadaşları da mitomisin-C'yi içeren fraksiyon serilerini izole etmişlerdir (28). Bu üç tipten prelinik ve klinik araştırmalarda en çok dikkati çeken Mitomisin C olmuştur. Adenokarsinoma, skuamoz hücre kanseri ve gastro-intestinal kansere karşı tek başına anti-tümör etkisinin olduğu gösterilmiştir (28).

Mitomisin kimyasal anlamda bir mitosen derivativesidir. Genel ve açık formülleri aşağıdaki gibidir.

Molekül formülü $C_{15}H_{18}N_4O_5$ olup kimyasal adı azirizino (2',3':3,4) pyrolo (1,2-) indole-4,7-dione-6-aminol,1a,2,8,8a,8b- hegzahidro-8- (hegzahidroksimetil) 8a-metoksi-5-metilkarbamat; molekül ağırlığı 334.34 olan, mor kristaller halinde izole edilen bu madde su, metanol aseton ve n-bütilasetatta iyi; eter, benzen ve karbontetraklorürde az; petrol eterinde ise çok az çözünür. Sudaki çözeltisi, pH 6-9 arasında dayanıklıdır (28).

MC'nin hücre düzeyindeki etkileri rat karaciğerine doğrudan verilerek araştırılmıştır (23). Bütün hücrelerde çekirdekçiğin fibriller ve granüler bileşenlere ayrıldığı, NOR bölgelerinin çözülerek düşük elektron densiteli parçacıklar halinde kaldığı ve nukleolusun yüzük şeklini alması ile inaktivasyonunun tamamlandığı gözlenmiştir. Ribozomal RNA sentezi tümü ile inaktifleşmiş, çekirdekte kromatin dışı granüllerin sayısı artmıştır. Ayrıca sitoplazma, organeller, hücre yüzeyi ve hücreler arası boşlukta yaptığı etkiler de birleşerek dokuda lezyon ve nekrozla sonuçlanmıştır (23). MC nin yapısında iki metil ve bir amino grubu bulunmaktadır. Bu gruplar nedeni ile DNA daki guanin bazlarının 7 numaralı azotuna bağlanarak hem alkiler, hem çapraz bağ oluşturur (23, 37). MC, guanin bazındaki 6 numaralı oksijen atomuyla hidroksi radikal form oluşturur (20) ve bu yolla çapraz bağlara ya da hücrenin ölümüne yol açar. Antibiyotik aslında hem A-T, hem G-C sekanslarında non kovalan çapraz bağlar yapmakta ancak bu bağlar G-C sekanslarında daha kolay ve kalıcı olmaktadır (17). Mutajenik etkisi diğer mitomisinlere nazaran daha zayıf bulunmuştur (17). Hücre kültürlerinde, BrdU ile birlikte verilen antibiyotiğin kromatid değişiminde artışa neden olduğu saptanmıştır (6). Kültürlere G1 fazında eklenen kafeik ve ferrulik asitler, S fazısına kadar, tamir mekanizmasını bozarak MC nin yol açtığı kırıkları sabitleştirir (58).

DNA daki çift dal kırılmaları çift sarmalın bütünlüğünü bozarak kromozom düzensizliklerine yol açar. Tek zincir kırılmaları ise (bunlara primer lezyonlar denir) replikasyonu ya da kros-overi izleyen olaylarla çift zincir kırıklarına dönüşürler (3). Kromozomal sapmaların çoğu genetik materyal kaybından dolayı hücre için letaldirler ancak dengeli translokasyonlar ve benzeri letal etki göstermezler (3).



3.MATERYAL VE METOD

Araştırmada model canlı olarak albino isviçre fareleri (*Mus musculus Albicanus*, G.A.T.A), Mitomisin C (Kyowa), disseksiyon masası, dişli penset, makas, bistüri, 2.5 ml'lik insülin enjektörleri, saat camları, plastik santrifüj tüpleri, puar, pastör pipetleri, şale, lam, Sodyumtrisitat (Merck), etil alkol (Tekel), Asetik asit (Merck), Kloroform, Giemza boyası (Merck), Disodyum hidrojen fosfat (merck), Potasyum dihidrojen fosfat (Merck) ve distile su kullanılmıştır.

Ayrıca preparasyon sırasında 65 C derecede Benmari (Nüve), mikroskopik incelemeler için ışık mikroskobu (Karl Zeis Jena: Jena Val), mikrofotografilerde B 100 M elektronik fotoğraf makinası ile siyah beyaz ve renkli (25 ve 100 ASA) filmler (Kodak, Akfa ve Fuji) kullanılmıştır. Filmlerin banyo ve tab işlemleri için Afo Color (Ankara) ve güneş Color (Ankara) labaratuvarlarından yararlanılmıştır.

Ortalama 17-22 g ağırlığındaki, 10-12 haftalık erkek farelerin birer testislerine, serum fizyolojikte çözülmüş MC belirli dozlarda olmak üzere verilmiştir. Deri üzerinden palpasyonla bulunan testisin pens yardımı ile sabit durması sağlanmış ve ilaç doğrudan doğruyatestis içine enjekte edilmiştir. Her bir testise enjekte edilen ilaç ve izotonik çözelti miktarı toplam 0.05 ml dir. Deney grubundaki hayvanların diğer testislerine ve kontrol grubundakilerin her iki testislerine aynı hacimde serum fizyolojik enjekte edilmiştir. Amaç, hem kontrol ve deney gruplarını birbirleri ile, hem bireyleri kendi içlerinde karşılaştırmaktır.

Önceden saptanan 10, 5, 2.5, 1 ve 0.5 mg/kg (ilaç miktarı/vücut ağırlığı) doz gruplarının herbiri için enjeksiyondan sonra 24 saat, 48 saat, 10 gün, 15 gün ve 20 gün yaşatılma süreleri verilmiştir. Böylece 25 doz-zaman kombinasyonu oluşmuş, her kombinasyon için 10 fare kullanılmıştır.

Enjeksiyondan sonra eski ortamlarına konan , standart yemle beslenen kontrol ve deney grubu hayvanlar saptanan yaşatılma süreleri dolduğunda öldürülerek sonraki deney basamaklarına geçilmiştir.

Meiotik kromozomların araştırılmasında kullanılan çeşitli teknikler ve bunların modifikasyonları vardır. Spermatidlerin DNA içeriğinin (Kromozomların varlığı-yokluğunu ve anormal olup olmadıklarını araştırmak için) flow sitometri ile ölçülmesi (49) , testis biyopsi materyalinden ezme (Squash) tekniği (15, 68), uygun olan başka bir türle fertilizasyonundan sonra zigotik kromozomların incelenmesi (11, 46), biyopsi materyalini asitte parçaladıktan sonra elde edilen suspansiyonun veya doğrudan semen örneğinin ya da hipotonik çözeltiye boşaltılmış seminifer tüp içeriğinin hipotonik işlemde başlamak üzere periferik kan materyalindeki gibi çalışılması (21, 42) metodlardan bazılarıdır.

Bizim uyguladığımız teknik Stock (61) ve Meredith (50) tarafından tanımlanan metodların birleştirilerek laboratuvar şartlarımıza uyarlanmış şeklidir. Bu metod, Aynı anda 10-20 fareden alınan materyalin işlemine olanak vermesi, ekonomik oluşu gibi avantajları nedeni ile tercih edilmiştir.

Enjeksiyonu izleyen kesim günlerinde, her doz-süre grubundan 2-4

fare servikal dislokasyonla öldürülmüş ve zaman geçirilmeden çıkartılan testisler izotonik sodyum sitrat çözeltisine alınmıştır. Pens ve bistüri yardımı ile tunika albuginea ve yağ tabakası uzaklaştırılan tüpler daha sonra hipotonik işlem için distile suya alınarak toplu iğne ile aralanmıştır. Böylece tüp içerikleri in situ durumlarını elverdiği ölçüde koruyan tüplerin suyla temas yüzeyi arttırılmıştır. Testis tüpleri distile suda 8-10 dakika bırakılmış, hipotonik sodyum sitrat çözeltisi yerine distile su kullanılması, literatürde öngörülen süreyi 10-20 dakika kısaltmıştır. Hipotonik işlem bitince pensle nazikçe tutulan herbir tüp kütlesi lama değiştirilerek kurulanmış ve fiksatif içine alınmıştır (taze, soğutulmuş, etil alkol:Asetik asit:Kloroform=3:1:1) fiksasyon 6 ml fiksatif içeren plastik tüplerde gerçekleştirilmiş ve 30 dakika-1 ay süre ile buzdolabında saklanabilen materyalde 3 kez tekrarlanmıştır.

Preparasyondan hemen önce tüpteki fiksatif tümü ile uzaklaştırılmış, bunun yerine %60 asetik asit (su içinde) çözeltisinden 1.5 ml eklenmiştir. Materyal oda ısısında 5-6 dakika bekletilmiş, tüpcükler saydamlaştığında tüpe hafifçe vurarak serbest kalan hücrelerin homojen dağılması sağlanmıştır. Daha önceden temizlenerek 65 C derece sıcak yüzeye yerleştirilmiş lamlara, hücre suspansiyonu damlatılıp pipetle geri çekilerek yayılmıştır. Damlatma ve geri çekme işlemlerinde puar takılmış pastör pipetleri kullanılmıştır. Lamaların yerleştirildiği yüzeyin ısısı, 44 C derece öngörüldüğü halde bizim deneylerimizde 65-70 C derece arası en uygun aralık bulunmuştur. Bu amaçla 70 C dereceye ayarlanmış Benmari kapağı kullanılmıştır.

İlk tespit anında bölünmekte olan hücrelerin tümünün gözlenme şansını arttırmak için orijinalde ileri sürülen tüpcük parçası yerine bir

testisteki tam tüpcük kitlesi işleme alınmış ve elde edilen hücre süspansiyonunun hepsi lam üzerine yayılmıştır. Teknik orjinalde pastör pipetine alınan süspansiyonun lamın değişik yerlerine küçük miktarlarda damlatılarak daireler oluşturulacak şekilde yayılmasını öngörmüştür. Fakat bu yolla lam üzerinde birbirine yakın damlatılan 2 damlanın üst üste gelen kısımlarındaki kromozomları boyamak mümkün olmamış ve her bir deney hayvanı için en az 5 preparat hazırlamak gerekmiştir. Hem preparat sayısını azaltmak , hem damlaların üst üste çakışmalarını önlemek, hem de tüpcüklerdeki tüm metafaz plaklarını inceleyebilmek için, pipetteki materyalin hepsi bir büyük damla halinde lama damlatılıp geri çekilerek yayılmıştır.

Birgün havada kurumaya bırakılan preparatlar Sörensen tamponundaki % 3.5 Giemsa boyasıyla (pH 7), 20 dakika-2 saat süreyle boyanmıştır.

Metafaz plaklarının değerlendirilmesinde literatür çalışmaları ile elde edilen makalelerdeki normal ve anormal plakların fotoğraf ve idyogramlarından yararlanılmıştır (3, 27, 43, 50, 51, 67-70).

İncelenen ve fotoğrafı çekilen metafaz plakları arasında, aynı preparatlarda bile eşzamanlılık bulunmadığı için hepsinin aynı kalitede boyanmaları mümkün olmamıştır. Bundan dolayı tab işleminde agrandizör kullanıldığı halde fotoğrafların kalitesi çeşitlilik göstermiştir.

4.BULGULAR:

Deney ve kontrol grubu hayvanlar enjeksiyondan önce ve sonra aynı ortamda, standart besinle yaşatılarak ilacın etkisinden kaynaklanabilecek fizyolojik ve davranışsal değişiklikleri saptamak üzere, hergün bir kez kontrol edilmişlerdir. Ortalama bir saat süren kontrollerle ilacın ven içine ve periton içine verilmesinden sonra beklenen kusma refleksi, kusma, ishal gibi belirtiler ya da ölümün meydana gelip gelmiyeceği araştırılmış, ne bu belirtiler ne de ölüm gözlenmiştir. Enjeksiyon sırasında davranış değişiklikleri gelişmişse de bunlar ilacın tahriş etkisi, manüplasyon ve hayvanın doğal korunma iç güdüsüne bağlanmıştır. Deneyler boyunca kontrol ve araştırma grubu hayvanlar aynı yemle beslenmiş, aynı bakım altında tutulmuşlardır. Araştırma süresi uzun olduğundan mevsim farkları ve teknik olanaksızlıklar nedeni ile ısı sabit tutulamamıştır. Kanımızca ısı farklılıkları çalışmayı etkileyecek boyutlarda değildir.

Enjeksiyonu izleyen 1, 2, 10, 15 ve 20nci günlerde denekler enjeksiyonun yapıldığı saat esas alınarak, servikal dislokasyonla öldürülmüşlerdir.

Antibiyotik verilmiş testisin morfolojisinde gözlenen değişiklikler, süreye bağlı giderek artan küçülme ve renkteki porselen beyazından sarıya dönüşür. Sağkalım süresine bağlı bu değişiklikler ayrıca doz yükseltildikçe şiddetlenmiştir. Normalde testislerin uzun ve kısa çapları 8 mm X 5 mm civarında ölçülmüşken 0.5 mg/kg'lık doz, 15 günde organın

boyutlarını 5 mm X 2.5 mm ve 10 mg/kg'lık doz ise aynı sürede 2 mm X 1 mm civarına düşürmüştür. Testislerinden sadece birine ilaç verilen hayvanların aynı miktarda serum fizyolojik enjekte edilen öteki testislerinde hemen hiçbir değişikliğin gözlenememesi, atrofi saydığımız ve muhtemelen hücresel dejenerasyonla birlikte gerçekleşen olaya ilacın neden olduğunu ve tek tarafa verilen antibiyotığın diğer tarafa etkisinin ya hiç ya da kolayca ortaya konamayacak minimum düzeyde kaldığını düşündürmüştür.

Testisler açıldığında normal rengi beyazımsı, parlak ve kaygan görünümlü olan tüpcüklerin, ilaç verilmiş testiste sarımsı, yağlı, gevrek ve birbirine yapışık duruma geldikleri görülmüştür.

Kontrol grubundan hazırlanan preparatlarda Sertoli hücreleri, az sayıda Leydig hücreleri ve spermatogonyadan spermatozoona kadar meioz bölünmenin tüm basamaklarındaki hücreleri kapsayan, sayıları on binlerle ifade edilecek büyüklükte bir hücre tablosu veya kitlesi gözlenmiştir. Hernekadar dokudan hücre suspansiyonu yapılarak homojenlik sağlanmaya çalışılmışsa da preparatlarda zaman zaman birbirinden yeterince uzaklaştırılmayan hücre dizileri gözlenmiştir. Premeiotik mitoz, meiotik I ve meiotik II. bölünmeler arasındaki interfazlarla spermatidlerin hangi kategoriye alınabileceğini karar verilmesi güçlük yarattığından değerlendirme için meiotik indeks yerine MI/MII (birinci metafaz plağı sayısı/ikinci metafaz plağı sayısı) oranlarıyla yetinilmiştir (3). Bu oran literatürde başka bir fare soyu için 35/15 civarında bildirilmiştir (3). Çalışma boyunca bölünmeyi stimüle edici ajan ya da metafazda durdurmak için Kolşisin gibi bir tübülün inhibitörü kullanılmadığından preparatlarda gözlenen hücrelerin ilk fiksasyon

aşamasında, testisteki doğal durumu yansıttıkları sonucuna varılmıştır. Hemen tüm preparatlardaki hücrelerin gözlenme sıklıkları çoktan aza doğru şöyle sıralanabilir: spermatozoon, interfazdaki hücreler, Sertoli hücreleri, spermatidler, profaz I, diakinez-metafaz I, metafaz II ve premeiotik mitozun metafazındaki spermatogonyal hücreler (PMM).

Kontrol grubu için 15 ve deney grubu için 250, toplam 265 fare kullanılmıştır. Deney grubunun doz-yaşatılma süresi kombinasyonlarına dağılımı eşittir. Buna göre her kombinasyonda 10 hayvan vardır. Kullanılan 265 fareye ilişkin veriler tezin sonundaki eklerle ayrıca verilmektedir. Her bir kombinasyondaki anormal hücre yüzdesi önce her bir hayvandaki anormal hücre yüzdesi bulunduğundan sonra kombinasyon içi aritmetik ortalama ve standart hata hesaplanarak saptanmıştır. Tablo ve grafiklerde verilen değerler bu grup içi ortalamalar olmuştur. Grup içi ortalama hesaplanırken anormal hücre gözlenmeyen farelerdeki değer %0.00 olarak ortalamaya katılmıştır. Bu nedenle tablo ve grafikler incelenirken tek tek fareler için elde edilen sonuçların da dikkate alınması daha iyi fikir verebilir. Burada deney ve kontrol gruplarının her biri için elde edilen toplu sonuçlar tablo ve grafiklerle özetlenecektir. Her bir gruptan incelenen hücre sayısı; bunların metafaz tiplerine göre dağılımları ve M I/ M II oranları Tablo 1'de görülmektedir. Tablodan izleneceği üzere bütün preparatlardaki hücre sayısı kontrol grubunda hayvan sayısı ile orantılı biçimde 4556, deney grubunda 26567, toplam 32123 olup deney grubundan 5367, kontrol grubundan 1083, toplam 6450 hücrenin analizi mümkün olmamıştır. Deney grubundan incelenen 21200 hücrenin metafaz tiplerine dağılımı 12812 tane M I, 7301 M II ve 163 PMM (sırayla % 62.22, % 33.09 ve % 4.69) olarak bulunmuştur. Deney grubundaki doz-süre kombinasyonlarında incelenen M I plağı sayısı 815 ile 94

arasında, M II plakları 424 ile 53 arasında ve PMM plakları 99 ile 28 arasında değişim göstermiştir. Bunun nedeni ilacın hücre-letal etkisidir. Nitekim değerlendirmeye alınan preparatlarda bu değerlerin bir veya daha çoğunun sıfıra indiği 26 birey genellikle yüksek doz-uzun süre kombinasyonlarında bulunmaktadır. Bu kombinasyonlarda esas itibarıyla PMM plaklarının eksikliği gözlenmiştir. M I ve M II plağı sayıları, bir kaç istisna dışında, dozun yükseltilmesine ve sürenin artmasına paralel bir azalma göstermiştir.

