

**ANTİMİTOTİK OLDUĞU DÜŞÜNÜLEN  
BAZI KİMYASALLARIN  
RETİKÜLOENDOTELİAL SİSTEM (RES)  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**MUSTAFA UYANOĞLU**  
Yüksek Lisans Tezi /

**Biyoloji Anabilim Dalı**  
**HAZİRAN - 1997**

.....Mustafa UYANOĞLU.....' nun .....Yüksek Lisans..... tezi olarak hazırladığı  
....."Antimitotik..... Olduğu..... Düşünülen..... Bazı..... Kimyasalların  
...Retiküloendotelial... Sistem... (RES)... Üzerine... Etkileri"..... başlıklı tez  
03.07.1997... tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Lisansüstü Öğretim  
Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Üye (Tez Danışmanı) : Yrd. Doç. Dr. Melih Zengin

Üye : Prof. Dr. Ahmet ÖZAT

Üye : Yrd. Doç. Dr. Emre Aral

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'  
nun 04.07.1997 tarih ve 11/8 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ersan PÜTÜN  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Müdürü

**ÖZET**  
**Yüksek Lisans Tezi**

**ANTİMİTOTİK OLDUĞU DÜŞÜNÜLEN BAZI KİMYASALLARIN  
RETİKÜLOENDOTELİAL SİSTEM (RES) ÜZERİNE ETKİLERİ**

**MUSTAFA UYANOĞLU**

**Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Yard. Doç. Dr. Melih ZEYTİNOĞLU**  
**1997, Sayfa 53**

Günümüzde mitozu durdurucu etkisi bilinen pek çok kimyasal maddenin bulunduğu ve bu maddelerden çoğunun kanser kemoterapisinde yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir. Ancak doğal ya da yapay bir çok kimyasal bileşiğin antimitotik etkisinin bilinmesine karşın, etki mekanizmaları hakkında oldukça az bilgiye rastlanılmaktadır. Böylece, antimitotik olabileceği düşünülerek, formül yapısından yola çıkılarak yapay olarak sentez edilmiş T2, T3, T4, T5 ve T7 kodlu maddeler çalışmamızın kimyasal deney materyalini oluşturmuştur. Literatür çalışması yapıldığında, antimitotik olduğu bilinen kimyasal bir bileşen model alınarak sentetik yolla elde edilmiş olan *Bis tetrathiafulvalene* türevlerinin de mitotik inhibitör etkili olabileceği düşünülen ancak bu maddelerle ilgili olarak günümüze kadar herhangi bir biyolojik çalışmaya rastlanılmamıştır. Yaşam boyu mitotik aktivite gösteren hücreleri bulduran retiküloendotelial sistem (RES)'deki bazı dokular üzerine etkilerini araştırdığımız bu kimyasalların, *in vivo* olarak test edilmesine yönelik olan çalışmamızda kullandığımız test materyallerinin, olası etkilerini görebilmek amacıyla kan, kemik iliği ve dalak dokuları incelenmiş ve bu konuda bir test yöntemi geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla hazırlanan preparatlar üzerinde yapılan mikroskobik incelemeler sonucunda test edilen kimyasal maddelerin hedef dokular üzerindeki antimitotik etkileri, hem kontrol grupları hem de T kodlu kimyasal maddelerin test edildikleri deney grupları aralarında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bunun sonucunda, test edilmiş olan kimyasal maddelerden bazılarının antimitotik etkili olabildiği tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** RES, kan, kemik iliği, dalak, antimitotik maddeler, *Bis tetrathiafulvalene* türevleri

**ABSTRACT**  
**Master of Science Thesis**

**THE EFFECTS OF SOME CHEMICAL AGENTS WHICH MAY HAS  
ANTIMITOTIC EFFECTS ON RETICULOENDOTHELIAL SYSTEM (RES)**

**MUSTAFA UYANOĞLU**

**Anadolu University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Biology Program**

**Supervisor: Asst. Prof. Melih ZEYTİNOĞLU  
1997, Page 53**

In this days, there are a few chemicals knows as a mitosis inhibitors and so a few of this chemicals are widespread uses in cancer chemotherapy. The natural or artificial few chemicals knows as a mitosis inhibitors but the information of the effects mechanisms are very little. So according to molecule structure of antimitotic chemicals T2, T3, T4, T5 and T7 were maked artificially. According to one chemicals which knows as an inhibitor of mitosis coaled *Bis tetrathiafulvalene* but today there are no any biologic study about its effects. The activity of reticuloendothelial system (RES) in some tissues for life makes it more advantage to use or examination the chemicals will be antimitotic *in vivo* in our materials, to investigate the effects of this chemicals, bone marrow, spleen tissue were examined. Additionally, in this subject were tired to use a new method. For this aim the results of the investigation of this tissue preparats under microscopy shows that the chemicals antimitotic effects on target tissue on control group and T coded chemicals were evaluated. Resulting of test chemicals may be antimitotic.

**Key Word: RES, blood, bone marrow, spleen, antimitotic agents, *Bis tetrathiafulvalene***

## TEŞEKKÜR

Öncelikle, akademik bilgi ve tecrübe birikimi ile tezimin oluşmasında büyük katkıları bulunan değerli danışman hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Melih ZEYTİNOĞLU'na teşekkürlerimi sunmaktan büyük gurur duyuyorum.

Çalışmalarım sırasında, sağladıkları laboratuvar imkanları ve göstermiş oldukları manevi desteklerinden dolayı başta Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Merih KIVAÇ, Sayın Prof. Dr. Ahmet ÖZATA, Sayın Yard. Doç. Dr. Hülya ZEYTİNOĞLU olmak üzere, tüm Moleküler Biyoloji çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, engin bilgileriyle çalışmalarına ışık tutan Osmangazi Üni. Tıp Fak. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim elemanlarından Sayın Yard. Doç. Dr. Erinç ARAL' ve hiç bir koşulda esirgemedikleri yardımlarından dolayı Arş. Gör. Murat ERÇAKIR ile Arş. Gör. Ayla EKER'e en içten teşekkürlerimi iletirim.

Deneysel çalışmalarımda her türlü yardımı sağlayarak bana destek olan kıymetli laboratuvar arkadaşlarım, Arş. Gör. Seval KORKMAZ, Biyolog Gökhan BAYRAMOĞLU ve Biyolog Kamil SALEH TAMİMİ başta olmak üzere Anadolu ve Osmangazi Üni. Fen Fakülteleri Biyoloji Bölümlerindeki tüm dost ve arkadaşlarıma da teşekkürlerimi borç bilirim.

Tüm yaşamımda olduğu gibi, tezimin oluşması sırasında da maddi ve manevi her türlü yardımı ve hoşgörüyü göstererek, en büyük yardımı sağlayan çok değerli aileme sonsuz şükran ve teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

### Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Antimitotik Maddeler ve Etki Mekanizmaları.....	4
1.2. Antimitotik Maddelerin Önemi.....	10
1.3. Antimitotik Olduğu Düşünülen Kimyasal Maddeler.....	10
2. MATERYAL ve METOD.....	13
2.1. Deney Hayvanları.....	13
2.2. Deneklerde Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	13
2.3. Kimyasal Maddelerin Enjeksiyonu.....	14
2.4. Diseksiyon ve Doku Örneklerinin Alınması.....	14
2.4.1. Kan örneklerinin alınması.....	14
2.4.2. Dalak örneklerinin alınması.....	15
2.4.3. Kemik iliği örneklerinin alınması.....	15
2.5. Mikropreparatların Hazırlanması.....	15
2.5.1. Kan preparatlarının hazırlanması.....	15
2.5.2. Kemik iliği preparatlarının hazırlanması.....	16
2.5.3. Dalak preparatlarının hazırlanması.....	16
2.5.3.1. Dalak örneklerinin takibi.....	17

## İÇİNDEKİLER (DEVAM)

2.5.3.2. Kesit alma.....	17
2.5.3.3. Boyama.....	17
i. Harris Alum Hematoksilin boyasının hazırlanması.....	18
ii.Eosin boyasının hazırlanması.....	18
2.5.3.4. Dalak kesitlerinin boyanması.....	18
2.6. Mikroskopi ve Fotografi.....	18
3. BULGULAR.....	20
3.1. Kan Dokusu.....	20
3.1.1. Periferik kan parametreleri.....	20
3.1.1.1. Kontrol grubu hayvanların kan parametreleri.....	20
3.1.1.2. Deney grubu hayvanların kan parametreleri.....	23
3.1.2. Periferik kan hücrelerinin morfolojisi.....	23
3.1.2.1. Lökosit hücrelerin morfolojisi.....	23
3.1.2.2. Eritrosit hücrelerinin morfolojisi.....	25
3.2. Miyeloid Doku (Kemik İliği).....	27
3.2.1. Kontrol grubu hayvanların miyeloid dokuları.....	27
3.2.2. Deney grubu hayvanların miyeloid dokuları.....	28
3.3. Dalak Morfolojisi.....	29
3.3.1. Kontrol grubu hayvanların dalak morfolojisi.....	29
3.3.2. Deney grubu hayvanların dalak morfolojisi.....	31
4. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	43
5. KAYNAKLAR.....	49

## ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Antimitotik etki gösteren bazı kimyasal maddeler ve etkili oldukları özgün bölgeler (Kayaalp, 1989)	7
1.2. Bilinen bazı antimitotik maddeler ve türevleri	8
1.2. (Devam) Bilinen bazı antimitotik maddeler ve türevleri	9
1.3. <i>Bis tetrathiafulvalene</i> türevlerinin açık formülleri	12
3.1. Kontrol grubu hayvanlarına ait kan sayımlarını gösteren grafik	21
3.2. Deney grubu hayvanlarına ait kan sayımlarını gösteren grafik	22
3.3. Fizyolojik su uygulanmış negatif kontrol grubu hayvanlarına ait değişik doku ve organ preparatlarının görünüşleri	35
3.4. DMSO uygulanmış kontrol grubu hayvanlarına ait değişik doku ve organ preparatlarının görünüşleri	36
3.5. Kolşisin uygulanmış kontrol grubu hayvanlarına ait değişik doku ve organ preparatlarının görünüşleri	37
3.6. T2 kimyasal maddesi uygulanmış deney grubu hayvanlarına ait değişik doku ve organ preparatlarının görünüşleri	38
3.7. T3 kimyasal maddesi uygulanmış deney grubu hayvanlarına ait değişik doku ve organ preparatlarının görünüşleri	39
3.8. T4 kimyasal maddesi uygulanmış deney grubu hayvanlarına ait değişik doku ve organ preparatlarının görünüşleri	40
3.9. T5 kimyasal maddesi uygulanmış deney grubu hayvanlarına ait değişik doku ve organ preparatlarının görünüşleri	41
3.10. T4 kimyasal maddesi uygulanmış deney grubu hayvanlarına ait değişik doku ve organ preparatlarının görünüşleri	42



## ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. 1993 yılında ABD' de gözlenen kanser sıklığı, çeşitleri ve ölüm oranları (Alberts ve arkadaşları (1994)' den değiştirilerek alınmıştır)	3
3.1. Kontrol grubu hayvanlarına ait kan parametreleri	21
3.2. Deney grubu hayvanlarına ait kan parametreleri	22

## 1. GİRİŞ

Canlı organizmalarda mitoz olayı, canlının zigot evresinden ölümüne kadar süregelen en önemli hücre bölünmelerinden birisidir. Bir ya da çok hücreli tüm canlı organizmaların üreme ve büyümelerinin, kendilerini oluşturan hücrelerin çoğalma ve büyümeleriyle mümkün olabileceği bilinmektedir [1]. Genel olarak mitoz bölünme, organizmayı oluşturan hem normal hem de transform hücrelerde gözlenen bir çoğalma şekli olarak gösterilmektedir. “ Hücre siklusu” ya da “hücre döngüsü” olarak belirtilen mitoz bölünme, sinir ve retina hücresi gibi özelleşmiş bazı hücrelerde görülmez iken, deri, kemik iliği, epitel hücreleri ve daha pek çok hücre tipinde sıklıkla görüldüğü açıklanmaktadır [2]. Hücre döngüsünde, hazırlık ve mitotik evre olmak üzere iki evrenin yer aldığı belirtilmektedir. Hazırlık evresinde ATP sentezinin, ribozom ve diğer organellerin hızla çoğaltılarak artırıldığı G<sub>1</sub> fazı; DNA replikasyonunun olduğu S fazı ve özelleşmiş proteinlerin sentez edildikleri G<sub>2</sub> fazından oluşan üç aşamanın mevcut olduğu bilinmektedir. Bu aşamaları geçiren bir hücrenin, mitoz bölünme sürecine girdiği bildirilmiştir. Mitoz bölünme “profaz”, “metafaz”, “anafaz” ve “telofaz” şeklinde birbirini takip eden, biyokimyasal gelişmelerin meydana geldiği bir süreç olarak tanımlanmıştır [3]. Mitoz bölünmenin profaz aşamasında, nukleus membranı kaybolurken, kromozomu oluşturan kromatid çiftlerinin belirginleştiği ve kutup bölgelerine yerleşen sentrioller arasında, karşılıklı olarak iğ fibrillerinin uzandıkları belirtilmektedir. Metafazda, iki katına çıkarılan kromozomların, hücrenin ekvator düzleminde dağınık olarak dizildikleri ve kromozomal iğ iplikçiklerinin, kromozomları oluşturan kromatidlere sıkıca bağlandıkları açıklanmaktadır. Anafazda, mikrotübül yapısında olan kromozomal iğ iplikçiklerinin, bağlanmış oldukları kromatidleri ayrı kutuplara çektiği bildirilmektedir. Parker [4] tarafından telofazda, iğ iplikçiklerini oluşturan mikrotübüllerin depolimerize oldukları saptanmıştır. Farklı kutuplarda yoğunlaşan kromatidlerin, “kromozom” adını alarak nukleus membranı ile kuşatılarak “karyokinez” adı verilen çekirdek bölünmesinin tamamlanmış olduğu ve hemen arkasından “sitokinez” adı verilen sitoplazma bölünmesinin gerçekleştiği bildirilmiştir. Sitoplazma bölünmesinin, aktin mikrofilamentleri aracılığı ile gerçekleştiği

bilinmektedir. Ozban'a [5] göre mikrofilamentler, hücre sitoplazmasının ortadan boğumlanarak iki kısma ayrılmasını sağlamaktadırlar. Sitokinezde aktin mikrofilamentlerinin önemi olduğu kadar, karyokinezde de mikrotübüllerin önemli olduğu açıktır. Hücre içinde nukleus etrafından sitoplazmaya doğru radyal olarak uzanan mikrotübüller,  $\alpha$  ve  $\beta$  tubulin proteinlerinin polimerleşmesiyle oluşurlar [6, 7]. Hücre şeklinin korunması, hücre içi hareketlerin sağlanması ve mitotik iğ iplikçiklerinin yapısını oluşturması gibi temel görevleri olan mikrotübüller, özgün antimitotik maddelere karşı duyarlılık gösterirler. Özgün antimitotik maddelerin etkisiyle, tubulin polimerleşmesinin engellenmesi ya da mikrotübüllerin depolimerizasyonun stimüle edilmesiyle, mitoz bölünme engellenebilmektedir. Aktin proteinlerinin polimerizasyonu ile meydana gelen aktin mikrofilamentlerinin, hücre sitoplazmasına dağılmış olarak buldukları açıklanmıştır. Aktin mikrofilamentleri de mikrotübüller gibi özgün antimitotik maddelerden etkilenerek depolimerize olabilmekte ve sitoplazma bölünmesi bloke edilebilmektedir. Hücrede, karyokinez meydana gelirken sitokinezin bu şekilde engellenmesinin, hücrede nukleus sayısının artmasıyla sonuçlanabileceği belirtilmektedir [5, 8].