M I/M II oranı, kontrol grubunda 2.18 ± 0.33 ve deney grubunda ortalama 1.63 ± 0.04 çıkmıştır. Bu oranlardan kontrol grubundakine en yakını 0.5 mg/kg doz-1 gün kombinasyonunda 2.15 ± 0.11 olarak belirlenmiştir. Bu değerler de doz-gün kombinasyonunun artmasıyla azalma göstermiş, ve 10 mg/kg-20 gün kombinasyonunda 1.14 ± 0.04 şeklindeki M I/M II oranı deney grubundan elde edilen en düşük değer olmuştur (Şekil 1).

Kombinasyonların birbirleri ile ve kontrol grubundakilerle karşılaştırılmasında 2 yönlü varyans analizi uygulanmış en az 2 grubun farklı olduğu ($p < 0.001$), tek tek kombinasyonların birbirinden farksız olduğu ($p > 0.05$), günler arasında farkın bulunmadığı ($p > 0.05$) ve tüm dozların birbirinden farklı olduğu ($p < 0.001$) saptanmıştır. Yine uygulanan test sonucuna göre yalnız 10 mg/kg doz kombinasyonları kontrol grubundan farklı bulunmuştur. Muhtemelen daha küçük dozların etki için daha uzun süre beklemesi gerekmektedir.

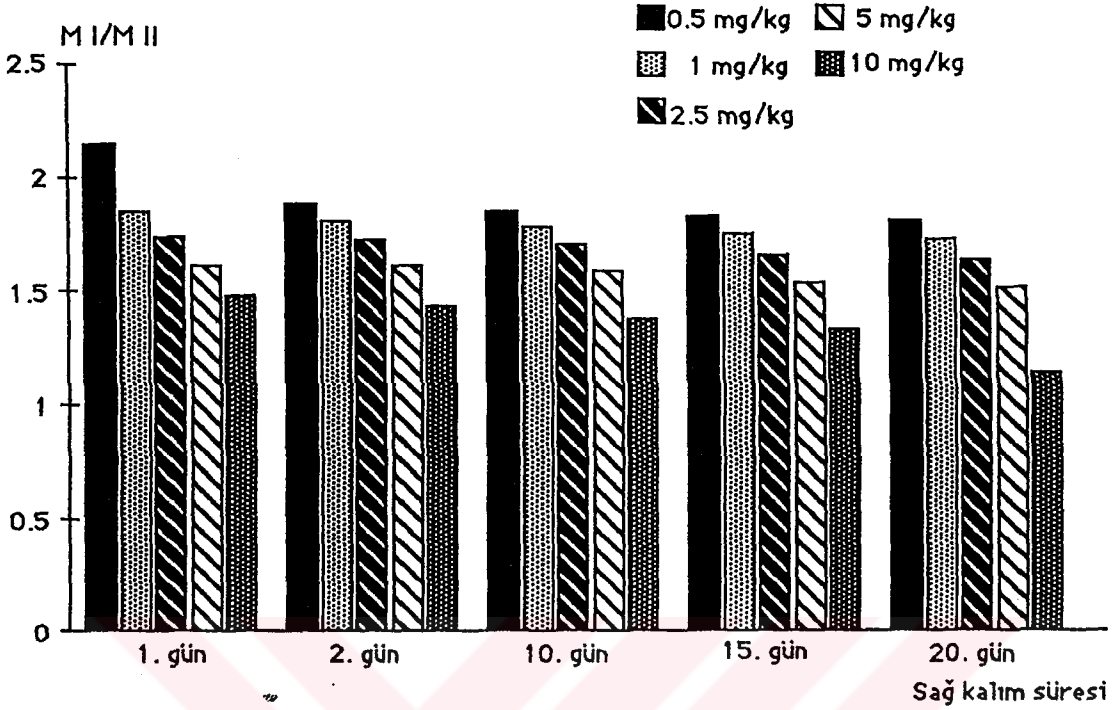
MC'nin buraya kadarki etkileri topluca şöyle verilebilir.

- a) Morfolojik düzeyde
- b) Sellüler düzeyde.

Morfolojik düzeydeki etkiler, 1)anormal yağlanma, 2)Atrofi olmak üzere 2 tiptir.Sellüler düzeydeki etkilerse 1)genel olarak hücre sayısında azalma, 2) M I/M II oranlarında düşme, 3)genel olarak hücre sayısında meydana gelen azalmaya bağlı meiotik olgunlaşma oranının düşmesi.

Tablo 1.Deney grubu preparatlarındaki metafaz plaklarının M I,M II, PMM tiplerine dağılımı ve M I/ M II oranları

Gün	DOZ mg/kg	İNCELENEN				İNCELENEMEYEN		M I/M II ± S.E.	
		M I	M II	PMM	Toplam	Toplam			
1	10	475	322	74	671	105	976	1.48	0.19
	5	356	246	66	668	123	791	1.62	0.18
	2.5	697	403	25	1125	190	1315	1.74	0.18
	1	821	481	83	1385	280	1665	1.86	0.18
	0.5	762	346	94	1202	436	1638	2.15	0.11
2	10	319	211	87	617	68	685	1.44	0.12
	5	347	207	66	620	113	733	1.62	0.16
	2.5	457	297	54	808	271	1079	1.73	0.13
	1	681	379	49	1109	243	1352	1.81	0.13
	0.5	815	424	48	1287	402	1689	1.89	0.07
10	10	200	157	56	413	61	474	1.38	0.21
	5	304	167	68	539	149	688	1.60	0.15
	2.5	475	255	39	1244	133	1377	1.71	0.12
	1	826	369	69	1264	265	1520	1.79	0.10
	0.5	729	314	68	1111	442	1553	1.86	0.07
15	10	215	140	40	395	120	415	1.33	0.12
	5	278	201	68	556	91	647	1.54	0.19
	2.5	592	297	34	923	164	1087	1.66	0.12
	1	822	468	99	1389	335	1724	1.76	0.13
	0.5	552	555	58	165	486	1651	1.83	0.27
20	10	94	53	28	175	116	291	1.14	0.05
	5	223	156	50	429	46	475	1.52	0.16
	2.5	554	368	65	987	147	1134	1.64	0.19
	1	529	321	73	923	199	1122	1.73	0.12
	0.5	689	510	53	1252	382	1634	1.81	0.16
Toplam		12812	7301	1511	21200	5367	26567	1.63	0.21
Kontrol		2161	1149	163	3473	1083	4556	2.18	0.33
Genel toplam		14973	8450	1678	24673	6450	31123	1.91	0.39



Şekil 1. Deney grubuna ait MI/MII oranlarının dozlara ve süreye bağlı değişim grafiği.

Kromozomlarla ilgili bulgular normal metafaz plakları, sayısal anomali içeren ve yapısal anomali içeren plaklar şeklinde sırayla verilecektir.

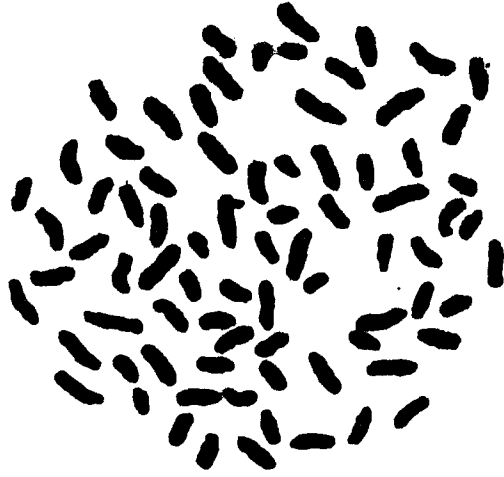
Genel bilgiler bölümünde belirtildiği gibi farenin diploid somatik kromozom sayısı 40'tır. Kimi yazarlar kromozomların akrosentrik niteliğini (3) ileri sürerken kimileri hepsinin telosentrik olduğunu kabul ederler (59). Ayrıca boyları da küçük ve birbirine oldukça yakındır. Bundan dolayı individüalizasyonda güçlüklerle karşılaşılır. Spermatogonyal mitozun metafazında akrosentrik yapı gösteren kromozomlara rastlanmakla birlikte, genellikle kısa kollar görülememiş ya da çok küçük oldukları için ayırt edilememişlerdir (Resimler 1 ve 2). Preparatlarımızda bulunan

mitotik plakların hemen hepsi $2n$ diploid sayının katları sayıda kromozom içermektedirler. Ancak bu gerçek bir öploidi değil, bölünmenin eşzamanlılığından ortaya çıkan bir olay olduğu için anormal sayılmamıştır (3). Şekil 2'de iki hücreye ait 80 kromozomlu böyle bir PMM plağından hazırlanan karyotip görülmektedir. Karyotipin hazırlandığı plak ise bir önceki resimde verilmektedir (Resim 2). Bu plak kontrol grubundan bir farenden elde edilmiştir. Kromozom sayısı 79 olup hücrelerden birine ait Y kromozomu görüntü alanının uzağında kaldığından fotoğraf ve karyotipte yer almamıştır.

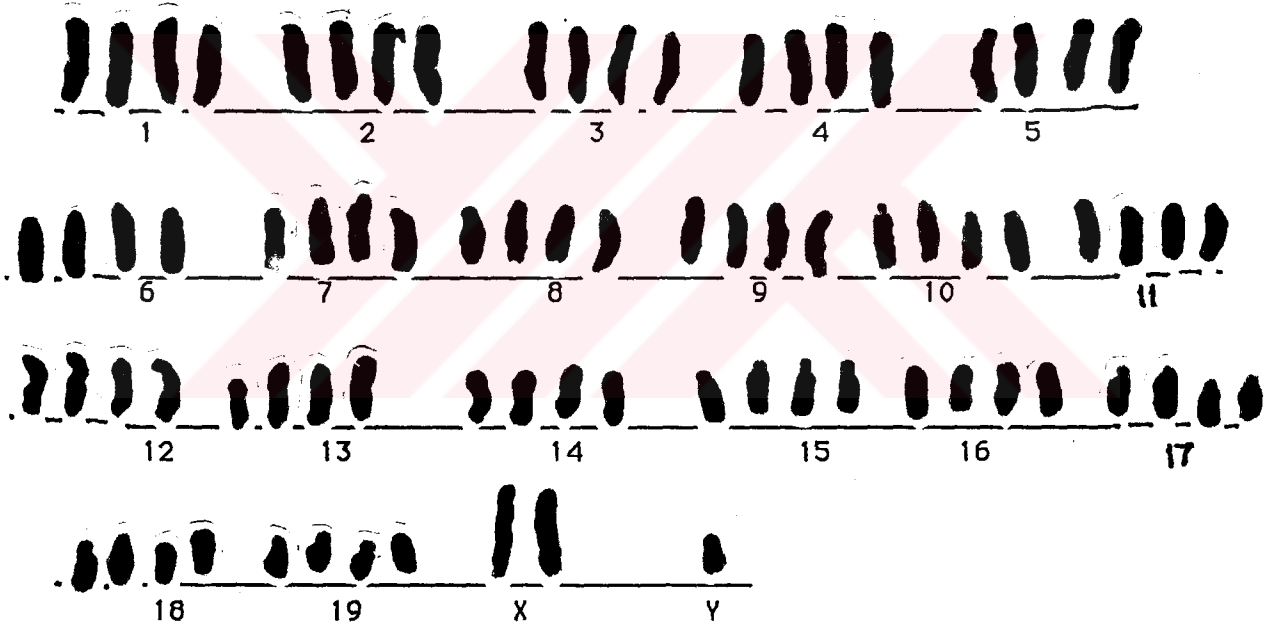
Normal diakinez-M I plaklarında, 40 kromozom homologlarıyla ikişer ikişer eşleşerek 20 bivalan oluştururlar (Resimler 3 ve 4). Bivalanlar, daha önce genel bilgi bölümünde anlatılan konumlanmadan birini gösterirler. Normal plaklarda ünivalan, mültivalan ve benzeri anomaliler gözlenmemektedir (Resimler 3 ve 4).



Resim 1. Üç ayrı hücrenin senkronize bölünmesi ile oluşan 120 kromozomlu PMM Plağı. Kromozomların hepsi telosentrik görünmektedir. Giemsa x immerstyon



Resim 2. 79 kromozomlu bir PMM plağı. Kontrol grubundan bir preparatta bulunmaktadır. Giemsa x Immersiyon.



Şekil 2. Tetraploid PMM plağından hazırlanan 79 kromozomlu karyotip. Bu karyotipin yapıldığı plak Resim 2'de görülmektedir. Y kromozomlarından bir tenesi görüntü alanının dışında kalmıştır.

Şekil 3 ve 4 de, 3 ve 4 numaralı resimlerdeki M1 plaklarından

hazırlanan karyotip ve idiogramlar verilmektedir. Karyotipler hazırlanırken bivalenin relatif büyüklüğü dikkate alınarak büyükten küçüğe doğru bir sıralama yapılmıştır. MII plakları ancak sayı ve uzunluk bakımından incelenmişlerdir. Diakinez-MI plaklarında olduğu gibi bu plaklarda da kromozomların kısa kollarının varlığını belgeleyecek belirtiler çok azdır.

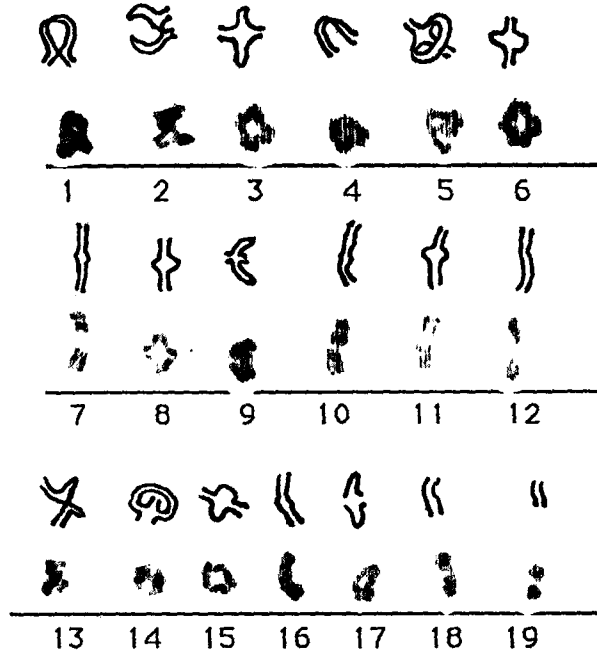
M II plaklarındaki kromozomlar mitotik kromozomlar gibi tek tek bulunmakta, ancak kromatidler zigzaglı görüntüde ve telomerler birbirinden çok uzaklaşmış durumdadır (Resim 5). Normal ve iyi boyanmış plaklarda X kromozomu koyuca boyanan, büyük ve kromatidleri gergin duran bir kromozom, Y ise aynı özellikteki en küçük kromozom olarak ayırt edilir (Resim6). Şekil 5'de kromozom büyüklüğü esas alınarak hazırlanmış bir M II karyotipi ve ait olduğu plak görülmektedir (Resim 7).

Fare testislerinde MC verilerek indüklenen kromozom anomalilerinin bulunup bulunmadığı her 3 tip metafaz plaklarından sitogenetik inceleme ile araştırılmıştır. Deney grubu, kontrol grubu ile karşılaştırmalı incelendiği gibi, aynı bireyin ilaç verilen ve verilmeyen testisleri de karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. İlaç verilmeyen testislerden hazırlanan preparatlardaki metafaz plaklarının analize uygun olan hepsi normal kromozom yapısı göstermiştir.

Bulgular hem ilacın sistemik etkisinin olmadığı hem ilaç verilen tarafta gözlenen sapmaların, farede MC verilmeden önce zaten bulunduğu kuşkusunun yersizliğini kanıtlar niteliktedir.



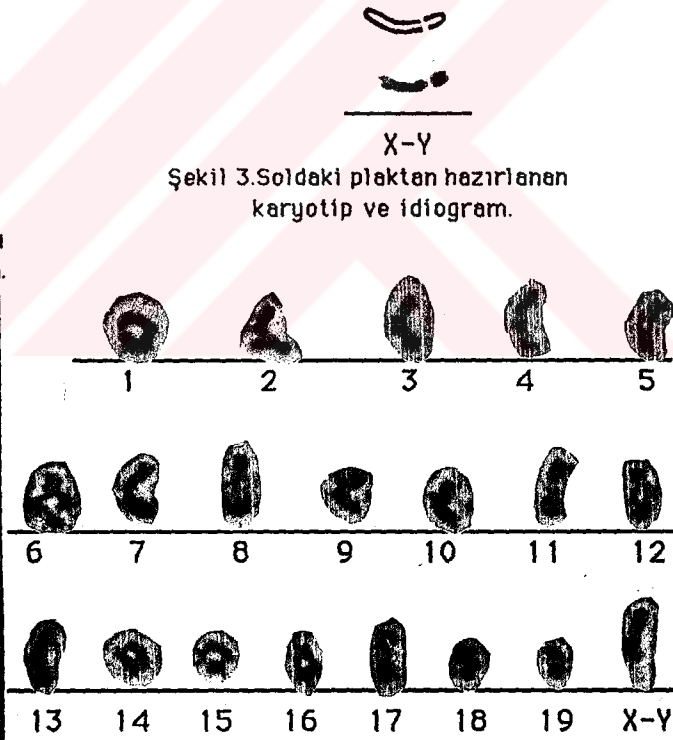
Resim 3. Normal bir M I plağı. Bivalentler kiazma nedeni ile haç, yüzük, U, V görünümünde. X-Y bivalenti okla işaretli. Giemsa x immersiyon.