Araştırmacılar, hücreleri mitoze iten pek çok faktör olduğu konusunda birleşmektedirler. Bunlardan, sitoplazma / nukleus oranının artması ve hücrenin, hacim / yüzey oranının bozulması, en çok sözü edilen mitotik faktörler olarak bilinmektedir [2]. Radyasyon, yüksek basınç, mutajenik faktörler, pH değişimleri, sıcaklık, hücre içi ve dışı kimyasal uyarıcılar gibi daha pek çok etkinin de hücreyi mitoze ittiği bildirilmiştir [9]. Hücrelerin, sürekli olarak gelişip mitoz ile çoğalmalarına karşın, mitozun kontrol altında tutulması, canlı organizma aktivitesi açısından son derece önemlidir. Mitoz bölünmenin kontrol dışına çıkmasının ise, organizma için önemli problemlere yol açabileceği bildirilmektedir. Günümüzün çözülememiş problemi olan kanser hastalıkları, bu problemin en önemli örneği olarak gösterilmektedir. Kansere neden olan pek çok faktörden söz edilmektedir. Bunlar, günlük yaşamda sık sık karşılaşılan fiziksel ve kimyasal faktörlerdir. Ayrıca, onkogenik DNA ve RNA virüslerinin de kanser etkenleri olduğu ortaya konmuştur. Kanser etkeni olarak belirtilen kimyasal faktörler çoğunlukla polisiklik ve heterosiklik aromatik hidrokarbon bileşikleri, aromatik amin ve amidler, doğal, bitkisel ve mikrobiyal kökenli kimyasal ürünler ve tüm bu kimyasal

bileşiklerin türevleri olarak belirtilmektedir [10]. . Günlük yaşamda sıklıkla karşılaşılan başlıca kimyasal kanserojenlere temizlik maddeleri, deterjanlar, alkol, sigara, hava kirliliği, besinlerde bulunan kimyasal maddeler ve boyalar örnek olarak gösterilmektedir. Kansere yol açan fiziksel faktörlerden başlıcaları ise radyasyon, uv ışınları, stres, beslenme ve ortam koşulları olarak belirtilmektedir. Örnek olarak gösterilen tüm kanserojen faktörlerin ilk hedeflerinin hücre DNA' sı olduğu belirtilmektedir. Normal bir hücrenin DNA' sında çeşitli nedenlerle meydana gelebilecek mutasyonlar, DNA' nın, kontrol mekanizması dışına çıkarak, hücrenin anormal bölünme davranışı göstermesine neden olabilmektedir. Günümüzde, bu yolla oluşmuş ve klinik teşhisi yapılmış olan çok sayıda kanser türünün olduğu bilinmektedir. Kanserin çeşitliliği yanında, meydana getirdiği ölüm olaylarının, diğer nedenlerin oluşturduğu ölüm olaylarına oranla, çok daha yüksek olduğu açıklanmaktadır. Alberts ve arkadaşları [11] tarafından kanser kaynaklı ölüm oranları araştırılarak istatistiksel sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. 1993 yılında ABD.'de gözlenen kanser sıklığı, çeşitleri ve ölüm oranları  
(Alberts ve arkadaşları (1994)' den değiştirilerek alınmıştır)

KANSER TİPİ	YILLIK YENİ OLGULAR (%)	YILLIK ÖLÜM ORANI (%)
TOPLAM KANSERLİLER	(sayıca) 1.170.000	(sayıca) 528.300
Epitel kanserleri (karsinomalar)	85	79
Oral yol ve farinks	03	01
Sindirim organları (toplam)	20	23
Kolon ve rektum	13	11
Pankreas	02	05
Mide	02	03
Karaciğer ve safra yolları	01	02
Solunum sistemi (toplam)	16	29
Akciğer	15	28
Göğüs	16	09
Deri (toplam)	-	02
Malignant melenoma	03	01
Üreme sistemi	21	11
Prostat	14	07
Ovaryum	02	03
Uterus girişi	01	01
Uterus (endometriyum)	03	01
Üriner organlar	07	04
Mesane	04	02
Hemopoietik ve immün sistem	08	09
Merkezi sinir sistemi ve göz	02	02
Bağ dokusu (kas ve damar)	01	01
Diğer	05	08

Canlı dokularındaki tek bir hücrenin normalden daha hızlı mitoz geçirerek aşırı çoğalması, kanserin başlangıcı kabul edilmektedir. Bu nedenle kanser hastalıklarının erken teşhisinde, tedavi amaçlı olarak, kontrolsüz bölünmeye başlayan ve “neoplastik hücre” adı verilen hücrelerin inaktive edilmesinde “antineoplastik” ilaçlar kullanılmaktadır. Ancak, antimitotik etkili bu ilaçların kullanımı da kısıtlı olmaktadır. Çünkü antimitotik maddeler, kanserli hücrelerin mitozunu durdurmakla birlikte, organizmada normal bölünme periyodu gösteren hücrelerin çoğalmalarını da olumsuz yönde etkilemektedirler. Tedavi amaçlı olarak kullanılan bu antimitotik ilaçlar, örneğin spermatogenez ve oogenezin inhibe olması, endokrin sistem bozukluklarının başlaması, gebelerde düşüklerin meydana gelmesi, embriyonel gelişme aksaklıklarının ortaya çıkması gibi pek çok yan etkilere neden olabilmektedirler. Ayrıca antimitotik maddelerin lenfotoksik ve immünosupresyonik etkili oldukları da bilinmektedir. Kayaalp [12] tarafından mitotik inhibitörlerin, mitozun sürekli olduğu lenfoid dokulardaki (dalak, kemik iliği, lenf düğümleri, timus, tonsillalar) germinatif hücrelerin çoğalmalarını durdurarak hücrel ve humoral immunitiyi bloke ettikleri bildirilmiştir. Yapılan araştırmalar ile bazı antimitotik ajanların lenfotoksik etkileri ortaya konulmaya çalışılmıştır [13, 14]. Bu nedenle antimitotik kimyasalların kanser kemoterapisinde kullanılmasında, yukarıda belirtilen dezavantajlarının da göz önünde tutulması gerekmektedir. Kanser tedavisi için uygulanacak mitotik inhibitörlerin, kanser türüne göre dikkatli seçilip uygulanması gerekmektedir. Bu amaca yönelik olarak yapılan çalışmalar, günümüzde daha çok antimitotik sitimülatörlerin çalışma prensipleri ve etki mekanizmaları üzerinde yoğunluk kazanmıştır.

### **1.1. Antimitotik Maddeler ve Etki Mekanizmaları**

Bir çok kimyasal maddenin, canlıya ve onu oluşturan hücreler üzerine etkileri bilinmektedir. Ayrıca, farklı kimyasal organizasyona sahip maddelerin, canlılar üzerindeki etki mekanizmaları farklı ya da benzer olabilmektedir. Bu çeşit etkiler, “antimitotik” olarak tanımlanan kimyasal maddeler için de söz konusu olmuştur [14]. Antimitotik kimyasalların canlılardaki, mitozu durdurucu sonuçları benzer olmasına rağmen, etkilerinde farklı mekanizmalar rol oynayabilmektedir. Herhangi bir kimyasal

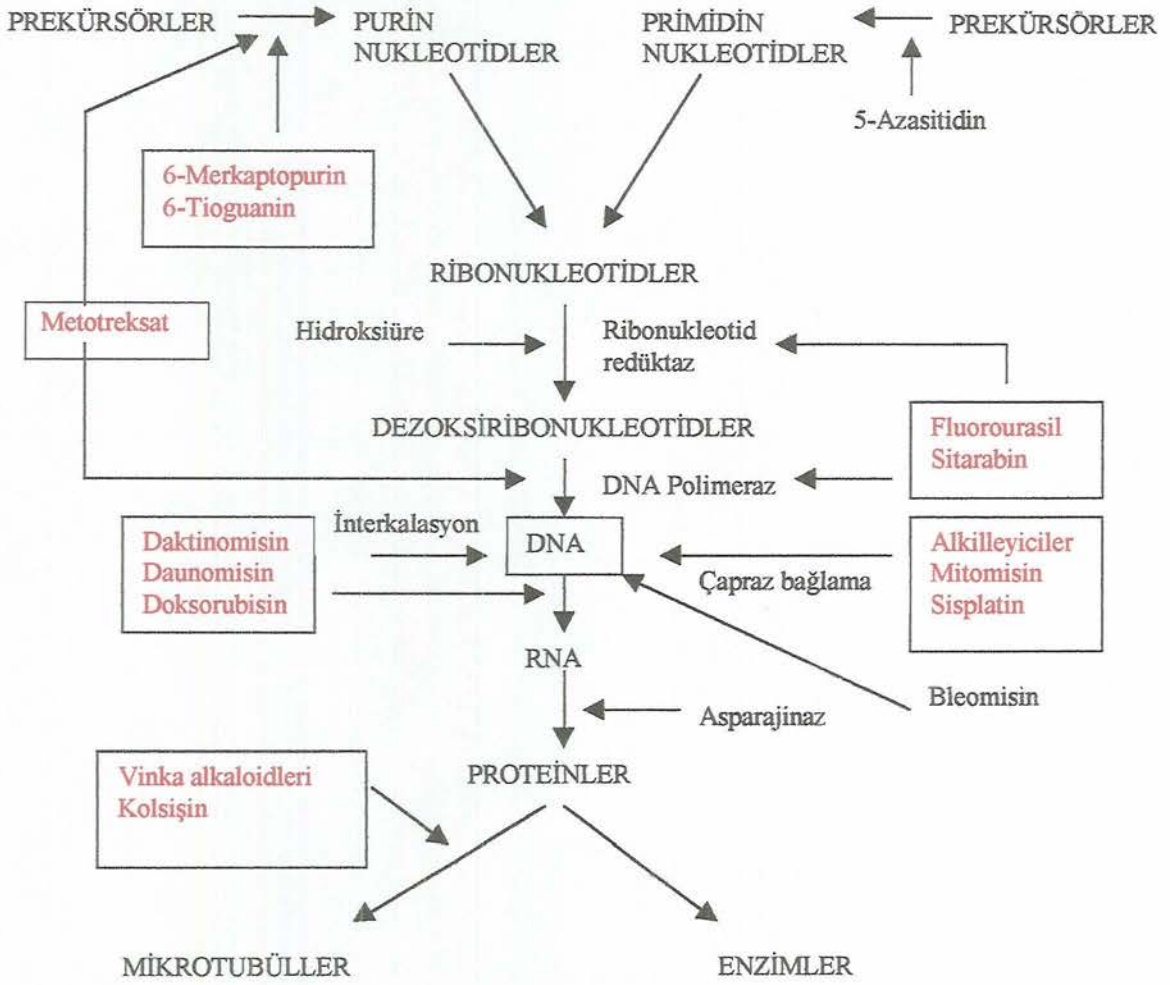
maddenin etki mekanizması ya da etki derecesinin, *in vivo* ve *in vitro* koşullarda farklı sonuçlar verebileceği bildirilmiştir [15]. Mitotik inhibitörün hücrede nereye bağlandığı, hangi biyokimyasal olayları stimüle ya da inhibe ettiği, etkinliğini ne şekilde gösterdiği gibi soruların cevaplarını ortaya çıkaracak ve etki mekanizmalarını açıklamaya yönelik olacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bilinen antimitotik maddelerin çoğu doğal yoldan sentez edilmiş kimyasallardır. Bunlar içinde, günümüzde en çok kullanılan “*kolşisin*” ve “*nokodazol*” olarak adlandırılan antimitotik maddelerinin, hücre iskeletinin bir üyesi olan mikrotübül formasyonunu inhibe ederek etki gösterdiği bilinmektedir [16-18]. Hücre içi proteinleri üzerine etkili olan antimitotik maddelerin, çoğunlukla aktin ve mikrotübül yapıları üzerinde etki gösterdiği de bilinmektedir. Aktin üzerine etkili olan *sitokalsin*, hücrede aktin proteinine bağlanarak ve glukoz tansportunu engelleyerek aktin polimerleşmesini önlemektedir [5, 19]. *Podofilotoksin* bileşiğinin ise tubulin heterodimer yapılımasını değiştirerek etkili olduğu belirtilmiştir [6]. Mitoz bölünmenin metafaz safhasında, kromozomları kutuplara çeken iğ iplikçiklerinin yapısını oluşturan mikrotübüllerin, bu şekilde inhibisyonu sonucunda, hücrenin mitoz geçirmesi engellenmiş olmaktadır [5]. Bu şekilde, hücrede tubulin monomerlerinin polimerleşmesi engellendiğinden, hücre stoplazmasında artan, tubulin protein sentezinin Feed-back ile baskılandığı da bildirilmiştir [20]. *Podofilotoksin* ile “*vinka alkaloidler*” olarak bilinen *vinblastin* ve *vinkristin*’ in etki mekanizmalarının da *kolşisin*’ in etki mekanizmasına benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Ancak mikrotübüller üzerine etkili olan *vinblastin* ve *vinkristin* antimitotik maddelerinin, mikrotübülleri stabilize ederek etkili oldukları açıklanmaktadır [21]. *Vinka alkaloidleri*’ nin, tubulin proteinlerine bağlanarak ya da transform hücrelerin membranlarındaki büyüme faktörlerini inhibe ederek, hücre bölünmesini bloke ettikleri belirtilmiştir [22]. “*Taksol*” adı verilen bir diğer antimitotik maddenin ise mikrotübül dimerlerinin birbirleri ile birleşmesine engel olarak, mikrotübül sentezini inhibe ettiği ortaya konmuştur [8, 16]. Bu sebep ile tubulin sentezi baskılanmadığı halde mikrotübül dimerlerinin miktarları hücre stoplazması içinde artış göstermektedir [20]. Lee [23] tarafından *taksol*’ün antimitotik etkisinin *vinblastin* ve *kolşisin* ile karşılaştırıldığında, bu antimitotik ajanın daha etkili olduğu ortaya konmuştur. Bir başka antimitotik ajan olan *kolsemid*’in etki mekanizmasının, *taksol*’ün etki mekanizması ile benzerlik göstererek,

mikrotübül polimer yapılarını kararlı hale getirdiği bildirilmiştir [24]. Hücrede mitotik merkezlerden sentriollerin duplikasyonunu önleyen diğer bir antimitotik madde ise *merkaptotanol*'dür. Bu bileşiğin mitozu engellemesi, mitotik merkezlerin duplikasyonunu bloke etmesi şeklinde olduğu belirtilmiştir [11]. Özet olarak, hücre iskeletini etkileyerek mitozu engelleyen antimitotik maddelerin *kolşisin*, *kolsemid*, *nokodazol*, *vinblastin*, *vinkristin*, *taksol*, *sitokalsin*, *podofillotoksin*, *ustiloksin*, ve bu kimyasalların türevlerinin olduğu belirtilmektedir.

Günümüzde uygulanan kanser tedavilerinde, hücre proteinlerinin fonksiyonları üzerinde etkili olarak kullanılan antimitotik maddelerin başlıcalarının alkilleyici maddeler, antimetabolitler, antibiyotikler ve sisplatin olduğu belirtilmektedir. Bunlar içinde *biskloretilaminler*, *etilenimler* ve *metilmelaminler* olarak gruplandırılmış alkilleyici antimitotik maddeler, mRNA ve DNA üzerinde kırılmalara ve baz değişmelerine neden olarak etki gösterdiği açıklanmıştır. *Folik asid*, *purin* ve *primidin antimetabolit* gruplarını oluşturan, antimitotik etkili kimyasal maddeler ise DNA, RNA ve protein gibi temel hücre moleküllerinin sentez basamaklarında, genellikle enzimleri inhibe ederek etkili olmaktadır. Antibiyotik niteliğinde bulunan antimitotik maddelerden *kloramfenikol*'ün, protein sentezinde görev yapan enzimlerin aktivitesini; *daktinomisin*'in ise, DNA bazlarına bağlanıp, hem DNA yapısını bozarak hem de mRNA sentezini inhibe ederek antimitotik etki gösterdiği açıklanmıştır [19]. Antibiyotik özellikteki antimitotik maddelere ayrıca *doksorubisin*, *epirubisin*, *mitomisin*, *aklarubisin* ve *daunorubisin* de örnek olarak gösterilmektedir [12]. Kanser tedavilerinde kanserin türüne göre kullanılan bir diğer antimitotik madde olarak "*sisplatin*" bilinmektedir. Bu kimyasalın DNA çift zincirine çapraz bağlanarak antimitotik aktivite gösterdiği bilinmektedir.