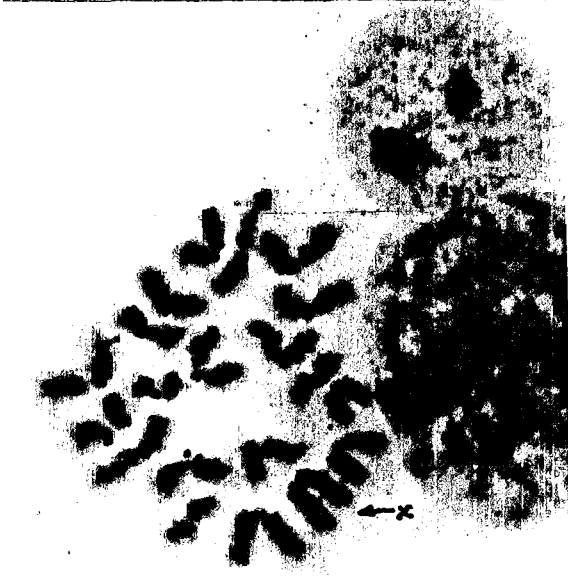
Şekil 3. Soldaki plaktan hazırlanan karyotip ve idiogram.



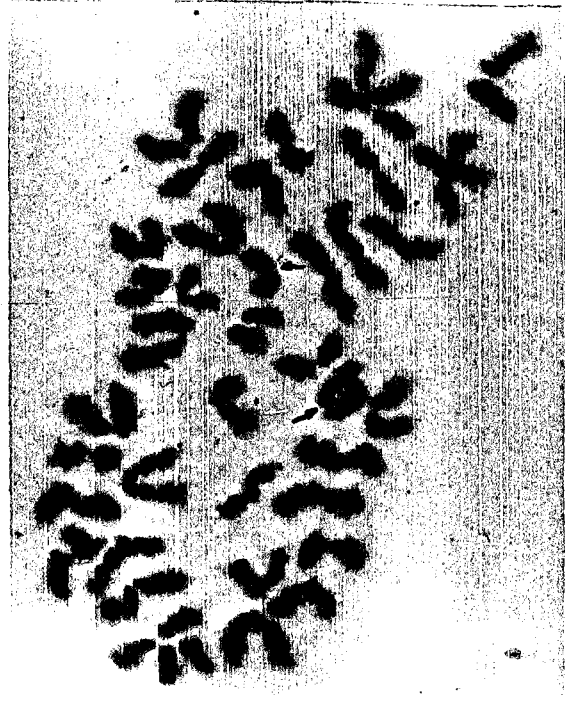
Resim 4. Normal M I plağı (MC uygulanmamış materyalden). Giemsa x immersiyon.



Şekil 4. Soldaki plağın karyotipi.

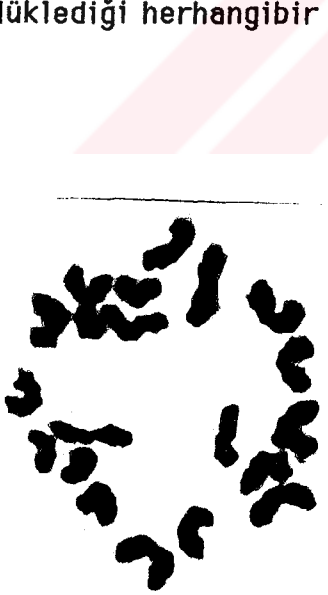


Resim 5. Normal M II plâğı. X kromozomu okla işaretli. Giemsa x immersiyon

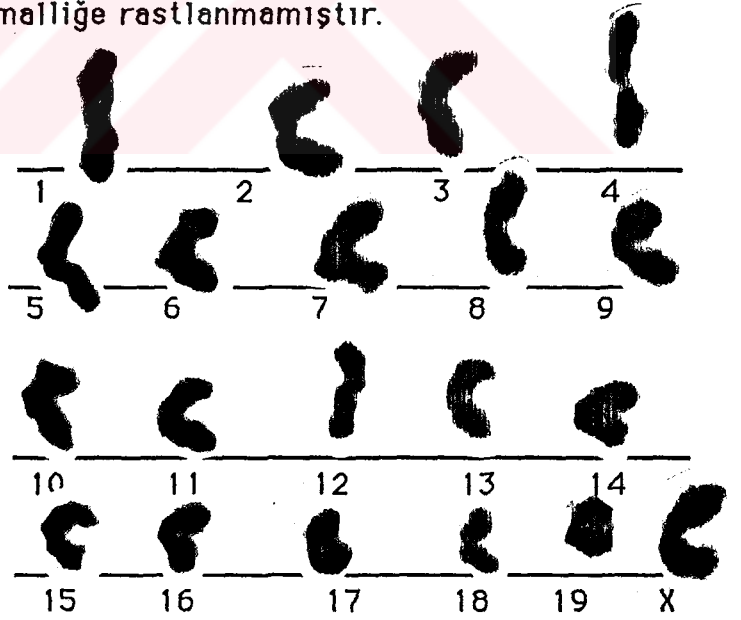


Resim 6. Aynı alana rastlamış, biri X, diğeri Y kromozomu içeren 2 M II plâğı. Giemsa X immersiyon.

Deney ve kontrol gruplarından incelenen PMM plâklarında ilacın indüklediği herhangi bir anormalliğe rastlanmamıştır.



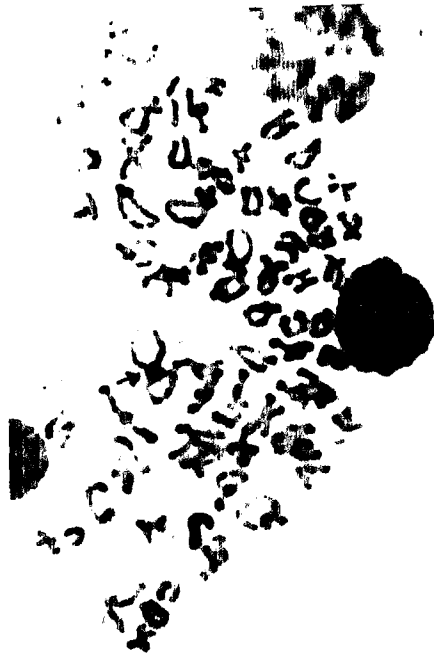
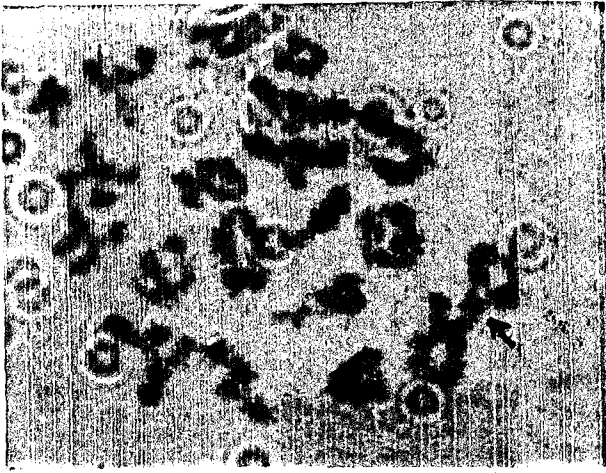
Resim 7. Koyu boyanmış bir M II plâğı. İlaç verilmemiş materyalden elde edilmiştir. X kromozomu okla işaretli. Giemsa x immersiyon.



Şekil 5. Yandaki plâkten hazırlanan karyotip (Kromozom büyüklüğü esas alınarak hazırlanmıştır).

İncelenen M I plaklarında gözlenen kromozom düzensizlikleri belirli tiplere ayrılarak incelenmiştir. Bunlardan birincisi translokasyonları ifade eden mültivalanlardır. Bunların doz-yaşatılma süresi kombinasyonlarına dağılımları Tablo 2'de sayısal ve oransal olarak verilmektedir. Mültivalanlar metafaz plağında 2'den fazla kromozomun birbirleriyle kizma yapmaları ile ayrılmışlardır. Deney grubunda gözlenen mültivalanların hepsi 4 kromozomu içine alan kuadriyalanlardır. Bunların hem halka hem zincir şekillerine rastlanmıştır.

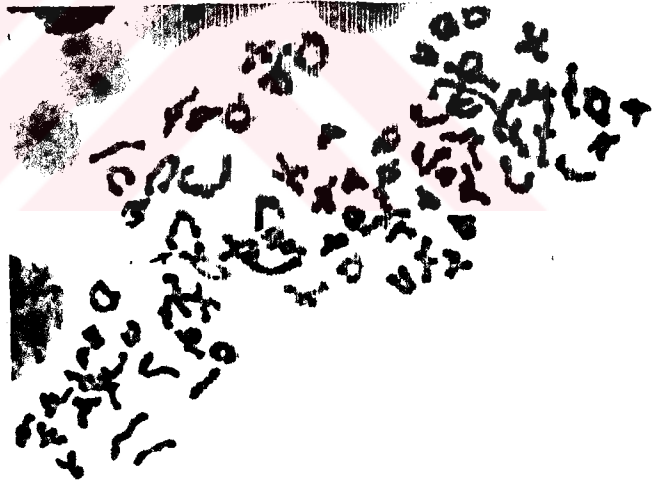
Mültivalanlardan zincir tipi olanlarda yeni düzenlenmiş kromozomlar önce normal bivalanda gözlenen konulardan birini alırlar. Ancak transloke olan parçaların homologları diğer kromozom üzerinde bulunduğundan bir normal ve bir translokasyon kromozomu içeren diğer bivalanda kalmıştır. İki bivalan arasında yer değiştiren parçaların büyüklüğüne bağlı çeşitli derecelerde kizma benzeri ilişki gözlenir (Resimler 8-16 ve idiogramları). Halka veya yüzük tipinde ise yeni düzenlenmiş kromozomlarla bunların normal homologları 4 kromozomlu bir çember oluştururlar. Kromatidler arası ilişki yine yer değiştiren parçaların büyüklüğü ile orantılı gerçekleşir. Böylece telomerlerin uc uca geldiği ya da daha büyük distal bölgeleri içeren 2 kizma gözlenir (Resimler 17-21 ve idiogramları). Bir M I plağı kuadriyalan içeriyorsa 18 normal bivalan yanısıra bir büyük halka ya da telomerlerinde kizma bulunan 2 bivalan yani translokasyon dörtlüsü gözlenir. Bu da ilk bakışta bir bivalanın eksilmiş olduğunu düşündürebilir.



Resim 8



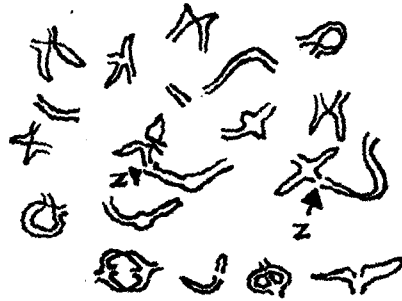
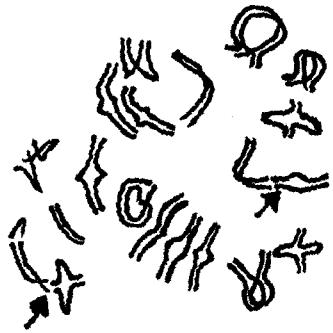
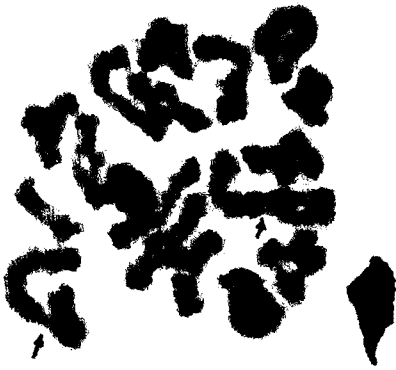
Resim 9



Resim 10

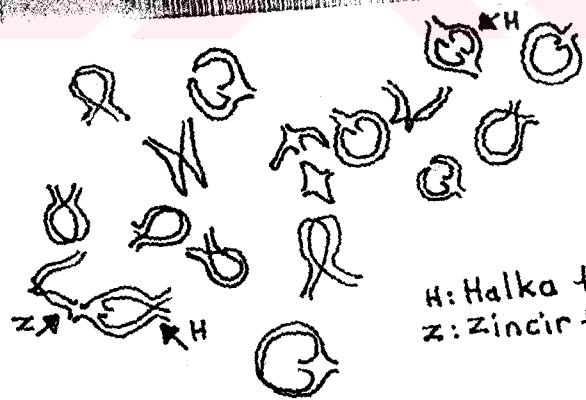
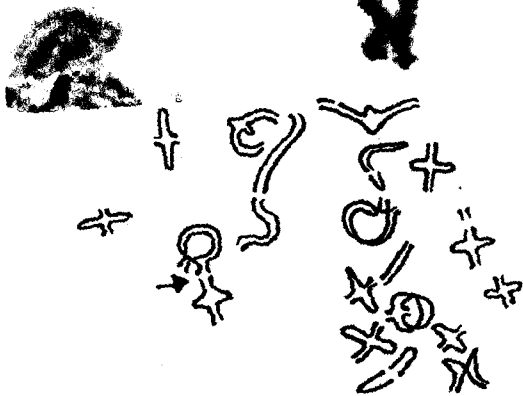
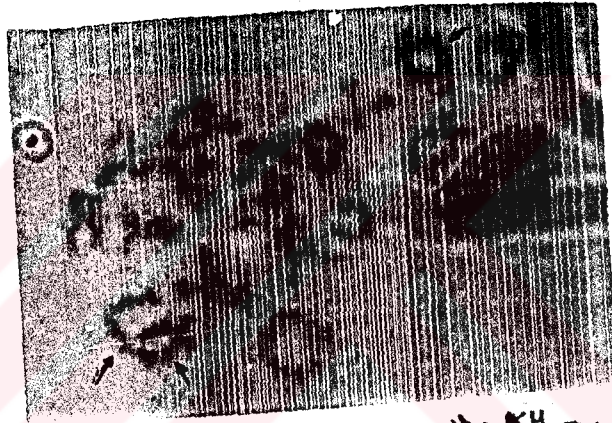
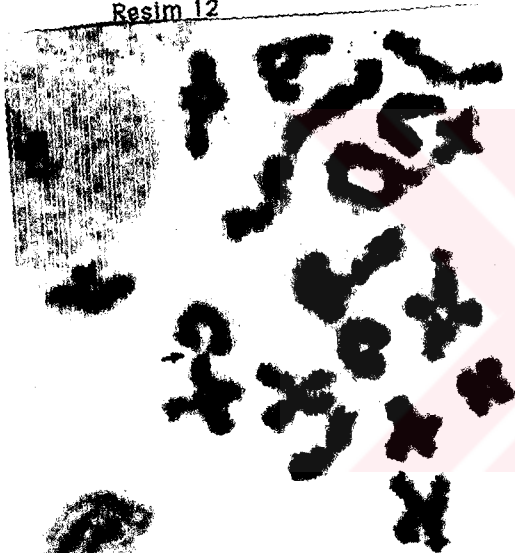


Resim 11



Resim 12

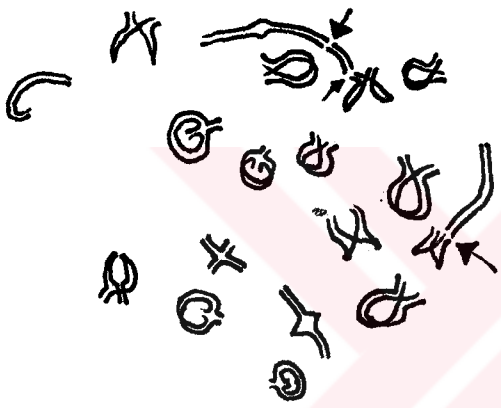
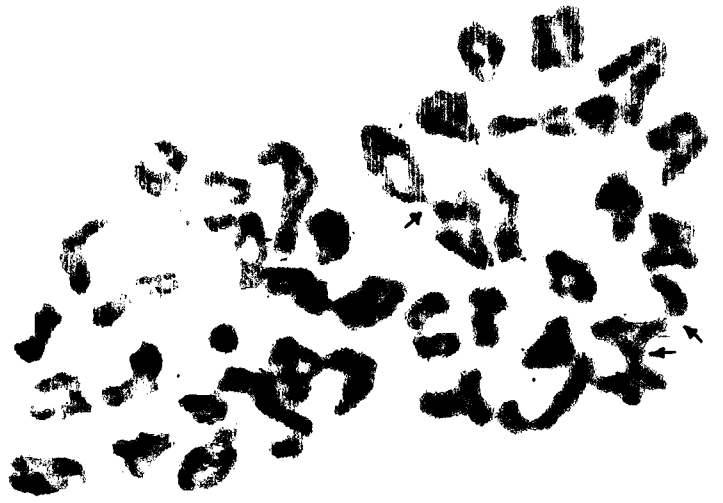
Resim 13



H: Halka tipi
z: Zincir tipi

Resim 14

Resim 15



Resim 16

Resim 17

Resimler 8-17. Deney grubundan elde edilen zincir kuadrivalan içerikli MI plakları ve bunların idiogramları. Giemsa x immersiyon.