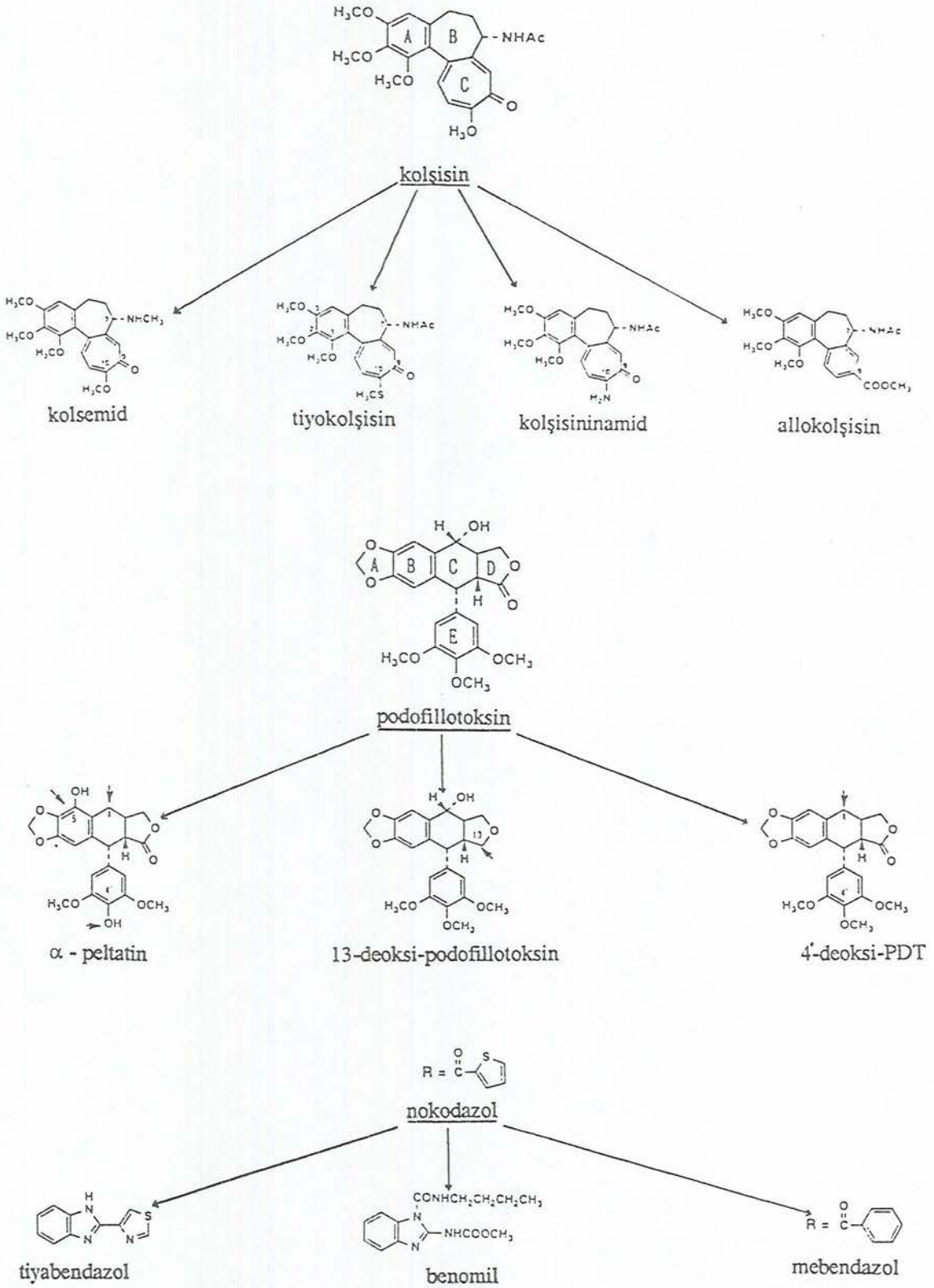
Kayaalp [12] tarafından, bilinen başlıca antimitotik maddelerin genel etki mekanizmaları, aşağıdaki gibi şematik olarak gösterilmiştir (Şekil 1.1).



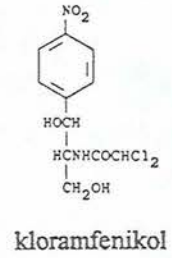
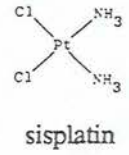
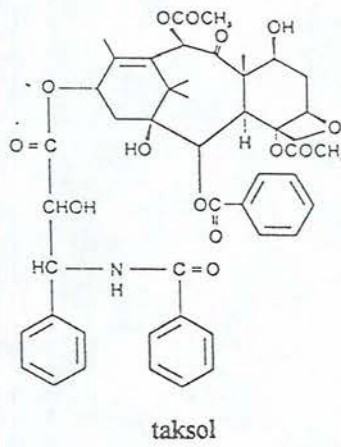
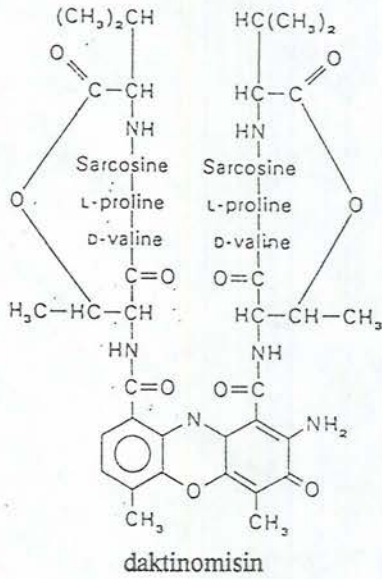
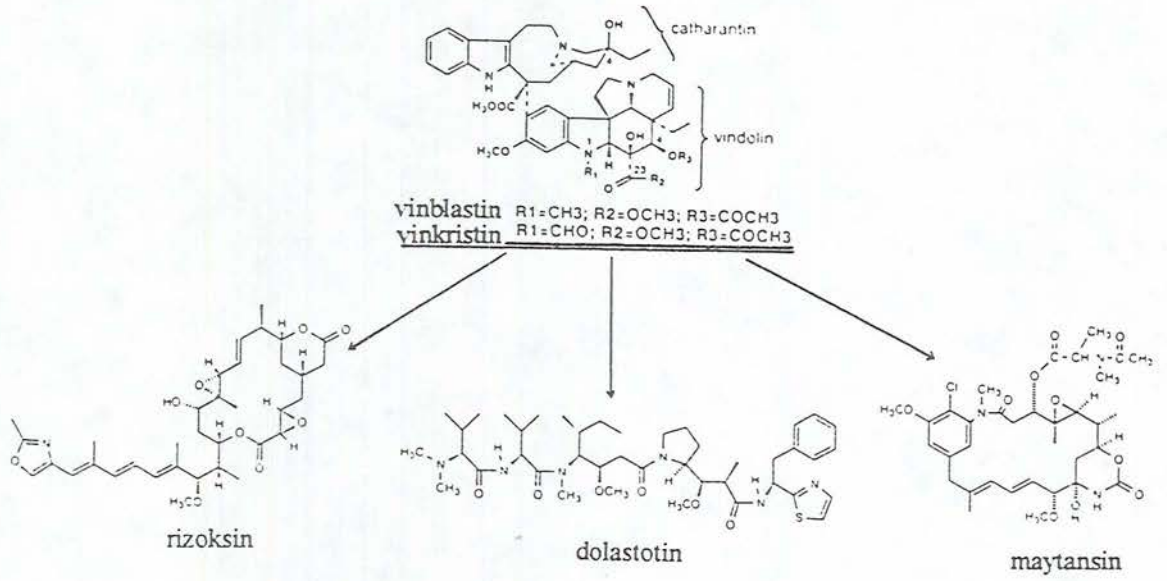
Şekil 1.1. Antimitotik etki gösteren bazı kimyasal maddeler ve etkili oldukları özgün bölgeler (Kayaalp, 1989)

Yukarıda etki mekanizmalarından kısaca söz edilen antimitotik maddelerin kimyasal yapıları ve özellikleri genel olarak bilinmektedir. Aşağıda, bilinen başlıca antimitotik maddeler ve bunların kimyasal türevlerinin formülleri gösterilmektedir [6, 7, 19, 25, 26] (Şekil 1.2).





Şekil 1.2. Bilinen bazı antimitotik maddeler ve türevleri



Şekil 1.2. (Devam) Bilinen bazı antimitotik maddeler ve türevleri

Antimitotik maddeler ile yapı benzerliği gösteren pek çok kimyasal bileşimin ise henüz etki mekanizmaları bilinmemektedir. Özellikle kemoterapide geniş kullanım alanına sahip antimitotik maddeler ile ilgili çalışmalar, günümüzde büyük önem kazanmıştır.

## 1.2. Antimitotik Maddelerin Önemi

Kanser kemoterapilerinin çoğunda antimitotik ajanların kullanıldığı bilinmektedir [22]. Kullanılan antineoplastik ilaçlar, vücut içinde patolojik biçimde çoğalan transform hücreleri yok ettiği, bununla birlikte hızlı çoğalma gösteren normal vücut hücrelerinin bölünme periyotlarını da önemli ölçüde etkilediği açıklanmaktadır. Buna karşın bazı otoimmün ve cilt hastalıklarının tedavisinde, antimitotik ilaçlar kontrollü ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Antimitotik olduğu bilinen kimyasal maddelerden bazılarının özellikle doku ve organ nakillerinde kullanıldığı bildirilmektedir [12]. Örneğin kemik iliği transplantasyonunda, antimitotik ajanların kullanılmasıyla olumlu sonuçlar alınmıştır [27]. Deri enfeksiyonlarında, tedavi amaçlı olarak antimitotik maddelerin kullanıldığı da bilinmektedir [28]. Yapılan araştırmalar, gut hastalığı tedavisinde, antimitotik ajan olan *kolşisin*'in oldukça etkili olduğunu ortaya koymuştur [7, 29]. Lee [23] tarafından *taksol* ile yapılan bir çalışmada ise bu antimitotik maddenin, ovaryum kanserinin tedavisinde olumlu sonuçlar verdiği saptanmıştır. Araştırmacılar, *taksol*'ün, ovaryum kanserinin tedavisinde olduğu kadar meme kanserlerinin tedavisinde de olumlu etki gösterdiğini bildirmişlerdir [30]. “*Vinblastin*” ve “*vinkristin*” adlı antimitotik maddelerinin, klinikte, antitümör maddeler olarak yaygın bir şekilde kullanıldığı bildirilmiştir [16]. Çoğunluğu tedavi amacına yönelik olarak kullanılan antimitotik maddeler çok çeşitli olup, bunların kullanımı ve etki mekanizmaları üzerindeki çalışmalar hızlı bir şekilde devam etmektedir.

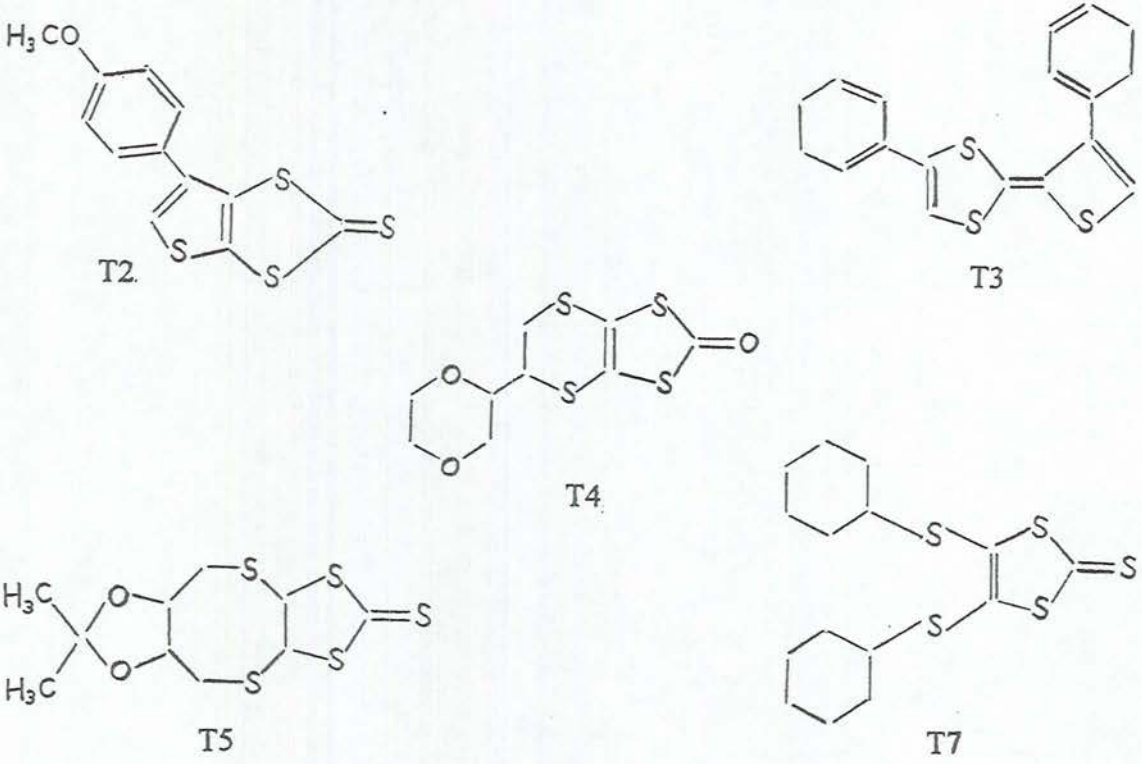
## 1.3. Antimitotik Olduğu Düşünülen Kimyasal Maddeler

Antimitotik maddelerin kimyasal yapı ve etkilerine benzerlik gösteren bir çok bileşimin, canlılar üzerinde etkilerinin nasıl oldukları da günümüzde çalışma konusu

olmuştur. Antimitotik etki gösteren doğal kimyasal ajanların, kimyasal yol ile sentez edilmiş olan türevlerinin de bu ajan gibi antimitotik etki gösterip göstermediklerini saptamak amacıyla deneysel çalışmaların sürdürüldüğü bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada, MDL 27048 isminde, yeni sentez edilmiş kimyasal bir maddenin mikrotübüller üzerine etkili olabileceği düşünülerek *in vitro* koşullarda araştırması yapılmıştır [18]. Araştırma sonucunda MDL 27048 isimli maddenin antimitotik olduğu, etki mekanizmasının ise bilinen antimitotik maddelerden, *kolşisin* ve *podofililotoksin*' in etki mekanizmalarıyla benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Bir başka çalışmada, antimitotik olduğu bilinen kimyasal maddelerin analogları sentez edilerek, bu analogların tubulin aktiviteleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır [7]. *Kolşisin*, *vinblastin* ve *podofililotoksin*' in kimyasal yapılarına benzer olan, sentetik ve doğal olarak elde edilmiş antimitotik madde türevlerinden çoğunun mitotik inhibitör olduğu sonucuna ulaşılmıştır. *Taksol* analogu olan kimyasal bileşiklerin mikrotübüller üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, bu bileşiklerin de *taksol* gibi davranarak mikrotübülleri stabilize ettiği ortaya konmuştur [31].