Resimlerden birinde (Resim 17) görülen mültivalan 5 kromozom içermektedir. Mültivalanı meydana getiren kromozomlardan dört tanesi ikişer ikişer bivalan oluşturmuş ve bivalanlar da transloke parçaların telomerleri arasındaki kiazma nedeni ile zincir tipi bir dörtlü meydana getirmişlerdir. Mültivalana katılan beşinci kromozom ise bivalanların yalnız biriyle ilişkide olup kromozomların kısa kollarının varlığını düşündürmüştür. Böyle beşli zincirler kromozomlar arasındaki daha önce oluşmuş 2 ya da daha çok traslokasyonun varlığına işaret eder.



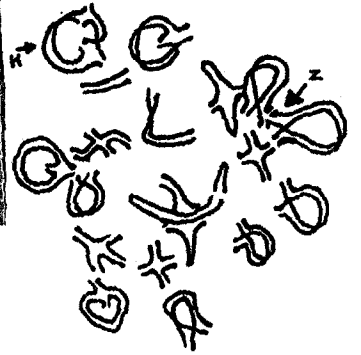
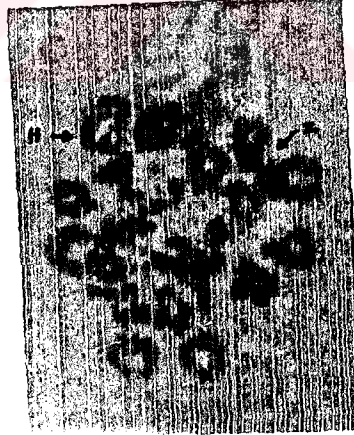
Resim 18



Resim 19



Resim 20



Resim 21

Resimler 18-21. Deney grubundan elde edilen ve halka tipi kuadrivalan içeren plaklarla bunların idiogramları. Giemsa X immersiyon

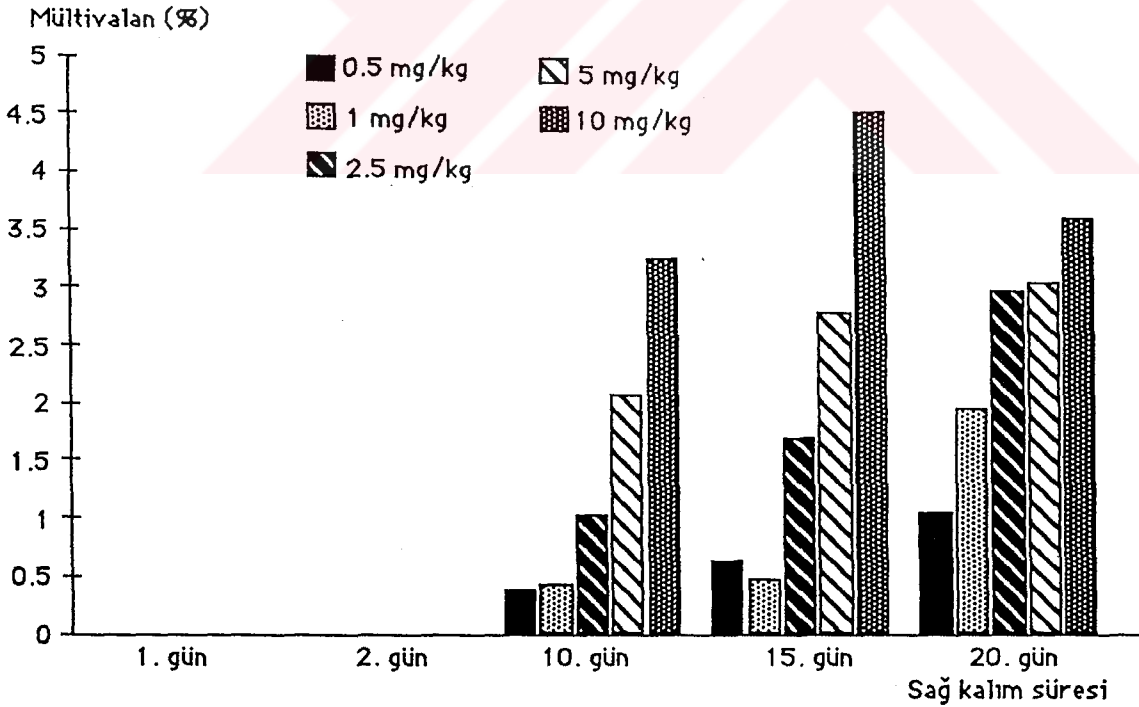
İlaç verilen gruptan hazırlanan preparatlardaki mültivalanların doz-yaşatılma süresi kombinasyonlarına dağılımını ikinci tablo ve altıncı şekildeki grafikte verilmiştir. Tablodan izleneceği üzere bir ve ikinci gün kombinasyonlarının hiç birinde mültivalan oluşumu gözlenmemiştir. Başka bir deyişle, verilen dozlardaki ilacın yol açacağı "exchange" tipi düzensizlikler bir ve ikinci günlerde ortaya çıkmamıştır.

On, 15 ve 20nci günlerde yapılan preparatlarda sırayla 0.5 mg/kg doz kombinasyonunda 3 (% 0.40), 5 (% 0.65) ve 8 (% 1.07); 1 mg/kg doz kombinasyonunda 3 (% 0.44), 7 (% 0.84) ve 12 (% 1.97); 2.5 mg/kg doz kombinasyonunda 8 (% 1.03), 11 (% 1.70), 17 (% 2.97); 5 mg/kg doz kombinasyonunda 6 (% 2.08), 7 (% 2.79) ve 8 (% 3.05); son olarak 10 mg/kg doz kombinasyonunda 7 (% 3.24), 10 (%4.51) ve 4 (%3.59) mültivalan gözlenmiştir. Kontrol materyali bulgularına bakılarak mültivalanların ilacın etkisinden ileri geldiklerine karar verilmiştir. Nitekim bu değerlere iki yönlü varyans analizi uygulanarak mültivalan oluşumu bakımından hem günlerin hem dozların birbirlerinden farklı oldukları saptanmıştır ($p < 0.001$). Yine iki yönlü varyans analizi uygulanarak 0.5-1 ve 2.5 mg/kg dozlarla 2.5 ve 5 mg/kg dozlar arasında farkın bulunmadığı ($p > 0.05$) diğer bütün kombinasyonların farklı olduğu ($p < 0.001$) bulunmuştur. Bir ve ikinci günler arasında ayrıca 10,15 ve 20-nci günler arasında fark bulunamamış ($p > 0.05$) diğer bütün karşılaştırmalarda farkın bulunduğu belirlenmiştir ($p < 0.001$).

Kontrol grubu preparatlarındaki hücrelerden hiç birinde mültivalan gözlenmemiştir. Bir ve ikinci gün kombinasyonları bulgular kontrol grubundakilerden farksız çıkmıştır ($p > 0.05$).

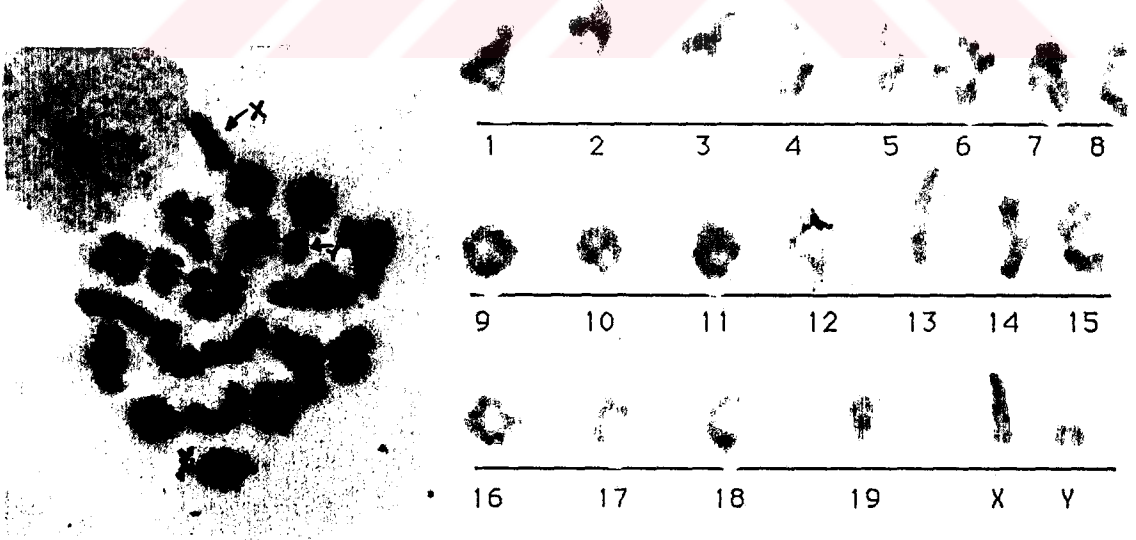
Tablo 2. İlaç verilen grupta gözlenen mültivalanların doz-yaşatılma süresi kombinasyonlarına dağılımı

DOZ mg/kg	YAŞATILMA SÜRESİ(gün)									
	1		2		10		15		20	
	ad	% ± S.E	ad	% ± S.E	ad	% ± S.E	ad	% ± S.E	ad	% ± S.E
0.5	-	-	3	0.40 ± 0.21	5	0.65 ± 0.28	8	1.07 ± 0.26		
1	-	-	3	0.44 ± 0.22	7	0.84 ± 0.30	12	1.97 ± 0.58		
2.5	-	-	8	1.03 ± 0.43	11	1.70 ± 0.47	17	2.97 ± 0.43		
5	-	-	6	2.08 ± 0.68	7	2.79 ± 0.60	8	3.05 ± 0.76		
10	-	-	7	3.24 ± 0.96	10	4.51 ± 1.19	4	3.59 ± 1.62		

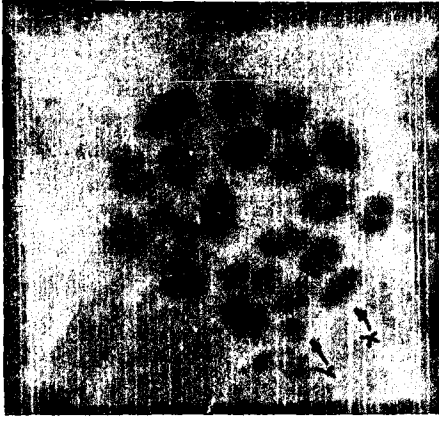


Şekil 6. İlaç verilen grupta gözlenen mültivalan içerikli M1 plaklarının doz-yaşatılma süresi kombinasyonlarına dağılım grafiği.

İlacın etkisi ile oluşan ünivalanlar sinaps ve kiazmayı engelleyen yapısal anormalliklerden kaynaklanırlar. Antibiyotiğin verildiği grupta gözlenen ünivalanların yaklaşık % 50 kadarı X ve Y kromozomlarının birbirinden ayrı düşmeleri şeklinde görülmüştür (Resim 22). Böylece psödootozomal bölgedeki bozukluklara yol açan kırılmalar ve yeni düzenlenmeler hakkında fikir edinilmiştir. Resim 22 ve bundan hazırlanan karyotiple idiogram incelenip, 23 ve 24 üncü resimlerdeki X ve Y kromozomları normal plaklardaki (Resimler 3,4) XY bivalan pozisyonuyla karşılaştırıldığında gonozomal ünivalanları tutan değişiklikler daha iyi anlaşılabilir. Otozomal ünivalanlar daha çok küçük kromozomların eşleşememesi ile ortaya çıkmışlardır. Resimler 25-27 ve ilgili idiogramlar incelendiğinde öteki bivalanlarda kiazma sürerken bir çiftin kiazma yapmayıp birbirlerinden oldukça uzakta konumlandığı kolayca anlaşılır. Burada rol oynayan faktör, çiftin bir ya da her iki üyesindeki kırılmayı izleyen ve homolojiyi bozan morfolojik sapmadır.



Resim 22. XY ünivalanı içeren bir M I plâğı ve bundan hazırlanan karyotip.
Giemsa x immersiyon



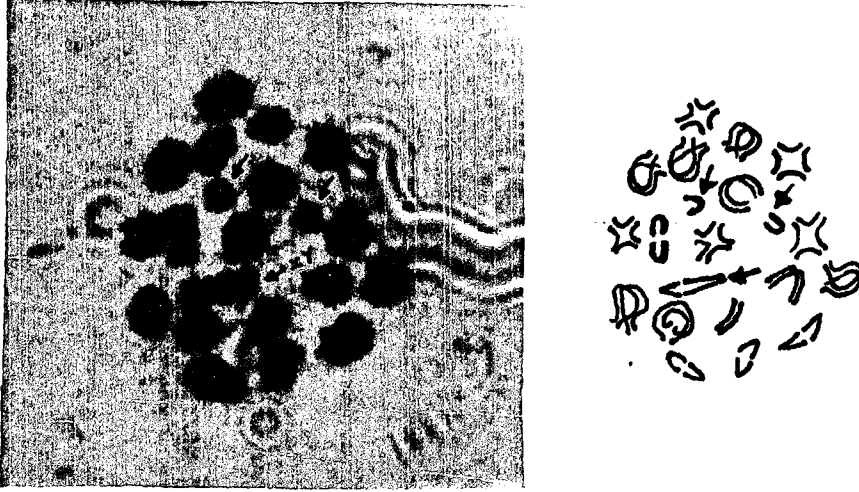
Resimler 23 ve 24. XY ünivalanı içeren iki M I plağı ve idiogramları. Ayrıca otozomal ünivalanlarında bulunduğu sağdaki resimde X ve Y nin birbirine uzaklığı dikkat çekici boyuttadır. Giemsa x immersiyon.



Resim 25. Otozomal ünivalanları içeren M I plağı (ünivalanlar okla işaretli). Giemsa x immersiyon.



Resim 26. Otozomal ünivalan içeren tetraploid M I plağı (ünivalanlar okla işaretli) Giemsa x immersiyon.

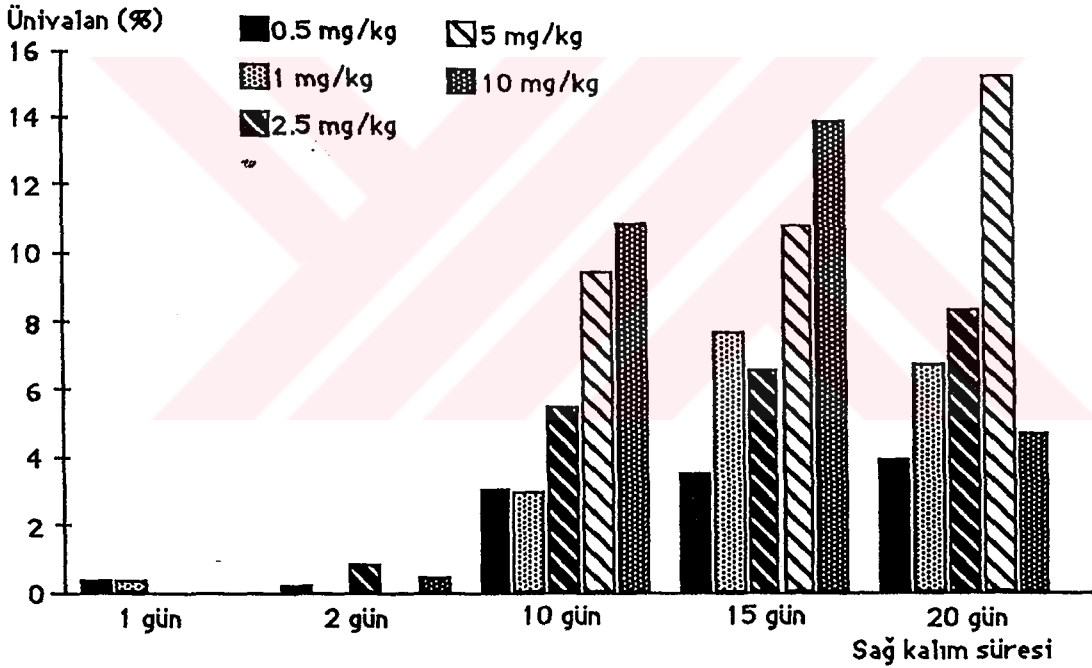


Resim 27. Otozomal ünivalanlar içeren M I plâğı ve bundan çizilen idiogram.
Giemsa x immersiyon.

İlacın verildiği grupta ilk ve ikinci gün preparatlarından 0.5 mg/kg doz-1 gün kombinasyonunda 1 (% 0.19), aynı dozun ikinci gün kombinasyonunda yine 1 (% 0.11), 1 mg/kg-1 gün kombinasyonunda keza 1 (%0.19), 2.5 mg/kg-2 gün kombinasyonunda 2 (% 0.86) ve 10 mg/kg-2 gün kombinasyonunda 1 (% 0.23) ünivalan gözlenmiştir (Tablo 3). Tablodan izleneceği üzere 10,15 ve 20 inci gün kombinasyonlarıyla oluşan ünivalanların dağılımı sırayla 0.5 mg/kg dozla 22 (% 3.06), 25 (% 3.59) ve 26 (% 3.97); 1 mg/kg doz kombinasyonunda 25 (% 2.98), 29 (% 7.69) ve 31 (% 6.81); 2.5 mg/kg doz kombinasyonunda 24(% 5.69), 36 (% 6.66), 47 (% 8.38); 5 mg/kg doz kombinasyonunda 33 (% 9.44), 29 (% 10.77) ve 32 (% 15.25); son olarak 10 mg/kg doz kombinasyonunda 25 (% 10.68), 30 (%13.91) ve 5 (%4.76) ünivalan gözlenmiştir. Ünivalan oluşma oranları açısından kombinasyonlara uygulanan iki yönlü varyans analizi hem dozlar hem günler arasında farkın bulunduğunu göstermiştir ($p<0.001$). Birinci ve ikinci günler arasında ayrıca 15 inci ve 20 inci günler arasında farkın olmadığı ($p>0.05$) fakat diğer bütün karşılaştırmalarda farklılığın bulunduğu anlaşılmıştır ($p<0.01$).

Tablo 3. Deney grubunda gözlenen ünivalanların doz-yaşatılma süresi kombinasyonlarına dağılımı

DOZ mg/kg	YAŞATILMA SÜRESİ (gün)														
	1			2			10			15			20		
	ad.	%	S.E.	ad.	%	S.E.	ad.	%	S.E.	ad.	%	S.E.	ad.	%	S.E.
0.5	1	0.19	0.19	1	0.11	0.11	22	3.06	0.59	25	3.59	0.40	26	3.97	0.54
1	1	0.19	0.19	-	-	-	25	2.98	0.69	29	7.69	1.13	31	6.81	1.03
2.5	-	-	-	2	0.86	0.72	24	5.69	0.54	36	6.66	0.46	47	8.38	0.95
5	-	-	-	-	-	-	33	9.44	2.53	29	10.8	1.48	32	15.3	2.88
10	-	-	-	1	0.23	0.23	25	10.7	1.83	30	13.9	2.29	5	4.76	1.73

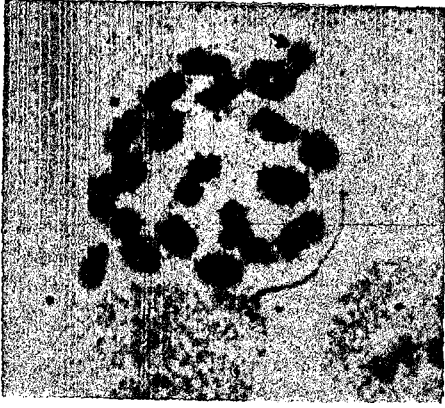


Şekil 7. Deney grubunda gözlenen ünivalanların doz-yaşatılma süresi kombinasyonlarına dağılım grafiği.

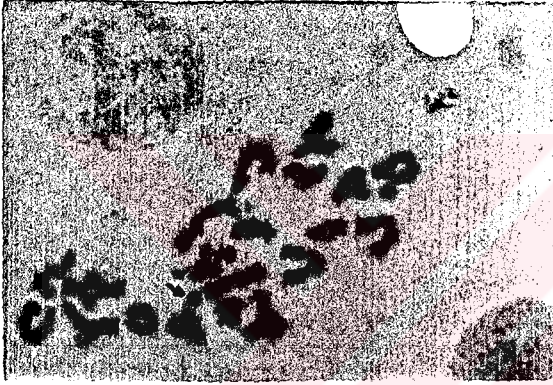
Kromozomları tutan yapı düzensizliklerinden fragmanlar doz-yaşatılma süresi kombinasyonlarında 10uncu günden itibaren gözlenmeye başlamış, sadece 2.5 mg/kg dozun 2nci gün kombinasyonunda 2 tane (% 0.23) izokromatid fragman (iki kromatidli) görülmüştür (Tablo 4). Yanılgıdan kurtulmak amacıyla genellikle

izokromatid fragmanlar dikkate alınmış, tek zincirdekilerin artefakt olup olmadıkları ayırt edilemediği için değerlendirmeye alınmamışlardır. Yirmisekiz ve 30uncu resimlerdeki plaklar izokromatid fragman içermektedirler. Bunlar homolog çiftin ya her iki üyesinin birden ya da bir üyenin iki kromatidinin de kırılıp, kopan parçaların bir arada bulunmasıyla ileri gelen bir anormalliktir. Diakinez-MI plâklarında gözlenen bu çift kromatidli parçalar büyük olasılıkla birinci meiotik bölünmenin başlarında meydana gelmiş, onarılamamış ve henüz hücre bölünmediği için de kaybolmamışlardır. Resimlerde görülen parçaların 3 tanesi de birer bivalana çok yakın konumlanmış ya da onunla hala ilişkilerini sürdürmektedirler. Bu ilişkiye izokromatid fragman asosyasyonu denir (3). Fragman muhtemelen koptuğu kromozom bölgesine yakın konumlanarak homologu olan bölgelerle sinaps ya da kizma ilişkilerine girmeye çalışmaktadır (Resimler 28-30 ve idiogramları).

Tablodan izleneceği üzere 10,15 ve 20 inci gün kombinasyonlarında gözlenen izokromatid fragmanların dağılımı sırayla 0.5 mg/kg doz kombinasyonunda 1 (% 0.18), 6 (% 0.90) ve 2 (% 0.50); 1 mg/kg doz kombinasyonunda 1 (% 0.26), 3 (% 0.36) ve 8 (% 1.53); 2.5 mg/kg doz kombinasyonunda 3 (% 0.89), 0 (% 0.00), 6 (% 1.03); 5 mg/kg doz kombinasyonunda 5 (% 1.31), 3 (% 1.23) ve 4 (% 1.31); son olarak 10 mg/kg doz kombinasyonunda 3 (% 1.22), 5 (% 2.13) ve 0 (% 0.00) olmuştur (Şekil 8). Uygulanan iki yönlü varyans analizi sonucunda izokromatid fragman oluşumunun dozlar arasın farklı olmadığı ($p>0.05$), günler arasındaysa farkın bulunduğu anlaşılmıştır ($p<0.001$). Bir ve 2nci günler arasında ayrıca 10, 15, 20nci günler arasında farklılığın bulunmadığı ($p>0.05$) diğer bütün karşılaştırmalarda anlamlı farklılığın bulunduğu anlaşılmıştır ($p<0.01$).



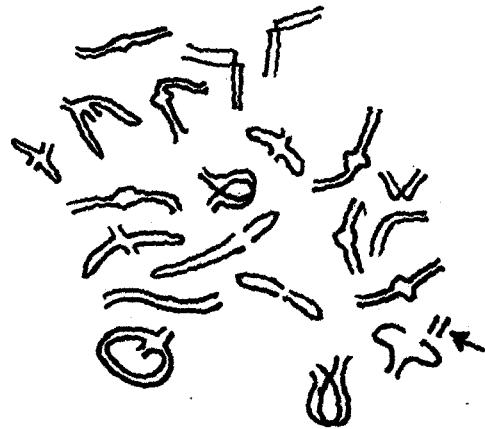
28.



29.



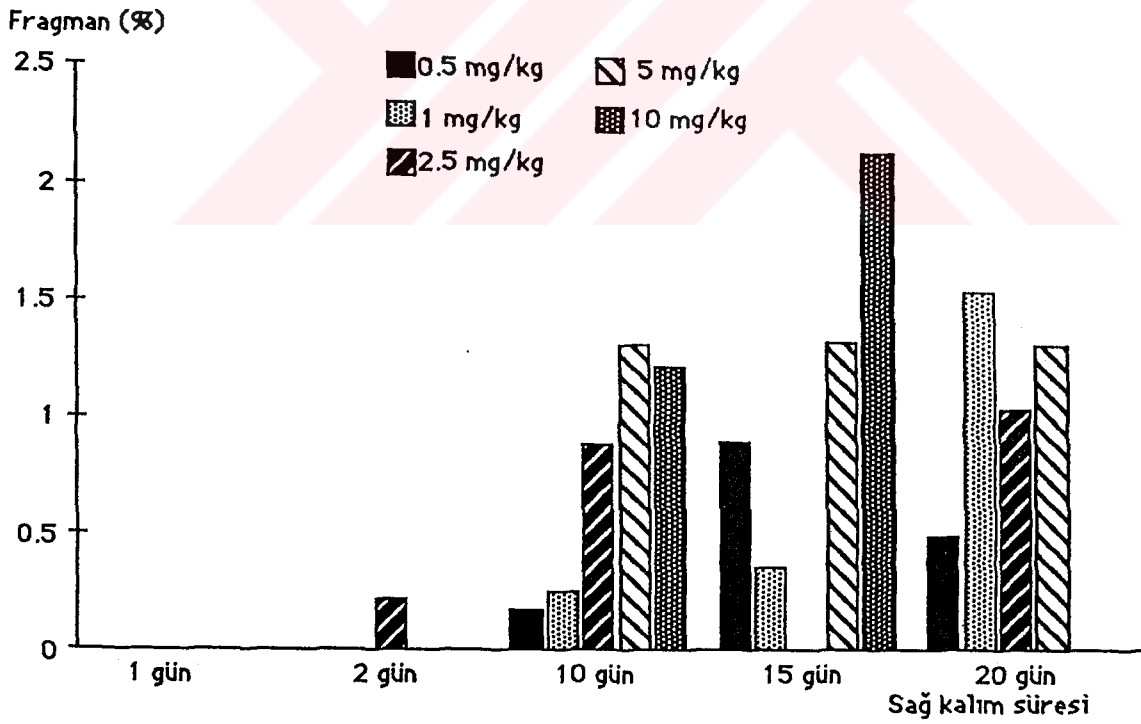
30.



Resimler 28 - 30. İzokromatid fragman içeren M I Plakları ve idiogramları. Giemsa x immerسیون.

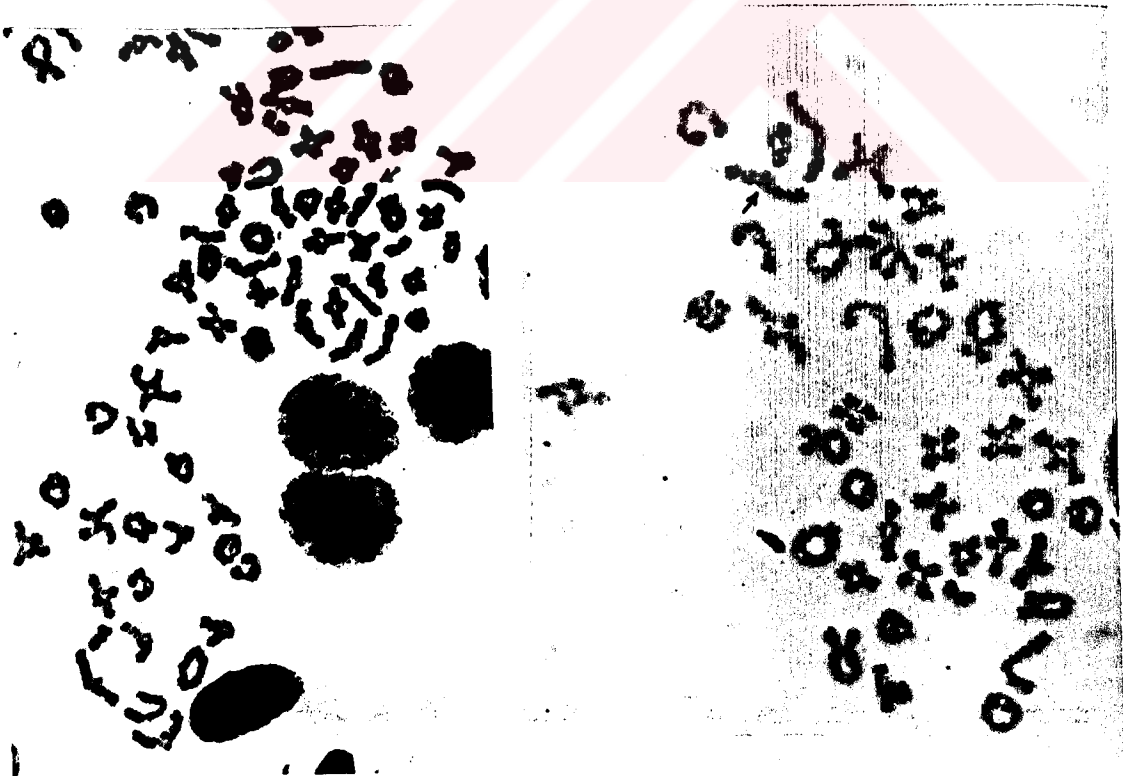
Tablo 4. Deney grubunda gözlenen izokromatik fragmanların doz-yaşatılma süresi kombinasyonlarına dağılımı.

DOZ mg/kg	1		2		YAŞATILMA SÜRESİ (gün)										
	ad.	%	S.E.	ad.	%	S.E.	10		15		20				
							ad.	%	S.E.	ad.	%	S.E.	ad.	%	S.E.
0.5	-	-	-	-	-	-	1	0.18	0.17	6	0.90	0.47	2	0.50	0.39
1	-	-	-	-	-	-	1	0.26	0.26	3	0.36	0.25	8	1.53	0.79
2.5	-	-	-	2	0.23	0.23	3	0.89	0.60	-	-	-	6	1.03	0.29
5	-	-	-	-	-	-	5	1.31	0.56	3	1.32	0.67	4	1.31	0.68
10	-	-	-	-	-	-	3	1.22	0.65	5	2.13	1.12	-	-	-



Şekil 8. Deney grubunda gözlenen izokromatik fragmanların doz-yaşatılma süresi kombinasyonlarına dağılım grafiği.

Diakinez- M I plaklarında gözlenen anomalileri topluca vermeden önce homologların yalnız tek kromatidlerini ya da bir kromatidin sadece belirli kesimini tutan eksik kiazmalardan söz edilmelidir. Resimler 31 ve 32 ile gösterilen plaklarda eksik kiazma yapan birer bivalan vardır. Bunlardan ilkinde homolog kromozomlar yalnız bir kollarıyla (Resim 31), ikincisinde birer kromatidlerinin distal bölgeleri ile kiazma yapmışlardır. Diğer kollar bivalan oluşumuna katılmamışlardır. Bivalanların kiazma yapmayan bölümlerinde daha önce gerçekleşen ve homolojiyi bozan bir sapmanın varlığı düşünülmüştür. Homolog olmayan kesimlerin büyüklüğüne rağmen kuadriyalan oluşmaması, çevrede fragman gözlenmemesi translokasyon olasılığını ortadan kaldırmıştır. Kiazma yapmayan bölgelerin büyüklüklerinin birbirine yakınlığı delesyon ya da duplikasyon olasılığını da ortadan kaldırmıştır.



Resimler 31 ve 32. İnversiyon nedeni ile yalnız birer kromatidlerinin telomerleri ile kiazma yapan bivalan içerikli M I plakları (eksik kiazmalı bivalanlar ok işareti ile gösterilmiştir). Giemsa x immersion

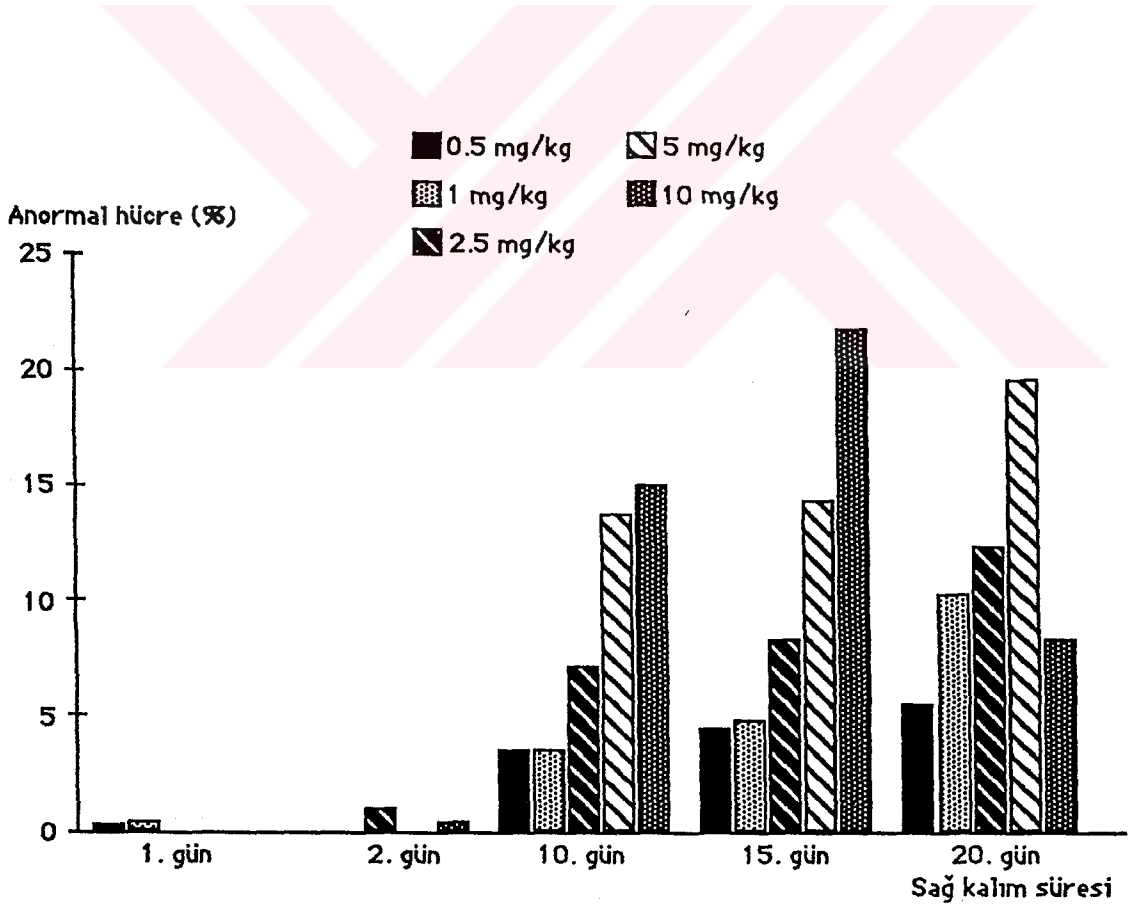
Böylece kiazma yapmayan bölgedeki tek kromozomda gerçekleşen bir kırılıp ters dönerek yapışma olasılığı düşünülmüştür. Bu tür bir olay, yani, inversiyon homolog kromatidlerden birindeki sekansı ters çevireceğinden sinaps ve kiazma mümkün olmayacaktır. Kontrol grubunda fragman yanı sıra böyle düzensizliklere rastlanmamıştır

Eksik kiazma yapan bivalan içerikli plaklar sayılarının azlığından dolayı anomalilerin topluca verildiği tablo ve grafikte değerlendirmeye alınmakla yetinilmiştir.