Günümüzde, klinikte tedavi amaçlı olarak kullanılan pek çok antimitotik etkili kimyasal madde olduğu bilinmektedir. Bunların dışında henüz etkisi bilinmeyen ancak kimyasal yapı yönünden antimitotik maddelere benzerlikleri nedeniyle antimitotik etkili olabileceği düşünülen çok sayıda kimyasal maddenin olduğu da açıktır. Yapılmış ve yapılmakta olan bir çok çalışmanın konusunu bu tür maddelerin oluşturduğu, yukarıda anlatılan çalışmalar ile örneklendirilmeye çalışılmıştır. Geçmişte yapılan bu çalışmalar yoluyla edinilen bilgilerden yola çıkılarak, bilinen antimitotik kimyasal madde türevlerinin, mitotik aktivite üzerine olası etkileri, araştırma konumuzun temelini oluşturmuştur. Bu çalışma ile, antimitotik olabileceği düşünülen pek çok kimyasal maddenin *in vivo* koşullarda da test edilmesine olanak sağlayabilecek “deneysel test yöntemi” geliştirilmeye çalışılmıştır.

Antimitotik etkisi nedeniyle yaygın olarak kullanılan ve deniz süngerlerinden elde edilen doğal bir bileşen model alınarak, laboratuvar koşullarında bu bileşenin değişik türevleri sentez edilmiştir (TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi) (Şekil 1.3). T2, T3, T4, T5 ve T7 olarak kodlandırılmış bu kimyasal türevler, çalışmamızın kimyasal materyalini oluşturmuştur.



Şekil 1.3. *Bis tetrathiafulvalene* türevlerinin açık kimyasal formülleri

Sentetik olarak elde edilmiş olan bu kimyasal maddelerin, *in vivo* koşullarda oluşturabileceği antimitotik etkilerinin gözlenebilmesi için, retikuloendotelial sistem (RES)' de görev yapan hemapoiyetik dokulardan dalak ve kemik iliği hedef seçilmiştir. RES' deki bu dokular, yaşam boyu mitotik aktivite gösteren kan hücrelerinin oluşum ve olgunlaşma yeri olduğu için tercih edilmiştir. Mitotik aktivite üzerine etkili olduğu düşünülen herhangi bir maddenin, RES' de görev yapan hemapoiyetik dokular üzerindeki olası etkilerini ortaya koyma düşüncesinden yola çıkılarak bu dokulardan kemik iliği ve dalak, ayrıca kan dokusu inceleme materyali olarak kullanılmıştır. En sağlıklı sonucun bu dokuların karşılaştırılmasıyla elde edilebileceği düşünülmüştür.

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda üreme periyodu hızlı, bakımı kolay, laboratuvar koşullarına uygunluğu ve deneysel çalışmalarda anatomik yapılarının insana çok benzemesi gözönünde tutularak *Wistar* cinsi ratlar kullanılmıştır. Deney hayvanı olarak kullanılan tüm ratlar %23 ham protein, %3 ham yağ, %7.5 ham kül ve %13 su içeren hazır ticari yem ile beslenmişlerdir [32]. İçme suları kaynatılıp soğutularak verilmiş ve kafeslerin günlük temizlikleri itina ile yapılmış zefiran ile dezenfekte edilmiştir. Deneysel çalışmamızda 12-15 haftalık, ortalama ağırlığı 250-300 gram olan ergin ratlar kullanılmıştır. Deney başlangıcından 30 gün önce erkek ve dişi ratlar farklı kafeslere koyularak çiftleşmelerine engel olunmuştur.

### 2.2. Deneklerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda laboratuvar koşullarında (TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi) yapay olarak sentez edilmiş *bis (ethylenedithia) tetrathiafulvalane (BEDT)* ve *tetrathiafulvalene (TTF)* türevi olan T2, T3, T4, T5 ve T7 kodlu kimyasal maddeler kullanılmıştır. Bu maddeler tuz halde sentez edilmişlerdir [33]. Adı geçen maddelerin deney hayvanlarına enjeksiyonlarını sağlamak amacı ile *dimetilsülfoksit (DMSO)* içinde çözülmesi sağlanmıştır [24, 34]. Deney sonuçlarını karşılaştırmak üzere pozitif kontrol olarak *kolşisin* (Hopkin & Williams Ltd. 3298) kullanılmıştır. Çözücü maddenin oluşturabileceği sonuç ile diğer kimyasal maddelerin oluşturabileceği sonuçlar arasındaki kontrolü sağlamak amacı ile saf olarak *DMSO* (Merck) kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak kullanılan hayvanların, madde enjeksiyonu için kullanılan deney hayvanları ile aynı koşulları ve stresi yaşamaları amacıyla serum fizyolojik su enjeksiyonu yapılmıştır. Böylece çalışmamızda kullanılan tüm hayvanlardan iki temel grup oluşturulmuştur:

1. Kontrol grubu;
- i) Fizyolojik su enjeksiyonu yapılan negatif kontrol grubu,

ii) DMSO enjeksiyonu yapılan kontrol grubu,

iii) Kolşisin enjeksiyonu yapılan pozitif kontrol grubu.

2. Deney grubu; test edilecek "T" kodlu beş farklı kimyasal maddenin uygulandığı hayvan grubu.

Deney hayvanı olarak kullanılan ratların ağırlıklarına oranla, günlük enjeksiyon için her bir kimyasal deney materyalinden 0.2 miligram kullanılmıştır. Kimyasal materyaller 2.5' şar mikrolitre *DMSO* içinde çözülmüşlerdir. Çözeltiler serum fizyolojik ile 0.5 mililitre'ye tamamlanarak enjeksiyona hazır duruma getirilmişlerdir.

### 2.3. Kimyasal Maddelerin Enjeksiyonu

Hazırlamış olduğumuz her bir maddenin uygulanması için, iki erkek ve bir dişi olmak üzere üç'er rat kullanılmıştır. Dört gün süren uygulamalarda, her enjeksiyondan önce deney hayvanları *dietileter* ile anestezi edilmişlerdir [14, 35]. Enjeksiyon için 1 mililitre' lik steril (disposibıl) enjektörler kullanılmıştır. Gün aşırı 0.5 mililitre kimyasal deney materyali intraperitonel olarak, her bir deney hayvanına enjekte edilmiştir [36-38].

### 2.4. Diseksiyon ve Doku Örneklerinin Alınması

#### 2.4.1. Kan örneklerinin alınması

Deneyde kullanılan hayvanların tümü anesteziden hemen sonra karın bölgesinden başlanarak, göğüs boşluğuna kadar operasyon makası ile açılmış ve önce kalbe ulaşılmıştır. Kalbin karıncık bölgesinden 1 mililitre'lik steril enjektör yardımıyla 0.8 mililitre kan örneği alınmıştır [14]. Alınan örnek kan, içinde 0.2 mililitre antiqagülan (%3.8 *sodyumsitrat*) çözeltisi bulunan kapaklı tüpe transfer edilmiştir [39, 40]. Kan örneğinin konulduğu tüp yavaşça hareket ettirilerek içindeki kan ve antiqagülan maddenin karışması sağlanmış ve 4-6°C' de buzdolabında diseksiyon tamamlanıncaya kadar saklanmıştır [2]. Daha sonra deney hayvanının tüm kanı, kalpten enjektör yardımıyla çekilerek hayvan ext edilmiştir.

## **2.4.2. Dalak örneklerinin alınması**

Çalışmamız için öncelikle dış morfolojik ve anatomik incenlemesi yapılacak olan ve temel örnek materyal kabul edilen dalak, pens ve makas yardımıyla zedelenmeden alınmıştır. Dalak örneği taze olarak hazırlanan Bouin (750 cc. Distile su, kristal pikrik asit, 250 cc. %37-40' lık formaldehit ve 50 cc. Glasiyal asetik asit ) fiksatifine konularak 10 saat süre ile tespit edilmiştir [41].

## **2.4.3. Kemik iliği örneklerinin alınması**

Deney hayvanlarının arka bacaklarındaki femur kemiğini saran kas tabakası, bistüri ucu ile kemikten ayrılarak, femur kemiği ortaya çıkarılmıştır. Femur kemiğinin ekleme yakın kısmı, keskin bir makas yardımıyla kesilmiş ve kemik içinden, transfer iğnesi yardımıyla, femural kemik iliği incelenmek üzere alınmıştır [42].

## **2.5. Mikropreparatların Hazırlanması**

### **2.5.1. Kan preparatlarının hazırlanması**

Deney hayvanlarından alınan ve antiqagülan ile karıştırılarak buzdolabında saklanan kan örneklerinin her birinden, birer damla kan ayrı ayrı temiz lamlar üzerine damlatılmış ve bir lamel kullanılarak yayma yapılmıştır [40]. Kan yaymaları yapılırken kullanılan lam, lamel ve kan damlatılmasında yararlanılan mikropipet uçları, her kan örneği için temizleriyle değiştirilmiştir.

Yayma preparatlar 20-30 dakika havada kurutulup, absöü metil alkol içinde 5 dakika bekletilerek fikse edilmişlerdir. Fiksasyondan sonra havada tekrar kurutulan kan yaymaları, önce hazır May-Grünwald (Sigma) boyası ile cam şale içinde 3-5 dakika muamele edilmiştir. Preparatlar, May-Grünwald boyamanın ardından , Giemsa (0.6 gram kuru Giemsa (Fluka), 50 cc. absöü metil alkol, 25 cc. saf gliserin) boyası ile 20-25 dakika kadar şale içinde boyanmıştır [43-45]. İkili boyamaları yapılan yayma



preparatların fazla boyaları, akar su ile uzaklaştırılarak mikroskop altında incelenebilir hale getirilmiştir.

Deney hayvanlarına ait kan örneklerinin sayımları, hemositometrik yöntem ile Thoma lamı kullanılarak yapılmıştır [46, 47]. Örneklemeye yöntemi ile seçilen bir kaç kan örneğine ait parametreler hücre sayıcı ile yapılan kan sayımları ile desteklenmiştir.

### **2.5.2. Kemik iliği preparatlarının hazırlanması**

Deney hayvanlarından alınan kemik iliği, 0.5 cc. RPMI 1640 (Sigma) içine alınıp önce 1000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernetant atılıp yerine 0.5 cc. phosphate buffer saline (PBS) ilave edilerek ikinci kez 1000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernetant tekrar atılıp yerine absolü metanol : glasiyal asetik asit karışımından (3:1) 0.5 cc. ilave edilerek santrifüj tekrarlanmıştır. Süpernetant atılıp yerine absolü metanol : glasiyal asetik asit karışımından (3:1) tekrar ilave edilerek miyeloid doku örneğinin fiksasyonu sağlanmıştır [48]. İçinde fikse edilen kemik iliği örneğinin bulunduğu tüp çalkalanarak, bir damlası alınan miyeloid doku, temiz bir lam üzerine froti edilmiştir [49]. Havada 20-30 dakika kurutulan slaytlar, May-Grünwald (Sigma) ile 3-5 dakika süre ile boyanmıştır. Boyanan örneklerdeki boyanın yarısı alınıp kalan yarısına distile su ilave edilerek 1-2 dakika daha boyanması sağlanmıştır. May-Grünwald ile boyamanın ardından distile su ile yıkanan örnekler, ikinci olarak Giemsa ile 5-10 dakika süre ile boyanmıştır [50, 51]. Preparatlar musluk suyu ile yıkayıp havada iyice kurutulduktan sonra, entellan ile kapatılarak incelenmeye hazır, daimi preparat haline getirilmiştir.

### **2.5.3. Dalak preparatlarının hazırlanması**

Deneklerden inceleme materyali olarak alınan dalak dokularının otolize olmaması için, Bouin fiksatif ile tespit edilmeleri sağlanmıştır. Tespitin hızlı ve etkili olmasını kolaylaştırmak amacıyla, dalak dokuları keskin jilet kullanılarak yarımşar santimetre küplük parçalara bölünmüştür.

### 2.5.3.1. Dalak örneklerinin takibi

Dalak parçaları 10 saat süre ile Bouin fiksatifinde tutulmuştur. Fiksatiften alınan doku parçalarının histolojik takibine başlanmadan önce 3 kez 10'ar dakika %50'lik etanol serilerinde bekletilerek yıkanmışlardır. Daha sonra dokular 5 saat süre ile %70'lik, 60'ar dakika %80'lik, %90'lık etanollerde ve 30'ar dakika %96'lık ve 2 kez değiştirmek suretiyle absolu etanol içinde bekletilerek dehidratasyon sağlanmaya çalışılmıştır. Doku örnekleri şeffaflaştırılmak üzere 2 kez değiştirilerek 20'şer dakika saf ksilol (Merck) solüsyonlarında bekletilmiştir. Daha sonra dalak parçaları, 3 kez değiştirilmek suretiyle etüv içinde 65 °C'de eritilmiş parafinlerde (Sigma) iki kez 30' ar ve bir kez de 60 dakika sürelerle bekletilmişlerdir. Takibi tamamlanmış olan dalak parçaları, ayrı ayrı parafine gömülerek, parafin bloklar halinde kesit alınmaya hazır duruma getirilmişlerdir [41].

### 2.5.3.2. Kesit alma

Parafin blokların ve mikro kesitlerin alınmasında kullanılacak mikrotom bıçağının buzdolabında soğutulmasının ardından, mikrotom (Mikrom HM 310) aracılığı ile 5'er mikrometre kalınlığında doku kesitleri alınmıştır. Kesitlerin 45°C'de su banyosunda açılmaları sağlanarak temiz lamlar üzerine alınmasından sonra etüv içinde 70°C'de 1 saat süre ile bekletilmeleri sağlanmıştır. Preparatlar, iki kez değiştirilerek 1'er saat süre ile saf ksilolde şale içinde tutulup deparafinizasyon sağlandıktan sonra, boyama aşamasına getirilmiştir.

### 2.5.3.3. Boyama

Kesitlerin boyanmasında Hematoksilin-Eosin ikili boyası kullanılmıştır [35]. Bu amaçla Harris Alum Hematoksilin ve alkollü Eosin boyaları hazırlanmıştır.

### **i) Harris Alum Hematoksilin boyasının hazırlanması**

5 gram kristal Hematoksilin (Merck) boyasının 50cc. absölu etanol içinde çözünmesi sağlanmıştır. Toz haldeki, 100 gram Ammonium alum kimyasalının 1 litre distile su içinde ısıtılarak çözülmesi sağlandıktan sonra, bu iki çözelti karıştırılıp hızlı olarak alevde kaynatılmıştır. Alevden alınan boya solüsyonuna 2.5 gram cıva oksit ilave edilerek boya rengi koyu menekşe oluncaya kadar karıştırılmıştır. Soğuk su banyosunda soğutulan boyaya %4 asetik asit (Merck) ilave edilerek, boya, kullanıma hazır duruma getirilmiştir [52, 53].

### **ii) Eosin boyasının hazırlanması**

1 gram Eosin Y (Merck), 80cc. %96'lık etanol ve 20cc. distile su karıştırılarak stok solüsyon hazırlanmıştır. 20cc. stok boya solüsyonu 60cc. %80'lik etanol ile karıştırılıp 1cc. glasiyal asetik asit (Merck) ilave edilerek, kullanıma uygun Eosin boyası hazırlanmıştır [53].

### **2.5.3.4. Dalak kesitlerinin boyanması**

Deparafinizasyonu yapılmış olan dalak kesitleri 5'er dakika sürelerle absölu, %96'lık, %90'lık, %80'lik, %70'lik, %50'lik etanollerde ve distile suda bekletilmiştir. Kesitler, Hematoksilin ile 3 dakika muamele edilip distile sudan geçirilerek, 10 dakika Eosin ile boyanmışlardır. Musluk suyu ile fazla boyası alınan kesitler, alkol serilerinden hızla geçirilerek dehidratasyona uğratılmış, iki ayrı ksilolde 30'ar dakika tutularak şeffaflaştırılmışlardır. Dalak mikro preparatları, bu aşamadan sonra entellan ile kapatılarak mikroskop altında incelenmeye hazır duruma getirilmişlerdir.