İncelenen diakinez-M I plaklarında kromozom bozukluğu içerenlerin doz- yaşatılma süresine dağılımları topluca 5inci tabloda verilmiştir. İlk gün preparatlarında 0.5 mg/kg dozla 1 (% 0.19) ve 1 mg/kg dozla 2 (% 0.41); 2nci gün preparatlarında ise 2.5 mg/kg dozla 3 (% 1.00) ve 10 mg/kg dozla 1 (% 0.23) anormal hücre bulunmuştur. Tablodan izleneceği üzere 10, 15 ve 20 nci gün kombinasyonlarındaki anormal hücrelerin dağılımı sayı ve yüzde olarak sırayla, 0.5 mg/kg dozla 26 (% 3.64), 33 (% 4.50) ve 36 (% 5.54); 1 mg/kg doz kombinasyonunda 29 (% 3.57), 39 (% 4.86) ve 54 (% 10.30); 2.5 mg/kg doz kombinasyonunda 38 (% 7.16, biri inversiyon % 0.10±0.10), 49 (% 8.35, biri inversiyon % 0.19±0.19), 39 (% 14.32) ve 43 (% 19.62); son olarak 10 mg/kg doz kombinasyonunda 35 (% 15.02), 45 (% 21.72) ve 8 (% 8.35) şeklinde bulunmuşlardır. Bu dağılım Şekil 9'daki grafikte verilmiştir. Uygulanan 2 yönlü varyans analizi sonucunda kromozom bozukluğu gösteren hücre oranı bakımından dozlar arasında ve günler arasında farklılığın bulunduğu saptanmıştır ($p < 0.001$). Günler sabit tutulduğunda dozlardan 0.5 mg ile 1 mg arasında ve 5 mg ile 10 mg arasında farklılığın bulunmadığı ($p < 0.05$), dozlar sabit tutulduğunda ise birinci ve ikinci günler arasında ayrıca onuncu ve onbeşinci günler arasında farklılığın bulunmadığı ($p < 0.05$) ve diğer bütün karşılaştırmalarda anlamlı farklılığın bulunduğu anlaşılmıştır ($p < 0.01$).

Tablo 6. Deney grubunda gözlenen anormal kromozom içerikli M I plâklarının doz-yaşatılma süresi kombinasyonlarına dağılımı.

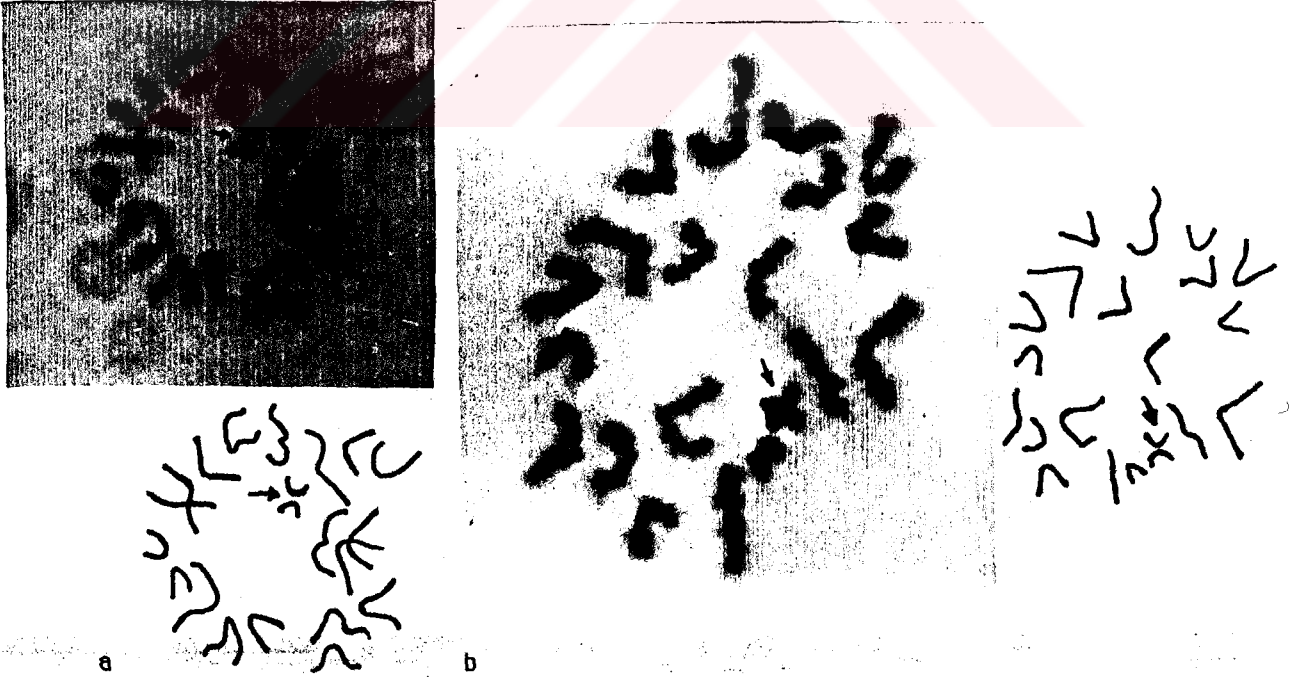
DOZ mg/kg	YAŞATILMA SÜRESİ (gün)														
	1			2			10			15			20		
	ad.	%	S.E.	ad.	%	S.E.	ad.	%	S.E.	ad.	%	S.E.	ad.	%	S.E.
0.5	1	0.19	0.19	-	-	-	26	3.64	0.44	33	4.50	0.66	36	5.5	0.59
1	2	0.41	0.41	-	-	-	29	3.57	0.88	39	4.06	1.09	54	10.3	0.94
2.5	-	-	-	3	1.00	0.72	38	7.16	0.56	49	8.35	0.32	70	12.4	1.26
5	-	-	-	-	-	-	46	13.0	2.57	39	14.3	2.57	43	19.6	3.29
10	-	-	-	1	0.23	0.23	35	15.0	2.46	45	21.7	2.80	8	0.4	2.01



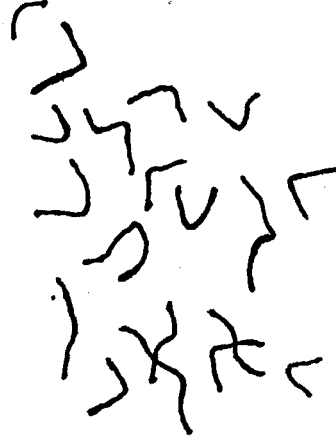
Şekil 9. Deney grubu preparatlarda gözlenen anormal M I plâklarının doz-yaşatılma süresi kombinasyonlarına dağılım grafiği.

Daha önce belirtildiği gibi ilacın etkisine bağlı kromozomal bozukluklar MII plaklarında ancak sayısal sapmalar şeklinde gözlenebilir. MII plakları değerlendirilirken sadece 20 kromozomlu plaklar normal sayılmış, 19 ve 21 kromozomlu plaklar dahil ötekilerin hepsi anormal kabul edilmiştir. Bununla beraber kromozom sayısı 19 dan az ve 21'den çok olan anöploid plaklar teknik nedenlere bağlanarak değerlendirmeye alınmamışlardır. MII plaklarındaki sayısal sapmalar kromozomlarda birinci meiotik bölünme sırasında var olan yapısal anomalilerin sonucu olup onların anafaz l'de normal segregasyon gösterememesinin ürünüdürler. Kromozomun sentromer bölgesindeki bozukluğun iğ ipliklerine bağlanmayı engellemesi alternatif mekanizma olarak düşünülmüştür.

Resimler 33 a ve b bunlardan 21 kromozomlu, resim 34 ise 19 kromozomlu MII plaklarını göstermektedirler.



Resim 33 a ve b. 21 kromozomlu bir M II plakları ve bunlardan hazırlanan idiogramlar. GiemsaXimmerstyon.



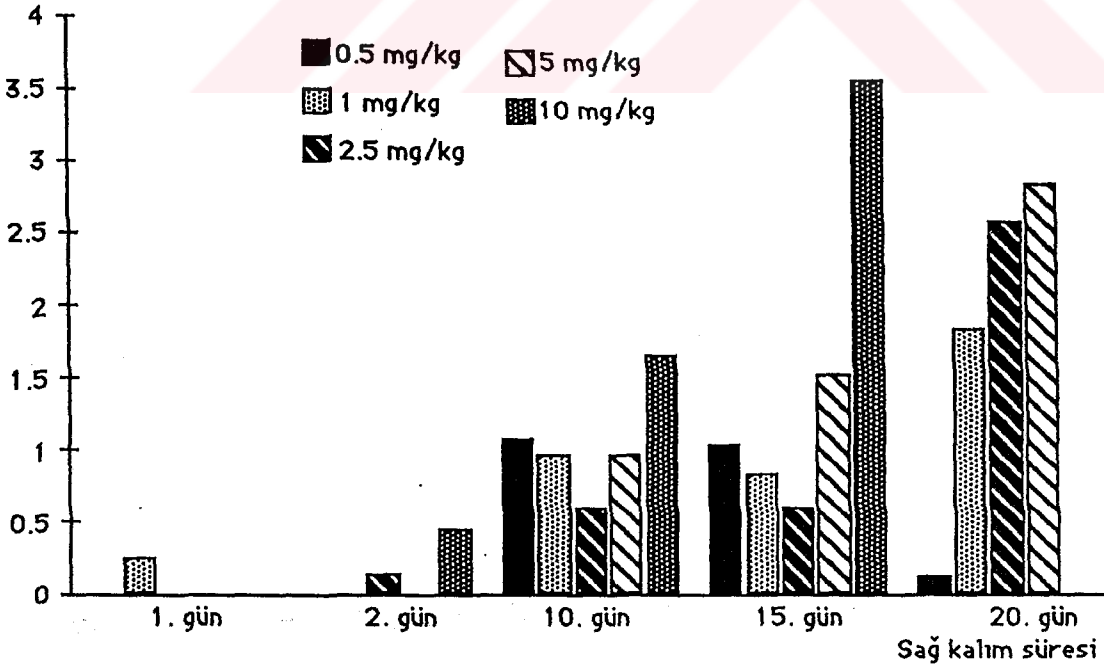
Resim 34.19 kromozumlu MII plâğı ve bundan hazırlanan idiogram.
Giemsa x Immersiyon.

Deney grubunda gözlenen sayısal kromozom anomalili MII plâklarının doz-yaşatılma süresi kombinasyonlarına dağılımı Tablo 7 ve Şekil 10 daki grafikte verilmiştir. İlk ve ikinci gün kombinasyonlarında 1 mg/kg-1 günle 1 (% 0.25), 2.5 mg/kg-2 günle 1 (% 0.15) ve 10 mg /kg-2 günle 1(% 0.46) sayısal sapma içeren MII plâğı oluşmuştur. Tablodan izleneceği üzere 10,15 ve 20nci gün kombinasyonlarında sırayla 0.5 mg/kg dozla 5(% 1.09), 6 (% 1.05) ve 1 (% 0.13); 1 mg/kg doz kombinasyonunda 4 (% 0.97), 4 (% 0.85) ve 9 (% 1.84); 2.5 mg/kg doz kombinasyonunda 2 (% 0.61), 2 (% 0.61), 11 (% 2.59); 5 mg/kg doz kombinasyonunda 3 (% 0.98), 3 (% 1.53) ve 6 (% 2.84); son olarak 10 mg/kg doz kombinasyonunda 4 (% 1.66), 5 (% 3.56) ve 0 (% 0.00) olmuştur. Bulgulara iki yönlü varyans analizi uygulandığında sayısal kromozom sapmalı MII oranları bakımından dozlar arasında farkın olmadığı ($p>0.05$) fakat günler arasında farklılığın bulunduğu anlaşılmıştır ($p<0.001$). Birinci gün ile ikinci ve yirminci günler arasında ayrıca 10,15 ve 20nci günler arasında fark bulunmamış ($p>0.05$), diğer bütün karşılaştırmalarda anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.05$).

Tablo 7.Sayısal kromozom sapması içeren M II plaklarının doz-yaşatılma süresi kombinasyonlarına dağılımı.

DOZ mg/kg	YAŞATILMA SÜRESİ (gün)														
	1			2			10			15			20		
ad.	%	S.E.	ad.	%	S.E.	ad.	%	S.E.	ad.	%	S.E.	ad.	%	S.E.	
0.5	-			-		5	1.09	0.47	6	1.05	0.53	1	0.13	0.13	
1	1	0.25	0.25	-		4	0.97	0.51	4	0.85	0.40	9	1.84	0.93	
2.5	-			1	0.15	0.15	2	0.61	0.46	2	0.61	0.46	11	2.59	0.91
5	-			-		3	0.98	0.53	3	1.53	0.93	6	2.84	1.18	
10	-			1	0.46	0.46	4	1.66	0.86	5	3.56	1.07			

21 ve 19 kromozomlu M II plakları (%)



Şekil 10.Sayısal kromozom sapması içeren M II plaklarının doz-yaşatılma süresi kombinasyonlarına dağılım grafiği.

5.TARTIŞMA

MC enjeksiyonu yapılan testisteki makroskopik değişiklikler, aşırı yağlanma ve atrofidir. İlacın dozundaki ve yaşatılma süresindeki artışa paralel olarak artan bu değişikliklerden ikincisi doza ve süreye bağlı olarak artan hücresel dejenerasyonla birlikte gelişmiştir.

MC'nin spermatogonyal hücreler üzerine kromozomal düzensizlik yapıcı etkisi doz-yaşatılma süresi kombinasyonlarından hiç birinde gösterilememiştir. Söz konusu mutajenik ajanın bu basamaktaki (PMM) hücrelerde spesifik nokta mutasyonlarını indükleyici etkisi (1) bilinmekle birlikte nokta mutasyonlarının ve birkaç geni tutacak ama hala mikro düzeydeki mutasyonların, kromozomların incelenmesiyle saptanması olanağı yoktur.

PMM plakları, kontrol grubundakiler dahil, bütün preparatlarda MI ve MII plaklarından daha düşük sayıda bulunduğundan, ilacın dozuyla hayvanın yaşatılma sürelerine göre bu plakların sayısındaki değişiklik belli bir kalıba sokulamamıştır. Sadece 2.5 mg/kg doz kombinasyonlarında PMM sayısı diğer kombinasyonlardakinden düşük çıkmıştır. Bunun nedenleri arasında, 2.5 mg/kg dozun diğer dozlardan daha kuvvetli etki göstermesi, bu dozun uygulandığı farelerin ötekilerden 2 hafta daha genç olmaları (araştırmada 10-12 haftalık fareler kullanılmıştır), mevsimsel farklılıklar ve bunlara bağlı hormonal değişiklikler gibi predispozan etkiler sayılabilir. Yine de kontrol grubundan bir preparatta ortalama 19.4 PMM saptanırken deney grubunda bu rakam ortalama 10.3 (2.5 mg/kg

kombinasyonları da eklenirse 9.2) bulunmuştur. Yani deney grubunda bir preparatta gözlenen PMM sayısı % 46.9 (ya da % 52.6) kadar azalmıştır. Azalma MC'nin hücrelere karşı letal etkisinden kaynaklanmıştır. Bulgu Adler (9) tarafından varılan sonuçlarla aynı doğrultudadır.

MC'nin primer ve sekonder spermatozoid kromozomları üzerine etkilerine geçmeden önce MI/MII oranları ele alınacaktır. Bu oran literatürde $35/15=2.33$ bildirilmiş, kontrol grubumuzda ise 2.18 çıkmıştır (3). Farklılık, fare soylarının ayrılığı kadar öteki teknik ayrıntılardan da kaynaklanmış olabilir. Oran deney kombinasyonlarında dozun yükseltilmesi ve yaşatılma süresinin uzatılmasına bağlı olarak ortalama 1.63 e düşmüştür (Tablo 1 ve Şekil 1). MI/MII oranındaki azalma ilacın primer spermatozoidler üzerine öldürücü etki yaptığını, etkinin MII plâğı düzeyinde kendini hissettirebilmesi için daha uzun süre gerektiğini, ayrıca bir kez enjeksiyonla verilen ilacın uzun süre etkin kalabildiğini gösterir. Literatür taramasında MC ya da başka bir mutajenin MI/MII oranına etkisini dökümente edecek bilgi elde edilememiş ve karşılaştırma yapılamamıştır.

Bilindiği gibi diakinez-MI, primer spermatozoidlerin meiotik bölünmeye başlarken geçirdikleri S döneminden 10-12 gün sonraya rastlar (35). Bu süre içerisinde S evresindeyken ilacın etkisinde kalan primer spermatozoidler zarar görmeyebilecekleri gibi, kromozomlarında çeşitli bozukluklar meydana gelebilir ya da sitotoksik etki yüzünden ölebilirler. İlaç verildikten sonra S evresine giren primer spermatozoidlerden gelişecek sekonder spermatozoidlerin ve dolayısıyla düzensizliklerin ortaya çıkması için gerekli süre 12 günü aşacaktır. O nedenle her iki basamaktaki metafaz plâkları azalmış fakat başlangıçta primer

spermatozoidlerin sekonder olanlara oranla daha çok azaldıkları gözlenmiştir. Nitekim MI/MII oranlarındaki düşüş ilk günlerde daha şiddetliyen, sonraki günlerde hücre sayıları sürekli azaldığı halde yavaşlamıştır.

MC'nin indüklediği kromozom düzensizlikleri MI plaklarında mültivalan, gonozomal ve otozomal ünivalanlar ile fragmanlar şeklinde klasifikasyon yapılarak araştırılmıştır.

MC'nin etkisi ile gelişen kromozom bozuklukları MI plaklarında enjeksiyonlardan 10 gün sonra görülmeye başlanmıştır (Tablo 2). Mültivalanlara yüzde oranları dikkate alınarak bakıldığında 10 mg/kg doz-20 gün dışındaki kombinasyonlarda dozun artırılması ve sürenin uzatılmasına bağlı artış gözlenmiştir. Aynı durum ünivalan yüzdeleri için de geçerlidir (Tablo 3). Hem mültivalan hem ünivalan yüzdeleri 10 mg/kg dozun 20 gün kombinasyonunda düşmüştür. Bu diğer doz-yaşatılma süresi kombinasyonlarındaki gelişmeye ters düşen, beklenmedik bir olaydır ki deneysel prosedürden ya da ilacın hücre-letal etkisi sonucu hücre sayısındaki azalmadan ileri gelmiş olabilir. Çünkü, 10 mg/kg-15 gün kombinasyonunda bir preparatta ortalama 21.5 hücre varken, aynı dozun 20 gün kombinasyonundaki preparatlarda bu rakam 9.4 olmuştur. Başka bir deyişle, bir preparattan incelenebilen MI plağı sayısı ortalama % 56.3 oranında azalmıştır. Bu azalma verilen dozdaki ilacın 20 gün içerisinde hücre ölümüne yol açacak kromozomal ya da hücresel bozuklukları indüklemesinden kaynaklanmıştır. İlacın etkinliğinin bitmesi de ileri sürülebilir, ne var ki diğer dozlarda etki devam ederken en yüksek doz için böyle bir düşüncüyü desteklemek mümkün olmamıştır.

MC'nin indüklediği translokasyonlarda transpoze olan parçaların küçüklüğünden dolayı mültivalan oluşmaması, ayrıca ilaçtan etkilenen heterokromatindeki homolog olmayan sinapslar ve tüm kol değişimleri yüzünden fark edilmeleri oldukça zordur (1). Bundan dolayı ilaç verilen farelerde primer spermatosit kromozomlarındaki translokasyonların gözlenenlerden daha fazla sayıda olabilecekleri tahmin edilmiştir. İnversiyon yüzünden eksik kiazma içerikli bivalanların çok düşük oranda bulunmaları da aynı nedene bağlanmıştır (1).

Ünivalanların büyük bölümünü XY çiftinin (gonozomal ünivalanlar) otozomal olanların çoğunu ise küçük kromozom çiftlerinin meydana getirdikleri anlaşılmıştır. Bu gözlem psödootozomal bölgeyle en küçük otozomal çiftlerin kırılma ve yeni düzenlenmelere elverişli olduklarını ayrıca bu kromozomlardaki yeni düzenlenmelerin sinaps ve kiazma oluşumunu engellediklerini düşündürmüştür. Ötekiler gibi hem bu kromozomlarda hem psödootozomal bölgede sinaps ve kiazma için homoloji çok önemlidir. Çünkü M1 plaklarındaki ünivalanlar, tıpkı mültivalanlar gibi translokasyon, düplikasyon, inversiyon ve benzeri morfolojik düzensizliklerin bivalanlar arasındaki homolojiyi bozmasıyla ortaya çıkarlar (66).

Deney grubunda fragman içeren plaklar beklenenden daha az gözlenmiştir (% 0.18 ile 2.13 arasında fragman oluşmuştur). Ayrıca ne dozun ne de hayvanın yaşatılma süresinin uzatılmasının düzenli bir fragman artışına yol açtığı belirlenebilmiştir. Bunun nedeni büyük olasılıkla kırılan parçaların eski yerlerine yapışmış ya da yeni düzenlenmelere katılmış olmalarıdır. Mültivalan ve ünivalanların artışı bunu desteklemektedir. Fragmanların çok küçük olmaları nedeni ile gözden

kaçmaları ya da artefaktlarla karıştırılmaları elbette gözden ırak tutulamaz. Açık ki kromozom kırıkları MC etkisinin değerlendirilmesinde parametre değildir.

M I plaklarında şimdiye kadar sözü edilen kromozom bozukluklarının hepsi de kromozom kırılmalarına yani MC'nin klastrojenik etkisine belgedir. Bu etkinin düzeyini daha iyi anlamak için ortaya çıkan sapmaları topluca incelemek gerekir (Tablo 6). Deney materyalinin doz-gün kombinasyonlarında toplam anomali yüzdelerinin doza ve süreye bağlı olarak arttıkları, 10 mg/kg-20 gün kombinasyonunda daha önce sözü edilen azalma ve gerçek anomali oranının gözlenenden daha yüksek olabileceği dikkate alınarak MC'nin primer spermatozoidlerden en az ortalama % 3.64 ile 21.72 kadarında kromozomal bozukluklara yol açtığı söylenebilir. Literatür taramasıyla MC'nin ne testis içine doğrudan enjeksiyonla verildiğinde ne de uyguladığımız doz ve sürelerde M I ve M II kromozomları üzerine etkilerini dökümente edecek bilgi sağlanamamış ve karşılaştırma yapılamamıştır.

Sayısal kromozom sapması bulunan M II plakları da diğer anormal metafaz plakları gibi 1 ve 2 gün kombinasyonlarında çok düşük sayılarda gözlenmiş (Tablo 7), enjeksiyondan 10 gün sonra anlamlı biçimde yükselme başlamıştır. Bununla beraber enjeksiyondan 10 ve 15 gün sonra beklenenin tersine doza yahut süreye bağlı düzenli bir artış saptanamamış sadece 10 mg/kg-20 gün kombinasyonunda 19 ya da 21 kromozumlu anöploid M II plaklarına rastlanmamıştır. Anöploid plakların varlığı istatistiksel düzeyde anlamlı karşılanırken 0.5 mg/kg-20 gün kombinasyonundaki düşüklük primer spermatozoidlerdeki morfolojik kromozom bozukluklarının M II plaklarına sayısal anomali şeklinde henüz

yansımadığını düşündürmüştür. Buna karşılık 1, 2.5 ve 5 mg/kg-20 gün kombinasyonlarında, daha kısa sürelerle göre daha yüksek oranda anormal MII görülmüştür. Şimdiye kadarki bulgular iki olasılığı akla getirmiştir. Birincisi, doz-süre kombinasyonlarına bağlı sayısal kromozom sapmalı MII plağı oranlarının düzenli artışa ulaşması için farelerin daha uzun yaşatılması gerekmektedir ki böylesine bir beklenti atrofi yüzünden özellikle yüksek dozlar için gerçekleşmeyebilir. İkincisi, spermatogonyal kromozomlarda oluşan spesifik nokta mutasyonlarıyla primer spermatozoidlerde meydana gelen bazı kromozom düzensizliklerinin MII ye ulaşmadan letal etki yaratmasıdır ki elbet sonraki hücre bölünmelerinde görülmeyecektir. O yüzden 19 ve 21 kromozumlu MII plağı sayılarının preparatlarda gözlenme sıklığı doz ya da süreye bağlı kalmamaktadır. Denilebilir ki değişiklik sürüp gidecektir. Aynı preparattaki 19 ve 21 kromozumlu MII plağı sayılarının birbirine denk düşmemesi tekniğin de bir değişken olduğunu ortaya koymaya yeter.

Adler (1) pre-meiotik basamaklarda ve diakinez öncesinde doğal bir germinatif seleksiyonun varlığını ileri sürmektedir. Buna göre normal erkek farelerde anormal spermatogonya ve primer spermatozoidler diakinez öncesinde elimine olmaktadır. Germinatif seleksiyondan sonraki basamaklarda gözlenen ve MC'nin etkisiyle oluşan kromozom bozukluklarını içeren hücrelerin fertilizasyona katılma şansları da gözden uzak tutulamaz. Bundan dolayı anormal sekonder spermatozoidlerin hepsinin spermatozoona dönüşmeyi ve fertilizasyona katılmayı başardıkları kabul edilirse 10 mg/kg dışındaki dozların uygulandığı farelerde 10 ve 20nci günler arasındaki sürede kromozom sapması içeren zigot yaratma riskinin % 0.13 ile 2.84 arasında olacağı öngörülmüştür. Daha önce açıklandığı üzere MII kromozomlarındaki ne mikro ne de makro düzeydeki yapısal

düzensizlikleri sitogenetik yöntemle saptamak mümkün olmadığından bu minimal bir değerdir. Tüm anomalilerin belirlenmesi halinde öngörülen riskin yükseleceği açıktır.



6.SONUÇ

Burada sunulan çalışmanın amaçlarından biri testis kanalcıklarında bulunan spermatogonyal hücrelerle meiotik I ve II metafaz plaklarından yararlanarak fare karyotipiyle idiogramını hazırlamaktır. Takdir edileceği üzere, sunulan fotoğraf, karyotip ve idiogramlardan bu amaca ulaşılmıştır.

Çalışmanın bir başka amacı ise doğrudan testis içerisine bir kez enjeksiyonla verilecek değişik dozlardaki Mitomisin-C'nin çeşitli gelişme basamaklarındaki germinal hücrelerin kromozomları üzerine etkilerinin araştırılmasıdır. Bu amaç için 5 ayrı doz ve 5 ayrı yaşatılma süresi ile oluşturulan farklı 25 kombinasyon karşılaştırmalı olarak hem makroskopik hem sitogenetik düzeylerde incelenmiştir.

Bulgular Mitomisin-C'nin

a) Sitotoksik etki sonucu gelişen hücresel dejenerasyondan kaynaklanan, doza ve süreye bağlı testis atrofisine,

b) Letal etkiyle spermatogonyal hücrelerle birinci ve ikinci meiotik metafaz plaklarında azalmaya,

c) MI/MII oranlarında düşmeye, yani sitotoksitenin öncelikle daha çok primer spermatositlerde belirmesine,

d)Primer spermatozoidlerde kromozom kırıklarına, yeni düzenlenmelerin ve sonuçta mültivalan, ünivalan, fragman ve eksik kiazmaların oluşumlarına,

e)Primer spermatozoidlerdeki yeni düzenlenmeler yüzünden birinci anafazda kromozomların ayrılmasına, dolayısıyla, 19 ve 21 kromozumlu anöploid MII plaklarının ortaya çıkmasına yol açtığı belirlenmiştir.

Bu bulguların ışığında doğrudan testis içerisine enjekte edilecek MC'nin albino erkek farelerde reproduksiyonu ortalama % 0.13 ile 2.84 arasında olumsuz yönde etkileme riski yaratabileceğine karar verilmiştir.

7.ÖZET

Bu çalışmada klastojenik özelliği bilinen ve antikansorejen olarak kullanılan Mitomisin-C'nin fare germinatif doku hücrelerine etkileri araştırılmıştır.

Bu amaçla 250 tane normal, sağlıklı, erkek, İsviçre soyu albino fare kullanılmıştır. Standart yemle beslenen hayvanların sol testislerine, Mitomisin-C'nin serum fizyolojik çözeltisi 0.5, 1, 2.5, 5, 10 mg/kg dozlarda enjekte edilmiştir. Aynı hayvanların sağ testislerine serum fizyolojik enjeksiyonu yapılmış ve bunlar kontrol grubu olarak kullanılmışlardır. Ayrıca 15 farenin iki testisine birden serum fizyolojik enjeksiyonu yapılarak kontrol materyalinin sayısı 280 testise çıkarılmıştır.

Mitotik ve meiotik kromozom analizleri için enjeksiyondan 1, 2, 10, 15 ve 20 gün sonra hayvanlar öldürülerek spermatogonyum ile primer ve sekonder spermatositleri birlikte içeren preparatlar hazırlanıp Giemsa boyası ile boyanmış ve immersiyon büyütmesi ile incelenmiştir. İlacın etkisini belirlemek üzere metafaz I/metafaz II (MI/MII) oranı, pre-meiotik mitoz, primer ve sekonder meiotik metafaz plaklarındaki kromozomların yapı ve sayılarına bakılmıştır.

Mitomisin-C'nin sitotoksik etkisiyle testisler küçülmüş, MI/MII oranı düşmüş, spermatogonyal hücrelerle primer ve sekonder spermatositlerin sayısında azalma gözlenmiştir. Spermatogonyal

hücrelerde herhangi kromozom düzensizliğine rastlanmamış, fakat primer ve sekonder spermatozoidlerde, Mitomisin-C enjeksiyonunu izleyen ilk iki gün hariç, sonraki günlerde yapısal kromozom düzensizlikleri gözlenmiştir. Enjeksiyondan 10,15 ve 20 gün sonra hazırlanan preparatlarda sırasıyla primer spermatozoidlerin % 6.75, 7.25 ve 8.46 kadarının en az bir kromozomal düzensizlik çeşidi içerdiği saptanmıştır. Sekonder spermatozoidlerde aynı günlerde sırasıyla % 0.16, 1.10 ve 1.90 oranlarında sayısal kromozom sapması bulunmuştur. MI plaklarındaki düzensizlikler mültivalan, otozomal ve gonozomal ünivalan, izokromatik fragman şeklinde, MII plaklarındakilerse 19 ve 21 anöplid kromozom sayısı şeklinde ortaya çıkmıştır.

Sonuç olarak Mitomisin-C, pre-meiotik basamaklarda ve diakinez öncesinde gelişecek germinal seleksiyon sonrasında gözlenen kromozom kırılmalarına, yenisıyzenlenmelere ve sayısal sapmalara neden olmaktadır. Bunların reprodüktif ürünleri % 0.13-2.84 oranında etkileyeceği öngörölmüş, o yüzden ilacın daha ileri araştırmalarının yapılmasının yararlı olacağı sonucuna varılmıştır.

**INVESTIGATIONS OF MITOMYCIN-C ON MEIOTIC
CHROMOSOMES AFTER DIRECT INJECTION
INTO TESTICLES OF MALE ALBINO SWISS MICE**

B. SUMMARY

In this work effects of Mitomycin-C, an antibiotic with proven clastogenic and anticancerous features, on germinal cells of the mice were investigated. For this purpose 250 normal healthy male mice of Swiss albino stock were used.

Animals were fed with standard diet and kept in optimal conditions. Mitomycine-C dissolved in physiological salt solution was injected to the left testicle, directly, in doses 0.5, 1, 2.5, 5 and 10 mg/kg body weight. To the other testicle of same animal physiological salt solution was administered and they served as control. Besides, 15 other mice served as controls after being given only salt solution to both testicles, thus rising controls to 280 testicles. Animals were killed on 1st, 2nd, 10th, 15th and 20th days following administration of the drug to study mitotic and meiotic chromosomes. Slides were so prepared as to contain both spermatogonia and primary and secondary spermatocytes. They were stained with standard Giemsa solution. In order to investigate the effects of the agent ratio of metaphase I and metaphase II plaques (MI/MII), pre-meiotic mitoses, and primary and secondary meiotic metaphases were assessed with respect to the number and shape of the chromosomes under immersion objective.

It has been found that testicles were reduced in size, MI/MII ratio was decreased, and the number of spermatogonia as well as primary and secondary spermatocytes were reduced due to the action of Mitomycin-C. While no chromosome abnormality was so far revealed in spermatogonial cells, primary and secondary spermatocytes, with the exception of those obtained from animals sacrificed within the first two days, showed structural aberrations. In those preparations obtained 10, 15 and 20 days later following treatment it was found that there was at least one abnormality in primary spermatocytes with the rates 6.75, 7.25 and 8.46 percent, respectively. Secondary spermatocytes similarly presented numerical abnormalities with the rates 0.16, 1.10 and 1.90 percent, respectively. It has also been observed that meiosis I exhibited multivalent, autosomal and gonosomal univalents and isochromatide fragments whereas MII plaques had 19 and 21 chromosome number.

It has been concluded that Mitomycin-C leads to the chromosomal breaks, rearrangements and numerical deviations observed after germinal selection that occurred in pre-meiotic stages and prior to diakinesis. It was then estimated that these would lead to abnormalities in 0.13-2.84 percent of the offspring of treated animals. Further studies including molecular ones would reveal other types of mutations undetected by this techniques were stressed.