## **2.6. Mikroskopi ve Mikrofotografi**

Bu çalışmamızda hazırlanan tüm preparatlar, Olympus BX50 araştırma mikroskobu altında ve değişik büyütmelerde incelenmişlerdir. Preparatların, tamamında

yapılan inceleme sonucunda, belirlenen deney sonuçlarına ait kısımları belgelendirilmek üzere rastgele seçilerek fotoğraflandırılmışlardır. Preparatların, mikroskop altında saptanan uygun görüntülerinin fotoğrafları, Olympus PM-30 otomatik fotomikrografi aracı kullanılarak çekilmiştir.

### 3. BULGULAR

Çalışmamızda kullanılan tüm hayvanlardan alınan doku örnekleri, “periferik kan”, “miyeloid doku” ve “dalak” olarak gruplandırılmış ve karşılaştırmalı olarak değişik büyütmelerde dikkatlice incelenmiştir. İncelemelerimizden elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

#### 3.1. Kan Dokusu

Kontrol ve deney gruplarını oluşturan bütün hayvanların önce periferik kanlarının hemositometrik sayımları yapılmış, ardından May Grünwald-Giemsa histolojik boya ikilisi ile boyalı yayma preparatlarına bakılarak, kan hücrelerinin morfolojik yapı özellikleri mikroskop altında incelenmiştir.

##### 3.1.1. Periferik kan parametreleri

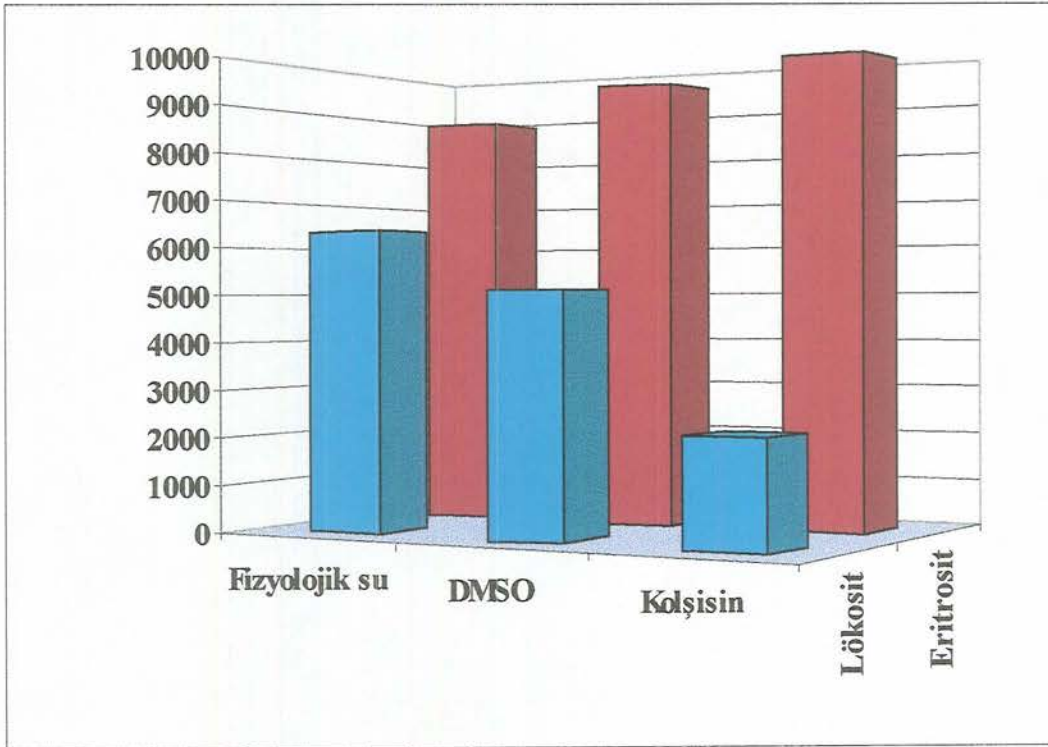
###### 3.1.1.1. Kontrol grubu hayvanların kan parametreleri

Kontrol grubunu oluşturan hayvanların kan sayımları yapıldığında toplam lökosit sayısının, negatif kontrol grubu hayvanlarında en yüksek ( $6333 \text{ mm}^3/\text{adet}$ ), DMSO uygulanan kontrol grubu hayvanlarında daha az ( $5083 \text{ mm}^3/\text{adet}$ ) ve pozitif kontrol grubu hayvanlarında da en düşük sayıda ( $2250 \text{ mm}^3/\text{adet}$ ) olduğu saptanmıştır (Çizelge 3.1, Şekil 3.1).

Aynı kontrol grubundaki hayvanların kanlarında eritrosit sayımı yapıldığında ise rakamsal değerlerin, lökosit sayımlarından elde edilen rakamsal değerler ile tam tersi bir sonuç verdiği belirlenmiştir. Eritrosit sayısının negatif kontrol grubu hayvanlarında en düşük ( $8800000 \text{ mm}^3/\text{adet}$ ), DMSO uygulanmış kontrol grubu hayvanlarında daha fazla ( $9533000 \text{ mm}^3/\text{adet}$ ), kolşisin uygulanmış pozitif kontrol grubu hayvanlarının kanlarında ise en yüksek ( $10000000 \text{ mm}^3/\text{adet}$ ) sayıda olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.1, Şekil 3.1).

Çizelge 3.1. Kontrol grubu hayvanlarına ait kan parametreleri

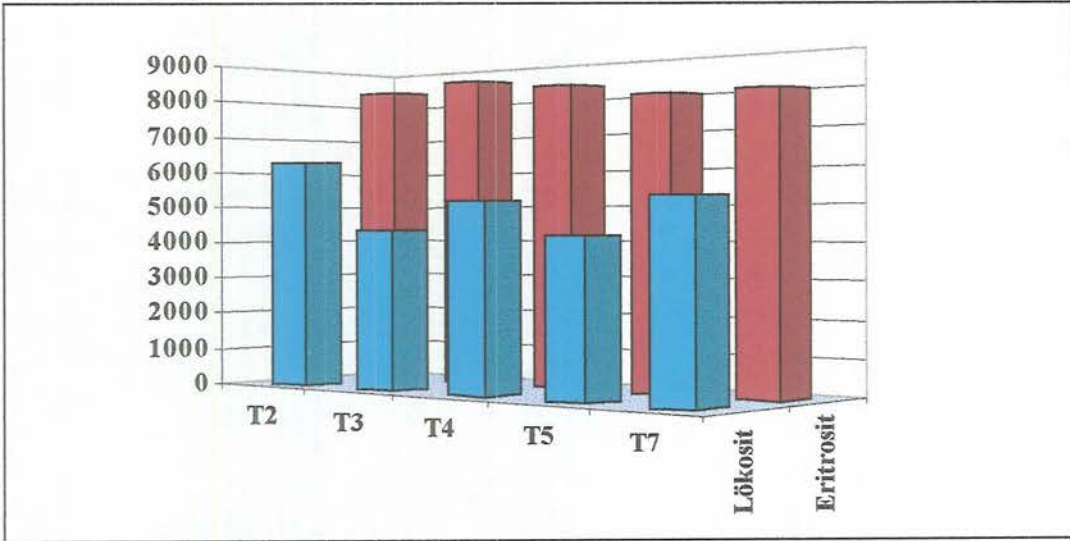
KONTROL GRUBU HAYVANLARI			
MADDELER	GRUPLAR	LÖKOSİT (mm <sup>3</sup> /adet)	ERİTROSİT (mm <sup>3</sup> /adet)
Fizyolojik su (Negatif kontrol)	1.	4750	9400000
	2.	6375	9200000
	3.	7875	7800000
	<b>Ortalama</b>	<b>6333</b>	<b>8800000</b>
DMSO	1.	2375	10800000
	2.	5500	9800000
	3.	7375	8000000
	<b>Ortalama</b>	<b>5083</b>	<b>9533000</b>
Kolşisin (Pozitif kontrol)	1.	2250	10000000
	2.	-	-
	3.	-	-
	<b>Ortalama</b>	<b>2250</b>	<b>10000000</b>



Şekil 3.1. Kontrol grubu hayvanlarına ait kan sayımlarını gösteren grafik  
[Eritrosit: (mm<sup>3</sup>/adet)X1000, Lökosit: (mm<sup>3</sup>/adet)]

Çizelge 3.2. Deney grubu hayvanlarına ait kan parametreleri

DENEY GRUBU HAYVANLARI			
MADDELER	GRUPLAR	LÖKOSİT (mm <sup>3</sup> /adet)	ERİTROSİT (mm <sup>3</sup> /adet)
T2 Kimyasal maddesi	1.	3750	8200000
	2.	8500	8800000
	3.	6500	8000000
	<b>Ortalama</b>	<b>6250</b>	<b>8333000</b>
T3 Kimyasal maddesi	1.	2875	8800000
	2.	3375	7800000
	3.	6725	9000000
	<b>Ortalama</b>	<b>4325</b>	<b>8533000</b>
T4 Kimyasal maddesi	1.	2125	10400000
	2.	7125	6800000
	3.	6100	7600000
	<b>Ortalama</b>	<b>5116</b>	<b>8266000</b>
T5 Kimyasal maddesi	1.	2000	9000000
	2.	5125	8000000
	3.	5525	6800000
	<b>Ortalama</b>	<b>4217</b>	<b>7933000</b>
T7 Kimyasal maddesi	1.	3500	8600000
	2.	6125	8400000
	3.	6000	6800000
	<b>Ortalama</b>	<b>5208</b>	<b>7933000</b>



Şekil 3.2. Deney grubu hayvanlarına ait kan sayımlarını gösteren grafik

[Eritrosit: (mm<sup>3</sup>/adet)X1000, Lökosit: (mm<sup>3</sup>/adet)]

### 3.1.1.2. Deney grubu hayvanların kan parametreleri

Deney grubu hayvanlarına ait lökosit sayım sonuçlarından elde edilen rakamsal değerler kendi aralarında karşılaştırıldığında, T2 maddesinin uygulandığı hayvanların periferik kanlarındaki lökosit sayısının en yüksek ( $6250 \text{ mm}^3/\text{adet}$ ), T4 ve T7 maddelerinin uygulandığı hayvanların kanlarında daha düşük ( $5116\text{-}5208 \text{ mm}^3/\text{adet}$ ), T3 ve T5 maddelerinin uygulandığı hayvanların periferik kanlarında ise en düşük değerlerde ( $4325\text{-}4216 \text{ mm}^3/\text{adet}$ ) olduğu görülmüştür (Çizelge 3.2, Şekil 3.2).

Deney grubundaki hayvanların kanlarında eritrosit sayımı yapıldığında ise hücre sayılarının  $7900000\text{-}8500000 \text{ (mm}^3/\text{adet)}$  değerlerinin arasında değiştiği ve aralarında rakamsal değer olarak büyük farkların olmadığı saptanmıştır (Çizelge 3.2, Şekil 3.2).

### 3.1.2. Periferik kan hücrelerinin morfolojisi

Kontrol ve deney grubu hayvanların May Grünwald-Giemsa ile boyanmış olan periferik kan yayma preparatlarının, mikroskop altında değişik büyütmelerde yapılan incelemeleri sonucunda, kan hücrelerine ait saptanan morfolojik özellikler aşağıda belirtilmiştir.

#### 3.1.2.1. Lökosit hücrelerin morfolojisi

Tüm hayvanların periferik kan preparatları özel bir özen ile incelenmiş ve granülosit serisine ait hücrelerden bazofil ve eosinofil hücrelerine hiç rastlanamamıştır. Bu seriye ait olan nötrofil hücrelerinin, negatif kontrol grubu hayvanların yayma kan preparatlarında en fazla ( $\cong\%19$ ), pozitif kontrol grubu hayvanlarının kan preparatlarında ise en az değerde ( $\cong\%7$ ) olduğu tespit edilmiştir. DMSO uygulanmış kontrol grubu hayvanlarının kan preparatlarında bulunan nötrofil hücrelerinin hipertrofi gösterdiği, çekirdek yapılarında da hipersegmentasyon bulunduğu ancak bu segment büyüklüklerinde değişme olmadığı gözlenmiştir (Şekil 3.4.D). Pozitif kontrol grubu hayvanların kanlarındaki nötrofil hücrelerin çaplarında değişme olmamasına karşın nükleus segmentlerinin sayısında azalma, büyüklüklerinde ise artma olduğu



belirlenmiştir (Şekil 3.5.D). Nötrofil hücrelerin sitoplazmalarının, DMSO ve pozitif kontrol grubu hayvanlarında boyanma özelliği olarak zayıf eosinofili gösterdiği tespit edilmiştir. Agranüosit serisine ait kan hücrelerinden lenfositlerin sayıca en fazla DMSO ( $\cong$ %20), ikinci olarak serum fizyolojik ( $\cong$ %17), en az ise kolşisin verilmiş ( $\cong$ %14) kontrol grubu hayvanlarının periferal kan preparatlarında buldukları tespit edilmiştir. Tüm kontrol grubu hayvanların kan preparatlarında gözlenen lenfosit büyüklüklerinin değişmemiş olmasına karşın, pozitif kontrol grubundaki lenfosit çekirdeklerinin sitoplazmayı tamamen kaplamış olduğu (Şekil 3.5.C), diğer grupların lenfositlerinde ise az da olsa sitoplazmanın görüldüğü belirlenmiştir. Boyanma özellikleri açısından tüm kontrol gruplarının lenfositleri karşılaştırıldığında, pozitif kontrole ait kanlardaki lenfositlerin diğer gruplara oranla koyu bazofilik özellik göstermiş oldukları tespit edilmiştir (Şekil 3.5.C). Aynı seride yer alan monositlerin sayıca en fazla olarak DMSO uygulanmış kontrol grubu hayvanlarının ( $\cong$ %20) ve pozitif kontrol grubu hayvanlarının ( $\cong$ %19); en az olarak ise negatif kontrol grubu hayvanlarının kanlarında ( $\cong$ %14) buldukları tespit edilmiştir. Monosit hücrelerinin büyüklükleri incelendiğinde ise sadece negatif kontrol grubu hayvanların kanlarında sayıları yaklaşık %0.5 olan geniş çaplı hücreler olduğu saptanmıştır (Şekil 3.3.B). Pozitif kontrol grubu hayvanlarının kanlarındaki monosit hücrelerinin koyu bazofilik boyanmış olmalarına karşın, DMSO uygulanmış hayvanların monosit hücrelerinin daha açık boyanmış oldukları görülmüştür (Şekil 3.5.B, Şekil 3.4.B).

Deney grubundaki hayvanların periferal kan yayma preparatları incelendiğinde, granülosit serisi hücrelerinden nötrofillerin T2, T3, T4 ve T5 maddelerinin uygulandığı hayvanlarda, sayısal olarak bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir. Ancak bu test maddelerinin uygulanmış olduğu hayvanların kan preparatlarındaki nötrofillerin sayısal değerlerinin negatif kontrol grubu hayvanların kanlarındaki nötrofillerin sayısal değerlerinden daha düşük olduğu saptanmıştır. T7 maddesinin uygulandığı deney grubu hayvanların kanlarındaki nötrofillerin, hem negatif kontrol hem de diğer test maddelerinin uygulandığı hayvanların kanlarında gözlenenden sayıca daha az olduğu belirlenmiştir. Negatif kontrol olarak kullanılan hayvanların kan preparatlarında bulunan nötrofil hücrelerinin çaplarına oranla, T2 maddesinin uygulandığı hayvanların kanlarındaki nötrofillerin küçük olduğu, T3, T4, T5, ve T7 maddelerinin uygulandığı

hayvanların nötrofil çaplarının ise daha küçük olduğu gözlenmiştir. T3 ve T7 maddelerinin uygulandığı hayvan grubunun kanlarındaki nötrofillerin, çekirdeklerinde segment sayısında azalma (Şekil 3.7.D, Şekil 3.10.D), buna karşın T4 ve T5 maddelerinin verildiği grupların kanlarındaki nötrofillerde çekirdeklerin ise band formunda olduğu ve segmentasyonun oldukça az olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.8.C, Şekil 3.9.C). Tüm deney gruplarına ait yayma kan preparatlarındaki nötrofillerin boyanma özellikleri arasında ise büyük bir farka rastlanmamıştır. Ancak T4 ve T5 maddelerinin uygulandığı gruplardaki nötrofil sitoplazmalarının daha eosinofilik boyandıkları dikkati çekmiştir (Şekil 3.8.C, Şekil 3.9.C).

Bütün deney hayvanlarına ait kan preparatlarında incelenen monosit hücrelerinin, sayısal değerler olarak büyük farklılık göstermediği ancak hücre şekillerinde, deney grupları arasında farklılıklar tespit edilmiştir. T3 kimyasal maddesinin uygulandığı grupta bulunan monosit benzeri hücredeki nukleusun, koyu bazofilik olup hemen tüm hücreyi kaplamış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.7.B). T4 maddesinin verildiği grupta ise yine monosit benzeri bazı hücrelerin bulunduğu, ancak bu hücrelerin sitoplazmasında büyük granüllerin yer aldığı görülmüştür (Şekil 3.8.B). Deney grubu hayvanların periferik kanlarının yayma preparatlarında gözlenen monositlerin, boyanma özellikleri arasında bir farkın olmadığı tespit edilmiştir. Kanda bulunan granülsüz hücrelerden lenfositlerin, deney grupları arasında, sayıca fark göstermediği bulunmuştur. Lenfosit hücrelerinin büyüklük ve şekil açısından T3, T4 ve T7 kimyasal maddelerinin uygulanmış olduğu deney grubu hayvanlarının kan preparatlarındaki lenfositler arasında önemli farklılık gözlenmemesine karşın, T2 ve T5 maddelerinin uygulanmış olduğu hayvanların kanlarındaki lenfosit hücrelerinin birbirine benzer biçimde ancak diğer deney gruplarındaki lenfosit hücrelerinden yaklaşık %20-30 daha küçük oldukları saptanmıştır (Şekil 3.6.C.D, Şekil 3.9.C). Lenfosit boyanma özelliklerinin tüm deney gruplarında benzer olduğu gözlenmiştir.

### **3.1.2.2. Eritrosit hücrelerinin morfolojisi**

Negatif kontrol grubu hayvanlarının kan preparatlarındaki eritrositlerin yaklaşık %5 oranında oval ya da iğ biçimli oldukları saptanmıştır. Dikkatli incelemeler

sonucunda, preparatlarda gözlenen eritrositlerin yaklaşık olarak %1' inin target hücreleri olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.3.B.C.D). DMSO uygulanmış hayvanlar ile pozitif kontrol grubu hayvanlarının kanlarındaki oval ya da iğ biçimli eritrositlerin, negatif kontrol grubu hayvanlarının kanlarındakilere oranla daha az olduğu tespit edilmiştir (DMSO $\cong$ %2, negatif kontrol $\cong$ %7). Buna karşın, pozitif kontrol grubu hayvanların kanlarında bulunan eritrositlerin, yaklaşık %5'inin çıkıntılı membran yapısına ve yıldızlı görünümüne sahip oldukları tespit edilmiştir (Şekil 3.5.B). Tüm kontrol grubu hayvanların kanlarındaki eritrositler karşılaştırıldığında hücre büyüklüklerinin değişmediği ancak, DMSO kontrol grubundaki eritrositlerin, negatif kontrol grubundakilere göre daha koyu, pozitif kontrol grubundaki eritrositlerin ise daha açık eosinofilik boyandıkları saptanmıştır.

Tüm deney grubu hayvanlarının kan preparatlarında yapılan incelemeler, eritrosit sayılarının bu gruplar arasında sayıca benzer olduğunu ayrıca negatif kontrol hayvanlarının kanlarındaki eritrosit sayılarıyla paralellik gösterdiği tespit edilmiştir. Deney gruplarına ait kan preparatlarının tüm alanları incelendiğinde, T2 maddesi uygulanan grupta %7, T3 maddesi uygulanan grupta %12, T4 maddesi uygulanan grupta %6, T5 maddesinin uygulandığı grupta %2 ve T7 maddesinin uygulandığı hayvan gruplarında %3 oranlarında, daha küçük çaplı eritrositlere rastlanmıştır. Deney gruplarının tamamına ait tüm preparatlarda genel olarak eritrosit şekillerinde, T2 kimyasalının uygulandığı hayvanlarda yaklaşık %6 oranında, T3 kimyasalının uygulandığı hayvanlarda yaklaşık %20 ve T4 kimyasalının uygulandığı hayvanlarda yaklaşık %13 oranında deforme olmuş eritrositler tespit edilmiştir. T5 ve T7 kimyasal maddelerinin test edildiği hayvanların periferik kan yayma preparatlarında, önemli oranda eritrosit deformasyonuna rastlanmamıştır. T2, T4, T5 ve T7 kimyasal test materyallerinin uygulandığı deney grubu hayvanlarının kan preparatlarında sayıca yaklaşık oranlarda, target hücrelerinin olduğu ve pozitif kontrol grubu preparatlarındaki target hücrelerinin oranlarıyla paralellik gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak T3 maddesinin test edildiği deney hayvanlarının periferik kanlarındaki target hücre oranlarının diğer deney gruplarından daha fazla olduğu ve DMSO uygulanmış kontrol grubundaki target hücrelerinin sayılarıyla benzerlik gösterdikleri saptanmıştır. Tüm

deney grubu hayvanlarının kan preparatlarında yapılan gözlemler. eritrosit hücrelerinin sitolojik olarak boyanma özellikleri arasında fark olmadığını göstermiştir.

### 3.2. Miyeloid Doku (Kemik İliği)

Çalışmamızda kullanılan tüm hayvanların kan preparatları incelendiğinde eritrosit ve lökositler seriyeye ait bazı hücrelerin, hem sayısal hem de morfolojik farklılıklar gösterdiği saptanmıştır. Kontrol grubu hayvanların periferik kan preparatlarında yapılan incelemelerin, pozitif kontrol gruplarında, sadece eritrosit sayısının artmasına karşın, nötrofil hücrelerin sayıca belirgin olarak azalmış olduğu bulgusunu vermesi, sadece bu iki çeşit hücrenin, kemik iliğinde incelenmesi gerektiğini doğurmuştur. Bu gereklilik nedeniyle tüm hayvanların kemik iliklerinde incelemeler yapılmış ve aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

#### 3.2.1. Kontrol grubu hayvanların miyeloid dokuları

Pozitif kontrol grubu hayvanlarının kemik iliğinde yapılan incelemeler, bu grupta bulunan eritrositer seri öncüllerinden normoblast hücrelerinin sayısal olarak en yüksek değerde ( $\cong$ %65) olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ancak normoblastların, DMSO uygulanan kontrol grubu hayvanların miyeloid doku preparatlarında, sayıca daha az ( $\cong$ %30), negatif kontrol grubu hayvanlarda ise en düşük ( $\cong$ %20) değerde bulunduğu belirlenmiştir. Pozitif kontrol gruplarının kemik iliğindeki normoblast nükleuslarının düzgün oval olmadığı, değişik büyüklük ve uzunlukta, loba benzer çıkıntılarının bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.5.E). Negatif kontrol grubu hayvanların miyeloid doku preparatlarında gözlenen normoblastlara oranla, pozitif kontrol grubu hayvanlara ait normoblastların daha koyu bazofilik boyanma özelliği gösterdiği belirlenmiştir.

Negatif kontrol grubu hayvanlarının kemik iliği preparatlarında yapılan incelemelerden, nötrofil metamiyelosit hücrelerinin sayıca değerlerine ( $\cong$ %40) oranla, DMSO uygulanmış kontrol gruplarında bu değer daha düşük ( $\cong$ %25) olduğu saptanmıştır. Pozitif kontrol olarak gruplandırılmış hayvanların miyeloid doku preparatlarında nötrofil metamiyelosit hücrelerine hiç rastlanmamıştır. Nötrofil

metamiyelosit hücrelerinin nukleus yapıları incelendiğinde, DMSO uygulanmış grubun kemik iliklerindeki nötrofil metamiyelosit hücre nukleuslarının, negatif kontrol grubuna ait kemik iliği preparatlarındaki nötrofil metamiyelositlerin nukleuslarına oranla daha düzgün ve daire biçimli halkasal oldukları, ayrıca daha bazofilik olarak boyandığı tespit edilmiştir (Şekil 3.4.E).

### 3.2.2. Deneysel gruba hayvanların miyeloid dokuları

Deneysel gruba hayvanlarına ait kemik iliği preparatları, mikroskop altında incelenmiş ve normoblast hücre sayılarının T2 ve T5 maddelerinin test edildiği hayvan gruplarında yaklaşık %10-12 oranında olduğu saptanmıştır. Ancak T3 ve T4 maddelerinin test edildiği hayvan gruplarında bu oranın %10-13 olarak arttığı görülmüştür. Biçim olarak, normoblast hücrelerinin oval ve dairesel görünümlü nukleuslarının, T3 ve T5 kimyasal test materyallerinin uygulandığı hayvanlarda az oranda deforme olduğu (Şekil 3.7.E, Şekil 3.9.E) ancak T2 kimyasalının test edildiği grubun normoblast hücrelerinde bu deformasyonun daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.6.E). T4 kimyasalının test edildiği gruplarda, normoblast hücre nukleuslarının çıkıntılı ve yıldızlı görünümde oldukları saptanmıştır (Şekil 3.8.E). Normoblast hücrelerin boyanma özelliklerinin, T2 ve T4 maddelerinin test edildiği hayvanların miyeloid doku preparatlarında bazofilik olduğu, buna karşın T3, T5 ve T7 maddelerinin test edildiği hayvanların miyeloid doku preparatlarında, daha koyu bazofilik özellik gösterdiği tespit edilmiştir.

Kimyasal maddelerin uygulanmış olduğu deneysel gruba hayvanlarının kemik iliği preparatlarında gözlenen nötrofil metamiyelosit hücrelerinin oransal olarak sayıları tespit edilmiştir. Bu oranların, T3 ve T5 kimyasal maddelerinin test edildiği grupların kemik iliği preparatlarında yaklaşık %4-5 arasında olduğu, ancak T2, T4 ve T7 maddelerinin test edildiği grupların kemik iliği preparatlarında %25-35 arasında değişiklik gösterdiği sonucuna varılmıştır. Farklı deneysel gruplarına ait miyeloid doku preparatlarında yapılan gözlemler sonucunda T2 ve T3 test maddelerinin uygulandığı gruplarda, nötrofil metamiyelosit çekirdeklerinin halkasal şekillerinin deforme olduğu saptanmıştır (Şekil 3.6.E, Şekil 3.7.E). Ancak T3 maddesinin test gruplarındaki nötrofil

metamiyelosit hücrelerinin  $\approx 30\%$ 'unda çekirdeklerin yumaklaşmış oldukları görülmüştür (Şekil 3.7.E). T2, T4 ve T7 kimyasallarının test edildiği hayvanlarda, nötrofil metamiyelosit hücre çekirdeklerinin hipersegmentasyon gösterdiği bulunmuştur (Şekil 3.6.E, Şekil 3.8.E, Şekil 3.10.E). Bununla birlikte T4, T5 ve T7 maddelerinin uygulandığı grupların doku preparatlarında görülen nötrofil metamiyelositlerin nükleuslarının aşırı bant kalınlaşması gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.8.E, Şekil 3.9.E, Şekil 3.10.E). Nötrofil metamiyelositlerin T2 ve T3 test gruplarında koyu bazofilik, T4, T5 ve T7 maddelerinin test edildiği gruplarda ise zayıf bazofilik boyanma özelliği gösterdikleri belirlenmiştir.

### 3.3. Dalak Morfolojisi

Çalışmamızda kullanılan hayvan gruplarına ait dalak organları genel olarak ve karşılaştırmalı biçimde incelendiğinde, kolşisin uygulanan gruptaki hayvan dalaklarının tümünde hacimce bir küçülme olduğu saptanmıştır. Tüm kontrol gruplarının dalak kesitlerine aynı büyütme ile bakıldığında da küçülmüş olduğu açıkça görülmüştür.

#### 3.3.1. Kontrol grubu hayvanların dalak morfolojisi

Negatif kontrol ve DMSO grubu hayvanların dalak kesitlerinin genel görüntüsünde, eosinofilik boyanma özelliği gösteren yapıların yaygın biçimde geniş bir alan kaplayarak lenf nodüllerine kadar uzandığı görülmesine karşın (Şekil 3.3.F, Şekil 3.4.F), kolşisin uygulanan hayvanların dalak kesitlerinde, eosinofilik alanların kısa şeritler halinde oldukları gözlenmiştir (Şekil 3.5.F). DMSO gruplarında bu alanlara dikkatlice bakıldığında, bu alanların dallanarak nodüllerin aralarına ve yer yer nodül içlerine kadar uzandıkları belirlenmiştir (Şekil 3.4.F). Negatif kontrol hayvanlarının dalak kesitlerinde, bazofilik adacıkların küçük ve sayıca çok olduğu (Şekil 3.3.F), DMSO'da ise bu adacıkların büyük ve sayıca az olduğu saptanmıştır. Negatif kontrol ve DMSO gruplarında rastlanmayan ancak, sadece kolşisin grubu hayvanlarda yağ dokusuna benzer ve yaklaşık nodül büyüklüğünde ve kapsülle çevrili yapılara rastlanmıştır (Şekil 3.5.F). Tüm kontrol grubu hayvanların genel dalak kesitleri

karşılaştırıldığında, pozitif kontrol grubu hayvan dalaklarının, tüm kesit alanındaki hücreler arası boşluklarda belirgin biçimde artış olduğu tespit edilmiştir. Dalaktaki toplam lenf nodülü sayıları açısından kontrol grubu hayvanlarının dalakları incelendiğinde, pozitif kontrol gruplarının dalaklarındaki nodül sayılarında, negatif kontrol ve DMSO uygulanmış gruplara göre azalma olduğu tespit edilmiştir. Benzer olarak, pozitif kontrol grubu dalaklarındaki nodül çaplarının, diğer kontrol gruplarının lenf nodül çaplarına oranla küçüldüğü de tespit edilmiştir. Ayrıca negatif ve DMSO kontrol gruplarının dalaklarındaki lenf nodüllerinin çoğunda merkezi açık boyanmış dairesel bir alan gözlenirken (Şekil 3.4.F), pozitif kontrol grubu dalaklarının lenf nodüllerinin hiç birinde benzer bir yapıya rastlanmamıştır.

Bu genel incelemenin ardından tüm kontrol grubu hayvanlarının dalak kesitleri üzerindeki ayrıntılı incelemeler, lenf nodülü merkezi olarak kabul edilen sentral arterlerden başlanarak dışarı doğru sırasıyla, ak pulpa ve kırmızı pulpa bölgeleri üzerinde yapılmıştır.

DMSO ve kolşisin uygulanmış kontrol gruplarına ait dalaklarda görülen lenf nodüllerindeki arterlerin toplam çapları, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, DMSO uygulanmış gruba oranla yaklaşık yarı yarıya küçük, pozitif kontrole oranla ise yaklaşık iki kat büyük olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda, sadece DMSO grubunda arter lümeninin belirlenemeyecek kadar daralarak kapanmış olduğu da tespit edilmiştir (Şekil 3.3.G). Yapılan dikkatli incelemelerden, pozitif kontrol gruplarındaki arter duvarının diğer kontrol gruplarına oranla çok daha geniş olduğu ve koyu eosinofilik boyanma özelliği gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.5.G). Ayrıca damar iç yüzeyini örten endotel hücrelerinin biçimsel bozukluk ve deformasyon göstererek lümene doğru çıkıntılar yapmış oldukları saptanmıştır. Bununla birlikte media tabakası genişlemiş olarak gözükken pozitif kontrol grubu arterlerinin dış çevresinde düzgün ve dairesel dizili, oval çekirdekli hücrelerin var olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 3.5.G).