9.KAYNAKLAR

- 1-Adler,I.D.: Comparative cytogenetic study after treatment of mouse spermatogonia with mitomycin-C. *Mutation Research*. 23:369-379,1974.
- 2-Adler,I.D.: Abberation induction by mitomycin-C in early primary spermatocytes of mice. *Mutation Research*. 35 : 247-256,1976.
- 3-Adler,I.D.: Cytogenetic tests in mammals. In: Venitt, S., Parry, J.M., **Mutogenicity Testing a Practical Approach**. Oxford, IRL Press, pp: 275 - 305, 1984.
- 4-Adler, I.D., Ohannison,R., Winking,H. :The influence of the Robertsonian translocation Rb (X.2) 2Ad on anaphase I non-disjunction in male laboratory mice. *Genetic Research*. 53: 77-86, 1989.
- 5-Adler, I.D., el Tarras, A.: Clastogenetic effects of cis -diamminedichloroplatinum. II. Induction of chorosomal aberrations in primary spermatocytes and spermatogonial stem cells of mice. *Mutation Research*. 243:173-178,1990.
- 6-Aghamohammadi, S.Z., Savage, J.R.: A BrdU method for SCE., *Mutation Research*., 216: 259-266,1989.
- 7-Allen,J.W., DeWeese,G.K., Gibson, J.B.,Moses, M.J.,Poorman, P.A. : Synaptonemal complex damage as a measure of chemical mutagen effects on mammalian germ cells. *Mutation Research*.,19:19-24,1987.
- 8-Ashley,T.:G-band pozition effects on meiotic synapsis and crossing over.*Genetics*.118:307-317,1988.
- 9-Ashworth,L., Brandriff,B., Carrano,A., Gordon,L., Watchmaker,G., Wyrobek,A.:Chromosomal abnormalities in human sperm:comparisons among four healty men. *Human Genetics*. 66:193-201,1984.
- 10-Ashworth,K.L., Brandriff,B., Carrano,A., Gordon,L., Moore,D., Watchmaker,G., Wyrobek, A.J.: Chromosomes of human sperm: Variability among normal individuals. *Human Genetics*. 70:18-24,1985.

- 11-Ashworth,K.L., Brandriff,B., Carrano,A., Gordon,L., Haendel,S.: The chromosomal constitution of human sperm selected for motility. *Fertility and Sterility*. 46: 680-690,1986.
- 12-Ashworth,K.L., Brandriff,B., Carrano,A., Gordon,L., Littman,V., Watchmaker,G.: Cytogenetics of human sperm: Meiotic segregation in two translocation carriers. *American Journal of Human Genetics*. 38:197-208,1986.
- 13-Beerman,F., Bartles,I., Franke,U., Hansmann,I.: Chromosome segregation at meiosis I in female T(2;4) 1 Gö/+mice:No evidenc for decreased crossover frequency with maternal age. *Chromosoma* . 95:1-7,1987.
- 14-Benet,J., Egozcue,j., Genesca,A., Navarro, J., Templado, C.: G-banding of human sperm chromosomes. *Human Genetics*.73:181-182,1986.
- 15-Bordjadze,V.K.,Prokofieva Belgowskaya,A.A: Pachitene analysis of human acrosentric chromosomes. *Cytogenetics*. 10:38-39,1971.
- 16-Burgoyne,P.S.:Sex chromosoms:Mammalian X and Y crossover. *Nature*. 319:258-259,1986.
- 17-Cera,C., Crothers, D.M.,Danishefsky,S.J., Egbertson.M., Teng, S.P.: DNA cross-linking by intermediates in the mitomycin activation cascade. *Biochemistry*. 28: 5665-5669, 1989.
- 18-Chandley,A.C., Edmond,P.: Meiotic studies on a subfertile patient with a ring Y chromosome. *Cytogenetics*. 10:295-304,1971.
- 19-Chandley,A.C., Christie, S., Fletcher,J., Frackiewics,A., Jacobs, A.P.: Translocation heterozigocity and associated subfertility in man. *Cytogenetics*. 11:516-533,1972.
- 20-Collins,C., Covey, J.M., Dusre,L.,Sinha,B.K.: DNA damage, cytotoxicity and free radical formation by mitomycin C in human cells. *Chem. Biol. Interact*. 71:63-78,1989
- 21-Cook,M.J.:*"The anatomy of the Laboratory Mouse"* Viscera. 4 th.ed.,London. Academic Press., pp:74-76,1980.

- 22-Crothers,D.M., Teng,S.P., Woodson,S.A.: DNA sequence specificity of mitomycin cross-linking. **Biochemistry**.28:3901-3907,1989.
- 23-Daskal,Y.,Crooke,S.T.:Morfological effects of mitomycin C on cellular fine structure.,In: Carter,S.K.,Crooke,S.T.:**Mitomycin C Current Status and New Developments**. 1 st. ed. New York, Academic Press, pp: 41-60,1979.
- 24-Eriñç,Z: **Özel Histoloji (Mikroskopik Anatomi)**. Ankara, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi yayınları no:161-163. s:228-259,1963.
- 25-Evans,E.P., Breckon,G.,Ford,C.E.:An air drying method for meiotic preparations from mammalian testes. **Cytogenetics**.3:289-294,1964.
- 26-Fiscor,G.,Ginsberg,L.C.:The effect of hydroxyurea and mitomycin C on sperm motility in mice. **Mutation Research**.7:383-387,1980.
- 27-Ford,C.E.,Evans,E.P.: A reciprocal translocation in the mouse between the X chromosome and a short autosome.**Cytogenetics**. 3:295-305,1964.
- 28-Goldin,A.,Schein,P.S.:Preclinical studies with mitomycin C and derivatives.In:Ogawa, M.: **Mitomycin C, Current impact on Cancer Chemotherapy**. **Excerpta Medica**, Amsterdam. pp:1-17,1982
- 29-Goldstein,L.S.:Dominant lethal mutations in mouse spermatogonia by mechlorethamine,procarbazine and vincristine administrated in 2-drug and 3-drug combinations.**Mutation Research**.191:171-176,1987.
- 30-Hotta,Y., Ito,M., Stern,H.: Synthesis of DNA during meiosis. **Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.** 56: 1184-1191,1966.
- 31-Hotta,Y.,Stern,H.:Analysis of DNA synthesis during meiotic prophase in *Lilium*. **J Mol Biol.**,55:337-355,1971.
- 32-Howell,S.H., Stern,H.:The appearance of DNA breakage and repair activities in the synchronous meiotic cycle of *Lilium*., **J. Mol. Biol.**, 55:357-378,1971.
- 33-Hulten,M.: Chiasma disturbance at diakinesis in the normal human male.**Hereditas**.76:55-78,1974.

34-Hulten,M.A., Saadallah,N., Wallace,B.M.N., Creasy,M.R.: Meiotic studies in man. In: **Human Cytogenetics: a practical approach**, Ed:Rooney,D.E., Czepulowsky, B.H.,Oxford. IRL. Press., pp:163-165,1986.

35-Huttner,K.M.,Rudle,F.H.:Study of mitomycin C-induced chromosomal exchange. **Chromosoma**.56:1-13,1976.

36-Jenderny,J.,Rhörborn,G.:Chromosome analysis of human sperm.I.First results with a modified method. **Human Genetics**. 76:385-388,1987.

37-Kayaalp,S.O.: **Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji**. 5. Baskı.Ankara.,Ulucanlar matbaası,1:1008-1009,1989.

38-Knobf,M.K.T., Fischer,D.S., Welch-McCaffrey,D.: Delivery of cancer chemotherapy, In: **Cancer Chemosthrapy**, Boston, G.K. Hall Medical Publishers,pp:76-77,1984.

39-Kofman-Alfaro,S., Chandley,A.C.: Meiosis in the male mouse.An autoradiographic investigation. **Chromosoma**.31:404-420,1970.

40-Koulisher,L., Schoysman,R.: Chromosomes and human infertility.I. Meiotic and meiotic chromosome studies in 202 consecutive male patients. **Clinical Genetics**. 5:116-126,1974.

41-Luciani,J.M., Morazzani,M.R., Sthal,A.: Identification of pachytene bivalents in human male meiosis using G-banding technique. **Chromosoma**. 52:275-282,1975.

42-Luciani,J.M., Guichaoua,M.R., Morazzani,M.R.: Complete pachytene chromomere karyotypes of human spermatocytes. **Human Genetics**. 66:267-271,1984.

43:Lyon,M.F., Searle,A.G., Ford,C.E., Ohno,S.: A mouse translocation suppresing sex-linked variegation. **Cytogenetics**.3:306-323,1964.

44-Manyak,A., Schleiermacher,E.: Action of mitomycin C on mouse spermatogonia. **Mutation Research**.19:99-108,1973.

45-Martin,R.H.: Sperm chromosome analysis in a man heterozygous for a paracentric inversion of chromosome 7(q11q22). **Human**

Genetics.73:97-100,1986.

46-Martin,R.H.: Analysis of human sperm chromosome complements from a male heterozygous for a reciprocal translocation t(11;22) (q23;q11). **Clinical Genetics.** 25:357-361,1984.

47-McIlree,E.M.: Chromosome studies on testicular cells from 50 subfertile men. **The Lancet.**,1:69-71,1966.

48-McIlree,E.M.:Studies on human meiotic chromosomes from testicular tissue. **The Lancet.**,1:679-682,1966.

49-Meistrich,M.L., Göhde,W., White,A., Logtin,J.L.: Citogenetic studies of spermatids of mice carrying Cattanach's translocation by flow cytometry. **Chromosoma.** 74:141-151,1979.

50-Meredith,R.:A simple method for preparing meiotic chromosomes from mammalian testis. **Chromosoma.** 26:254-258,1969.

51-Michelmann, R.L.H.W., Paufler,S.K.: Meioseuntersuchungen bei rind, schaf, ziege und schwein im stadium der späten prophase und metaphase **J.Vet.Med.A.** 34:81-89,1987.

52-Murthy,D.K., Subramanyam,S.: Induction of meiotic chromosomal aberrations by sulphaguanidine. **Cytobios.** 44:41-48,1985.

53-Pachierotti,F., Russo,A., Metalli,P.: Meiotic dis-junction induced by fission neutrons relative to X-rays observed in mouse secondary spermatocytes. II. Dose-effect relationships after treatment of pachitene cells. **Mutation Research.**176:233-241,1987.

54-Pearson,P.L., Ellis,J.D., Evans,H.J.: A gross reduction in chiasma formation during meiotic prophase and a defective DNA repair mechanism associated with a case of human male infertility. **Cytogenetics** .9:460-467,1970.

55-Polani,P.E., Jagiello,G.M.: Chiasmata, meiotic univalents, and age in relation to aneuploid imbalance in mice. **Cytogenet Cell Genet** . 61:505-529,1976.

56-Rouyer,F., Simmler,M.C., Johnson,C., Vergnaud,G., Cooke,H.J.,

Weissenbach,J.: A gradient of sex linkage in pseudoautosomal region of the human sex chromosomes. **Nature**. 319:291-296,1986.

57-Rudak,E., Jacobs,P.A., Yanagimachi,R.: Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. **Nature**. 274: 911-913,1978.

58-Sasaki,Y.F., Imanishi,H., Ohta,T., Shirasu,Y.: Modifying effects of components of plant essence on the induction of sister-chromatid exchanges in cultured chinese hamster ovary cells. **Mutation Research**.226:103-110,1989.

59-Sawyer,J.R., Moore,M.M., Hozier,J.C.: High resolution G-banded chromosomes of the mouse . **Chromosoma**. 95:350-358,1987.

60-Sora,S.: Effect of some DNA ligands and of some mutagenic compounds on the induction of meiotic disomic or diploid yeast products. **Environmental Mutagenesis**.7:121-128,1985.

61-Stock,A.D., Burnham,D.B., Hsu,T.C.: Giemsa banding of meiotic chromosomes with description of a procedure for cytological preparations from solid tissues. **Cytogenetics**.11:534-539,1972.

62-Subramanyan,S., Laxminarayana,D., Beaula,K.D.: Evaluation of genotoxic potential of vincristine from multiple parameter. **Mutation Research**.138:55-62,1984.

63-Switonski,M., Gustavsson,I., Höjer,K., Plöen,L.: Synaptonemal complex analysis of the B-chromosomes in spermatocytes of the silver fox (*Vulpes fulvus* Desm). **Cytogenet Cell Genet**.45:84-92,1982.

64-Şaylı,B.S.:**Temel Medikal Genetik**.4 üncü baskı.Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi yayınları,no.430, Ankara. Yargıçoğlu matbaası,s:159,1982.

65-Templado,C., Marina,S., Coll,M.D., Egozcue,J.:Meiotic studies in human semen. **Human Genetics**. 53: 335-339,1980.

66-Templado,C. Vidal,F., Marina,S., Pomerol,J.M., Egozcue,J.:A new meiotic mutation: desynapsis of individual bivalents. **Human Genetics**.95:345-348,1981.

67-Templado,C., Vidal,F., Navarro,J., Egozcue,J.: Improved technique for the study of meiosis in ejaculate:results of the first 50 consecutive cases. *Human Genetics*. 72:275-277,1986.

68-Welshons,W.J.,Gibson,B.H.,Scandlyn,B.J.:Slide proccesing for the exemination of male mammalian meiotic chromosomes. *Stain Tecnology*.37:1-5,1962.

69-White,B.J., Crandall,C., Raveche,E.S., Tijo,J.H.: Laboratory mice carrying three pairs of Robertsonian translocations: establishment of a strain and analysis of meiotic segregation. *Cytogenet Cell Genet*. 21:113-138,1978.

70-Van Der Linden, A.G.J.M., Pearsen,P.L., Van De Kamp,J.J.P.: Cytological assesment of meiotik exchange in a human male with a pericentric inversion of chromosome no 4. *Cytogenet Cell Genet*14:126-139,1975.

2- 0.5 mg/kg doz - 2 gün kombinasyonu

Fare No	Metafaz Tipi	İncelemeyen	İncelenen	Multivalan	Ünivalan	Fragman	Diğer	MII 19	MI/MII 21	Toplam	
1	MI	2	58			0	0			60	
	MII	2	26					0	0	2.14	28
	PMM	7	7							14	
2	MI	48	118	0	0	0	0			166	
	MII	29	74					0	0	1.61	103
	PMM	7	10							17	
3	MI	9	67	0	0	0	0			76	
	MII	18	26					0	0	1.73	44
	PMM	7	4							11	
4	MI	0	25	0	0	0	0			25	
	MII	0	11					0	0	2.27	11
	PMM	6	2							8	
5	MI	7	94	0	0	1	0			101	
	MII	4	54					0	0	1.74	58
	PMM	0	3							3	
6	MI	22	122	0	0	0	0			144	
	MII	61	17					0	0	1.85	78
	PMM	0	3							3	
7	MI	54	122	0	0	0	0			176	
	MII	14	98					0	0	1.57	112
	PMM	6	6							12	
8	MI	16	50	0	0	0	0			66	
	MII	2	29					0	0	2.13	31
	PMM	0	4							4	
9	MI	23	100	0	0	0	0			123	
	MII	7	57					0	0	1.92	64
	PMM	1	8							9	
10	MI	33	59	0	0	0	0			92	
	MII	16	32					0	0	1.92	48
	PMM	1	1							2	

24- 10 mg/kg doz-15 gün kombinasyonu

Fare tipi	Metafaz nemeyen	İncele-	İncelenen	Multivalan gon.	Ünivalan oto.	Fragman	Diğer	MII	MI/MII	Toplam no
						19	21			
1	M I	0	9	0	1	1	1	0		9
	M II	1	12					0	1	0.69
	PMM	3	0							3
2	M I	0	28	1	1	1	1	0		28
	M II	0	19					1	1	1.47
	PMM	2	1							3
3	M I	0	25	1	1	4	1	0		25
	M II	3	13					0	1	1.56
	PMM	4	6							10
4	M I	0	21	1	1	1	0	0		21
	M II	2	30					0	0	0.66
	PMM	2	2							4
5	M I	8	32	3	3	4	0	0		40
	M II	13	13					1	0	1.54
	PMM	0	13							13
6	M I	0	38	2	1	3	2	0		38
	M II	9	20					0	2	1.31
	PMM	9	3							12
7	M I	21	11	1	0	2	0	0		32
	M II	20	4					0	0	1.33
	PMM	3	3							6
8	M I	2	11	1	2	0	0	0		13
	M II	4	3					0	0	1.86
	PMM	10	2							12
9	M I	0	23	0	1	1	0	0		23
	M II	1	16					0	0	1.35
	PMM	3	8							11
10	M I	0	17	0	0	2	0	0		17
	M II	1	10					1	0	1.55
	PMM	0	2							2

25- 10 mg/kg doz-20 Gün kombinasyonu

Fare tipi	Metafaz nemeyen	İnceleme- İncelenen	Multivalan		Ünivalan		Fragman Diğer		MII	MI/II	Toplam no
			gon.	oto.	19	21					
1	MI	0	13	1	0	0	0	0	0 0	1.18	13
	MII	5	6								11
	PMM	1	0								1
2	MI	1	18	1	0	0	0	0	0 0	1.19	19
	MII	16	1								17
	PMM	0	6								6
3	MI	5	12	0	1	0	0	0	0 0	1.13	17
	MII	13	2								15
	PMM	3	5								8
4	MI	0	7	1	0	0	0	0	0 0	1.17	7
	MII	2	4								6
	PMM	5	7								12
5	MI	9	7	0	0	1	0	0	0 0	0.94	16
	MII	8	9								17
	PMM	1	5								6
6	MI	10	4	0	0	0	0	0	0 0	1.4	14
	MII	7	3								10
	PMM	2	0								2
7	MI	8	5	0	0	0	0	0	0 0	0.93	13
	MII	8	6								14
	PMM	3	1								4
8	MI	0	9	0	1	0	0	0	0 0	1.13	9
	MII	2	6								8
	PMM	1	2								3
9	MI	1	12	1	1	0	0	0	0 0	1.08	13
	MII	3	9								12
	PMM	0	1								1
10	MI	2	7	0	0	0	0	0	0 0	1.29	9
	MII	0	7								7
	PMM	0	1								1