Kontrol grubunu oluşturan hayvanların dalak kesitlerinde ak pulpaya genel olarak bakıldığında hücrelerin, negatif ve DMSO kontrol gruplarında düzensiz ve homojen dağıldığı, pozitif kontrol gruplarında ise dağılımın böyle olmadığı ve tek yönlü dizilimin olduğu saptanmıştır. Ak pulpada hücreler arası boşlukların, negatif ve DMSO kontrol gruplarında az, buna karşın pozitif kontrol gruplarında daha çok olduğu

bulunmuştur. Bu bölgedeki sayısal hücre yoğunluklarının, fizyolojik su uygulanmış negatif kontrol gruplarına oranla, pozitif kontrol gruplarında az, DMSO uygulanmış gruplarda ise daha yoğun olduğu tespit edilmiştir. Negatif kontrol ve DMSO kontrol gruplarında koyu bazofil çekirdekli, küçük, yuvarlak ya da oval biçimli hücrelere rastlanılmış olup bu tip hücrelerin pozitif kontrol grubu dalaklarında daha da fazla sayıda olduğu göze çarpmıştır. Açık boyanmış, küçük, yuvarlak ya da oval şekilli hücre sayılarının DMSO ve pozitif kontrol gruplarında, negatif kontrole göre azalmış olduğu belirlenmiştir. Fizyolojik su ve DMSO enjekte edilmiş kontrol grubu hayvanlarının dalak preparatlarının ak pulpalarında bulunmuş olan açık boyanmış, büyük oval çekirdekli hücrelere, diğer grupta hiç rastlanılmamıştır. Ancak mitotik figürlü, hacimce büyük hücreler, negatif kontrol dışındaki kontrol gruplarında hiç gözlenmemiştir.

Kontrol grubu hayvanların dalak kesitlerine bakıldığında, kırmızı pulpadaki hücre dağılımlarının homojen olmadıkları ayrıca, kolşisin uygulanmış grupta, kırmızı pulpadaki hücrelerin çoğunlukla deforme oldukları dikkati çekmiştir (Şekil 3.5.H). Şekil bozukluğu gösteren bu hücrelerin sıralı gibi görülen dizilimde oldukları ancak, silindirik nukleuslu hücrelerin bu dizilimin yönüne dik olarak farklı bir dizilim gösterdikleri tespit edilmiştir. Hücreler arası boşlukların da bu dizilime uygun olarak geniş kanallar biçiminde olduğu gözlenmiştir. Buna karşın fizyolojik su uygulanmış negatif grupta koyu bazofil çekirdekli hücrelerin küçük gruplar meydana getirmiş oldukları (Şekil 3.3.H), DMSO grubunda bulunan aynı tip hücrelerin ise büyük ve yoğun gruplar oluşturdukları, bu hücre grupları aralarındaki alanlarda ise geniş boşlukların oluştuğu dikkati çekmiştir (Şekil 3.4.H). Hücreler arası boşlukların negatif kontrol grup dalaklarındaki kırmızı pulpada, küçük ancak çok sayıda ve ağırlıklı olarak eosinofili gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3.3.H).

### **3.3.2 Deney grubu hayvanların dalak morfolojisi**

Çalışmamızda kullanılan deney grubu hayvanlarının dalak preparatları mikroskop altında küçük büyütmede incelendiğinde, tüm deney gruplarında eosinofilik alanların var olduğu ancak, T2 ve T3 maddelerinin uygulanmış olduğu gruplarda bu alanların daha koyu eosinofili gösterdiği saptanmıştır (Şekil 3.6.F, Şekil 3.7.F). T2 ve



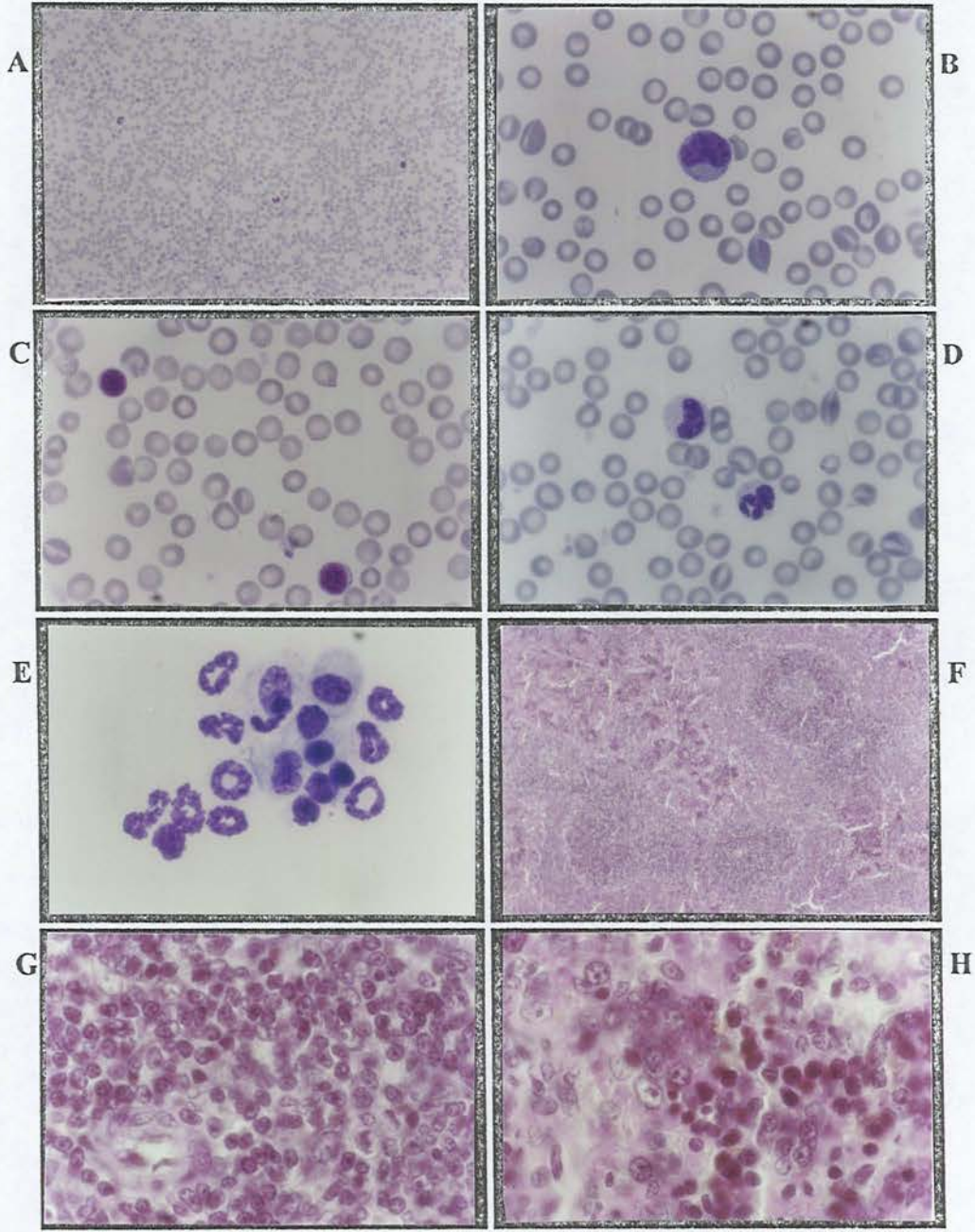
T5 kimyasallarının test edildiği grupların dalak kesitlerinde, küçük bazofilik hücre adacıklarına rastlanılmış ve T5 grubundaki dalak kesitlerinde adacık sayısının, T2 test gruplarına oranla daha çok olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.6.F, Şekil 3.9.F). Diğer maddelerin uygulandığı grupların doku kesitlerinde ise bazofilik hücre adacıklarının daha büyük ve sayıca daha az olduğu gözlenmiştir. Sadece T2 maddesinin uygulandığı hayvanların dalak kesitlerinde büyük, ancak T3 ve T5 maddesi uygulanmış grubun dalak kesitlerinde daha küçük görünen ve sadece kırmızı pulpada yer almış kanal biçimli yarıkların olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.6.F, Şekil 3.7.F, Şekil 3.9.F). Deney grubu hayvanların tamamının dalak kesitlerinin karşılaştırılması sonucunda, kesitlerin genel görüntülerinde saptanmış olan lenf nodülü sayılarının, T2 uygulanmış grupta, az ancak birbirine sayıca benzerlik gösteren diğer deney gruplarında ise daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır. Aynı şekilde tüm deney hayvanlarının dalak kesitlerinin genel görüntülerinde belirlenen lenf nodülü çaplarının, farklı gruplar arasında büyüklük açısından farklılık göstermedikleri tespit edilmiştir.

Dalak kesitlerinde, lenf nodüllerinin merkezine yakın bölgelerde lokalize olmuş sentral arterlerin çap genişliği açısından, en geniş arterin T7 maddesinin test edildiği gruplarda olduğu saptanmıştır (Şekil 3.10.G). T4 maddesinin uygulandığı gruplarda sentral arter çaplarının, T7 grubuna oranla yaklaşık 1/3 kadar daha dar olduğu, T2 ve T3 maddelerinin verildiği deney gruplarında ise bu oranın yaklaşık yarı yarıya olduğu saptanmış, ancak T5 kimyasalının test edildiği deney gruplarında ise sentral arter çapının daha da daralarak arter lümeninin görülemeyecek duruma geldiği gözlenmiştir (Şekil 3.9.G). T2 ve T5 uygulanmış hayvanların dalak preparatlarında, sentral arter endotelinde, lümeneye doğru çıkıntı yapmış bazofilik hücrelerin buldukları tespit edilmiştir (Şekil 3.6.G, Şekil 3.9.G). T3 ve T5'in test edildiği grupların sentral arterlerin media tabakalarının eosinofilik özellikte olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.7.G, Şekil 3.9.G). Media tabakası genişlemiş olan T4 deney grubunda ise bu tabaka içinde, damar lümenine paralel, iğ biçimli ve yer yer oval şekilli koyu bazofilik boyanmış hücreler saptanmıştır (Şekil 3.8.G). Aynı biçimli ve konumlu hücrelere, T5 uygulanmış deney gruplarının dalaklarındaki sentral arterlerin dışında tüm deney grupları sentral arterlerinde de rastlanılmıştır.

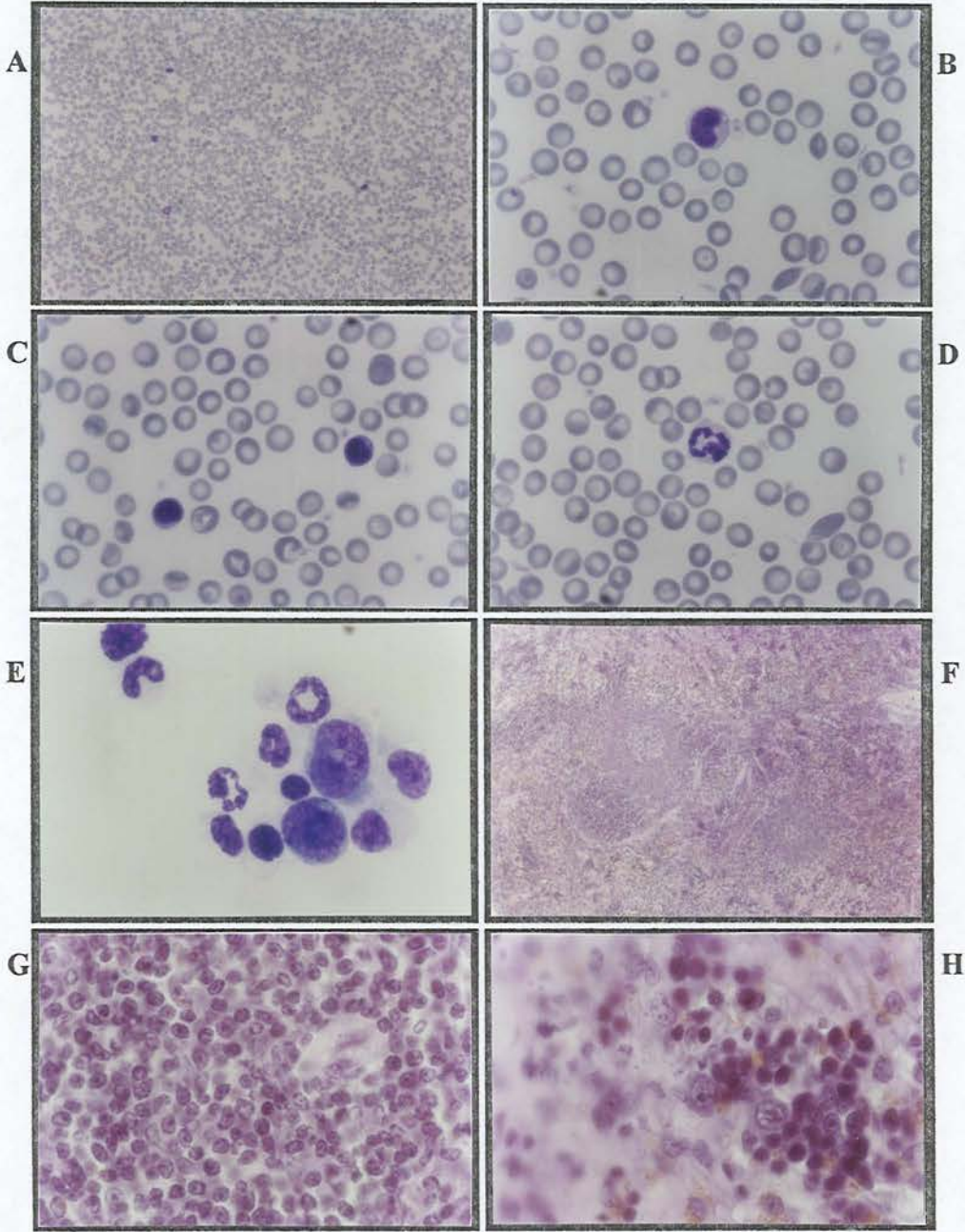
Dalak kesitlerinde, dokuyu oluşturan ve sentral arter çevresinde yer alan ak pulpaya ait bölgeler incelendiğinde, hücre dağılımlarının tüm deney grubu dalak kesitlerinde benzer şekilde homojen olduğu gözlenmiş, benzer biçimde hücrelerin dağınık dizilim gösterdikleri belirlenmiştir. Ak pulpada dağılım gösteren hücrelerin T5 kimyasal maddesinin test edildiği gruplar dışındaki tüm deney gruplarında, sayıca yoğun ve hücreler arası boşlukların az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.9.G). Bu hücrelerden koyu bazofil çekirdekli, küçük, yuvarlak ya da oval biçimli olanları T2, T3, T4 ve T7 maddeleri uygulanan grup dalaklarının ak pulpasında bulunmasına karşın, T5 maddesi uygulanan grupta, bu tip hücre sayılarının belirgin biçimde az olduğu saptanmıştır. T5 maddesi uygulanan grupta, çok sayıda bulunan açık boyanmış küçük, yuvarlak ya da oval şekilli hücrelerin, diğer deney gruplarındaki sayılarının çok daha az olduğu tespit edilmiştir. İncelemelerimiz sonucu açık boyanmış, büyük ve oval çekirdekli hücrelerin, T5 maddesinin test edildiği gruplarda daha fazla olduğu ancak T7 maddesinin test edildiği gruplarda ise daha az oranda bulunduğunu göstermiştir. Deney grubu hayvanlarının dalak kesitlerinde yapılan incelemelerde, ak pulpalarda mitotik figürlü hiç bir hücreye rastlanılamamıştır.

Kimyasal maddelerin, test için uygulandıkları deney hayvan dalaklarındaki, kırmızı pulpa bölgelerinde, hücrelerin dağılım düzenlerinin, tüm deney gruplarında homojen olmadıkları, yapılan incelemeler ile ortaya konmuştur. T7 grubu dışındaki tüm test gruplarında, hücreler arası boşlukların ise diğerlerine oranla fazla olduğu saptanmıştır (Şekil 3.10.H). T3 maddesinin test edildiği grupların dalak preparatlarında, kırmızı pulpa bölgesinde, eosinofilik alanların geniş yer kapladığı tespit edilmiştir (Şekil 3.7.H). Benzer alanların, T5 deney gruplarında da bulunduğu ancak eosinofilik olmadığı gözlenmiştir (Şekil 3.9.H). T3 ve T4 uygulanmış grupların kırmızı pulpalarında irili ufaklı, koyu bazofilik, yuvarlak ve oval hücrelerin yer aldığı tespit edilmiştir. Bu tip hücrelerin diğer deney gruplarında ise az oranda buldukları belirlenmiştir. Açık bazofilik boyanmış, büyük hacimli ve küçük çekirdekli polimorf hücrelerin, T3 maddesinin test edildiği gruplarda az ancak, diğer deney gruplarında daha fazla sayıda olduğu belirlenmiştir. Sarı renkte boyanmış hücrelerin ise oransal olarak T2 gruplarında en çok (Şekil 3.6.H), T3 ve T7 gruplarında az, T4 ve T5 gruplarında da daha az oldukları gözlenmiştir. Ayrıca, T5' in test edildiği grupların

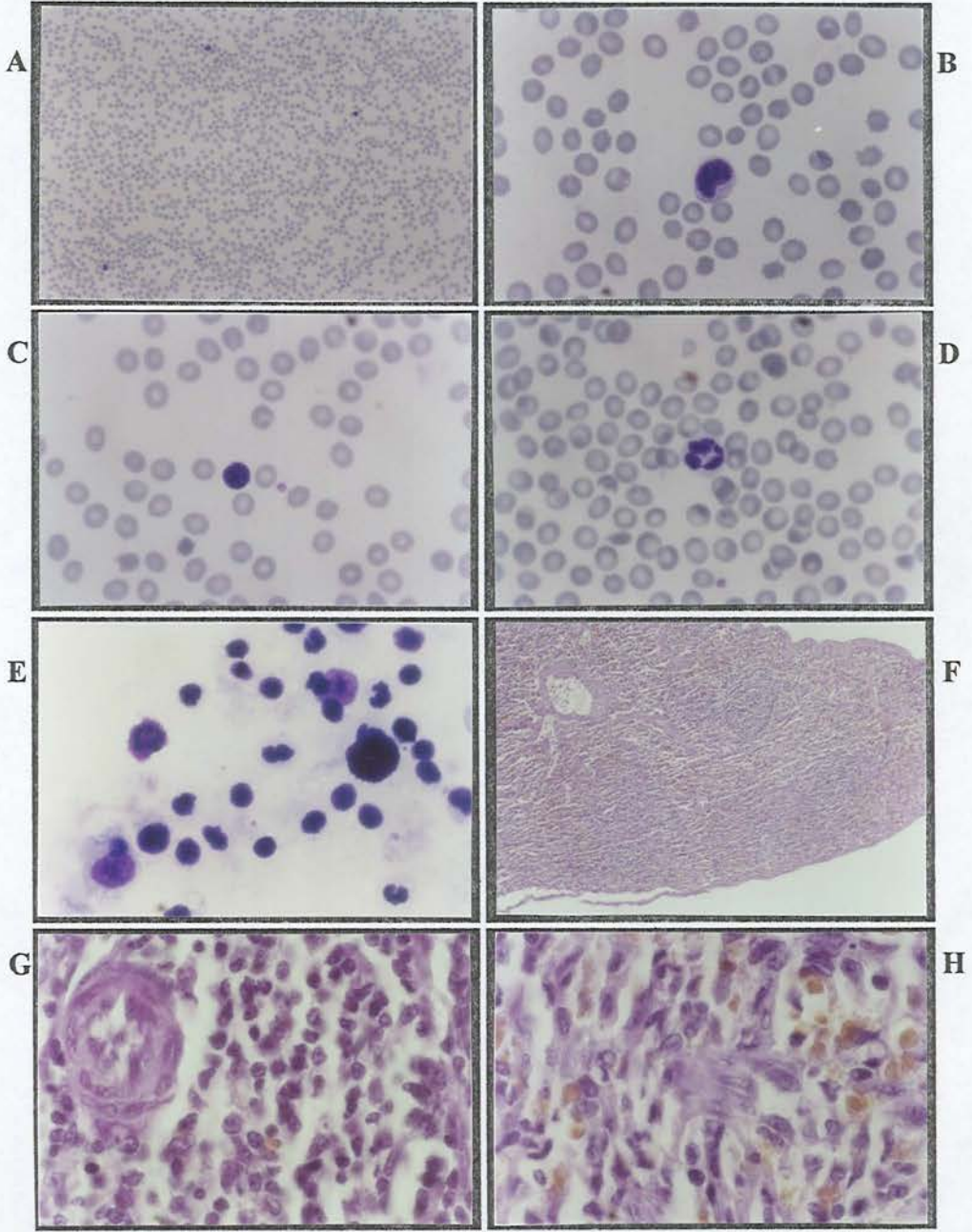
dalak kesitlerinin kırmızı pulpalarında hiç boya almamış, nukleusları olmayan ya da gözükmeyen, sıkı yapıda doku oluşturur görünümde hücre sel yapılara da rastlanılmıştır (Şekil 3.9.H).



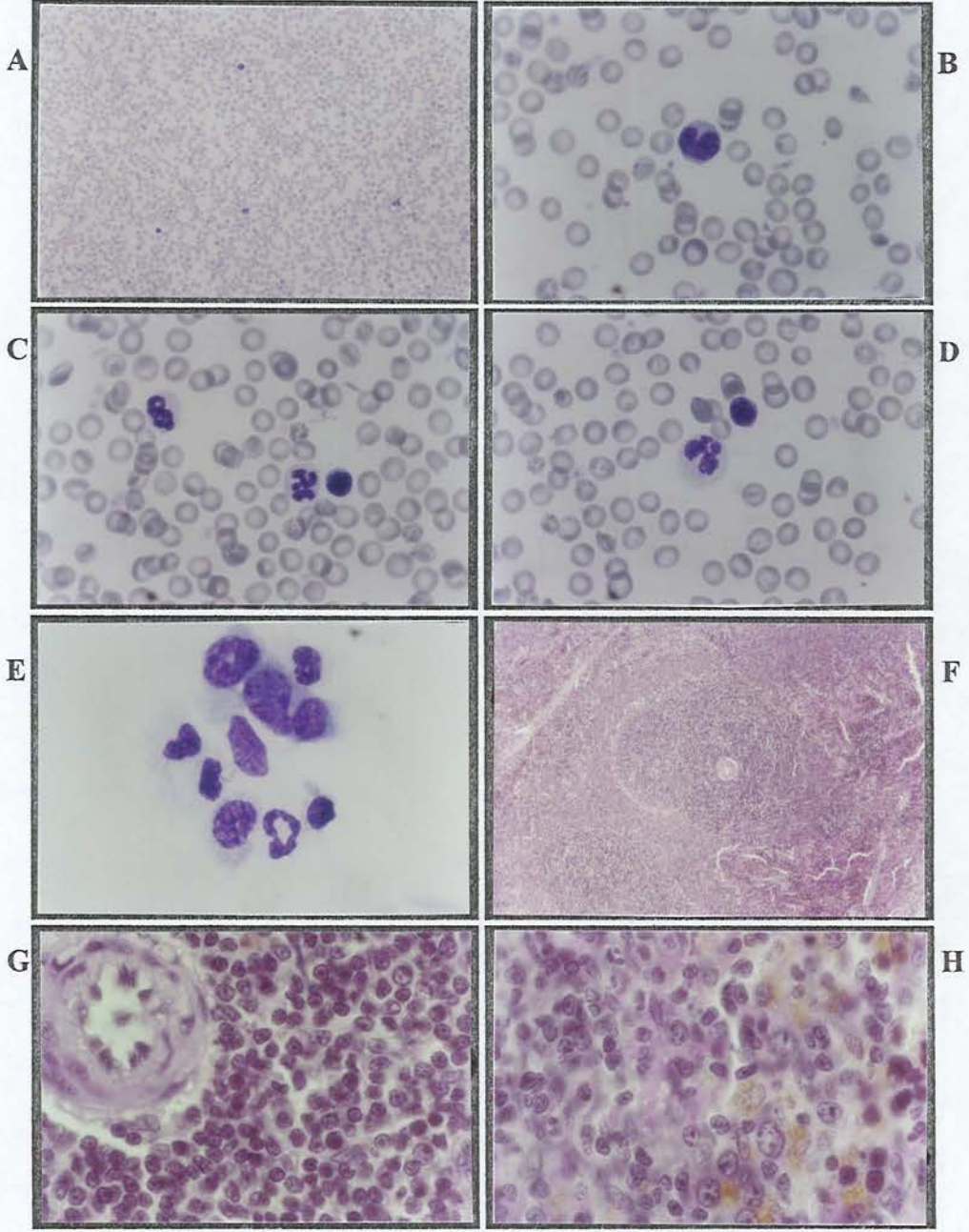
Şekil 3.3. Fizyolojik su uygulanmış negatif kontrol grubu hayvanlarına ait değişik doku ve organ preparatlarının görünüşleri. (A) May Grünwald-Giemsa ile boyanmış kan yayma preparatının genel görünümü X66. (B) Büyük monosit hücresi X330. (C) Lenfositler X330. (D) Monosit ve nötrofil X330. (E) May Grünwald-Giemsa ile boyanmış kemik iliği yayma preparatının ayrıntılı görünümü X330. (F) Hematoksilin-Eosin ile boyanmış dalak kesit preparatının genel görünümü X33. (G) Dalak preparatında ak pulpa ve merkez arterin görünümü X330. (H) Dalak preparatında kırmızı pulpa ve küçük gruplar oluşturmuş, koyu bazofilik hücrelerin görünümü X330



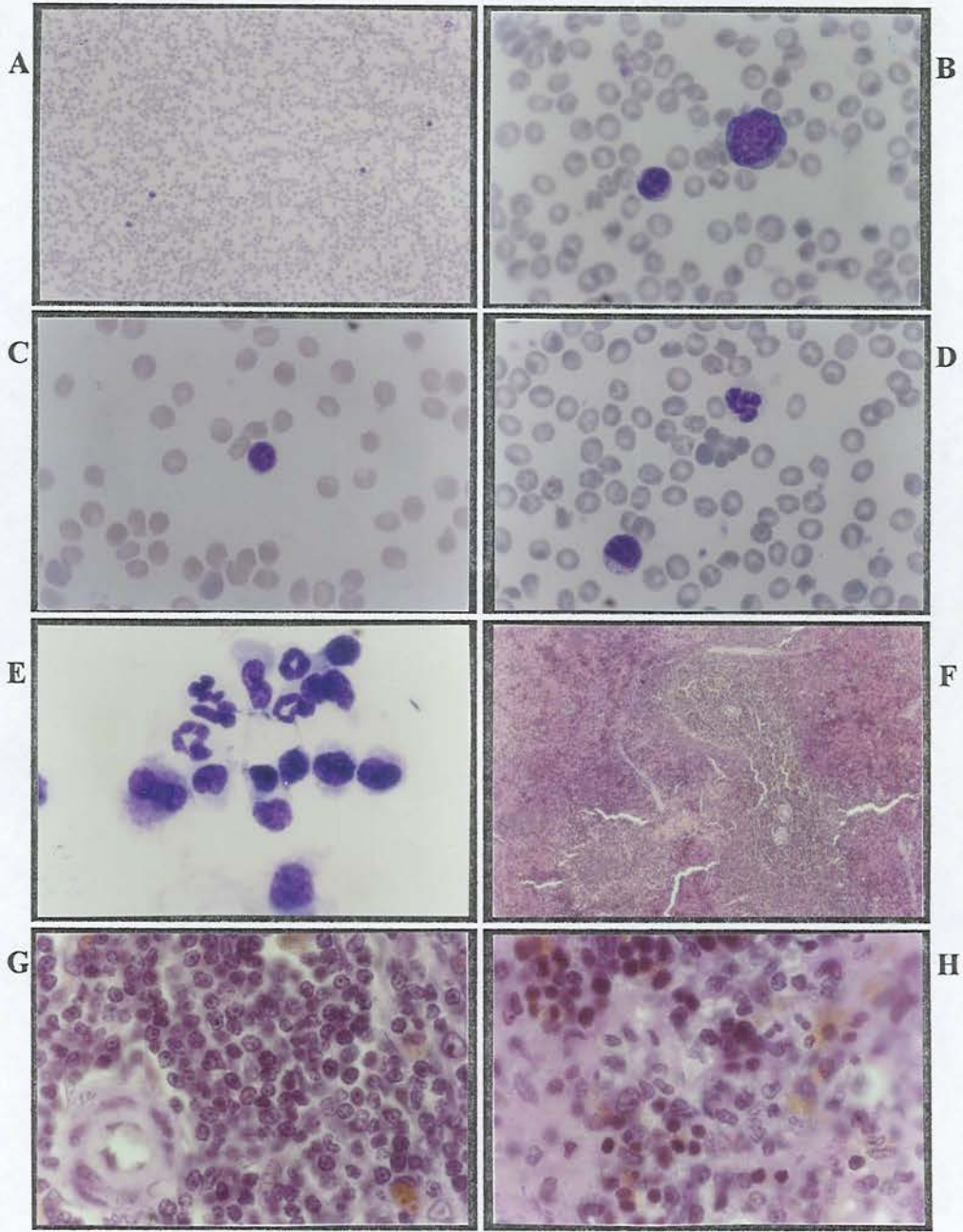
Şekil 3.4. DMSO uygulanmış kontrol grubu hayvanlarına ait değişik doku ve organ preparatlarının görünümleri. (A) May Grünwald-Giemsa ile boyanmış kan yayma preparatının genel görünümü X66. (B) Açık bazofilik monosit X330. (C) Lenfositler X330. (D) Hipertrofi ve nukleus hipersegmentasyonu göstermiş nötrofil X330. (E) May Grünwald-Giemsa ile boyanmış kemik iliği yayma preparatında düzgün halkasal ve koyu bazofilik çekirdekli nötrofil metamiyelositler X330. (F) Hematoksilin-Eosin ile boyanmış dalak kesit preparatının genel görünümü X33. (G) Dalak preparatında ak pulpa ve daralmış merkez arterin görünümü X330. (H) Dalak preparatında kırmızı pulpa ve küçük gruplar oluşturmuş, koyu bazofilik hücrelerin görünümü X330



Şekil 3.5. Kolşisin uygulanmış pozitif kontrol grubu hayvanlarına ait değişik doku ve organ preparatlarının görünümleri. (A) May Grünwald-Giemsa ile boyanmış kan yayma preparatının genel görünümü X66. (B) Koyu bazofilik monosit X330. (C) Koyu bazofilik lenfosit X330. (D) Hipertrofik nötrofil X330. (E) May Grünwald-Giemsa ile boyanmış kemik iliği yayma preparatında membran çıkıntılı normoblastlar X330. (F) Hematoksilin-Eosin ile boyanmış dalak kesit preparatının genel görünümü X33. (G) Dalak preparatında ak pulpa, koyu eosinofilik arter ve koyu bazofilik hücreler ile aralarındaki geniş boşluklar X330 (H) Dalak preparatında kırmızı pulpa ve geniş boşluklar X330

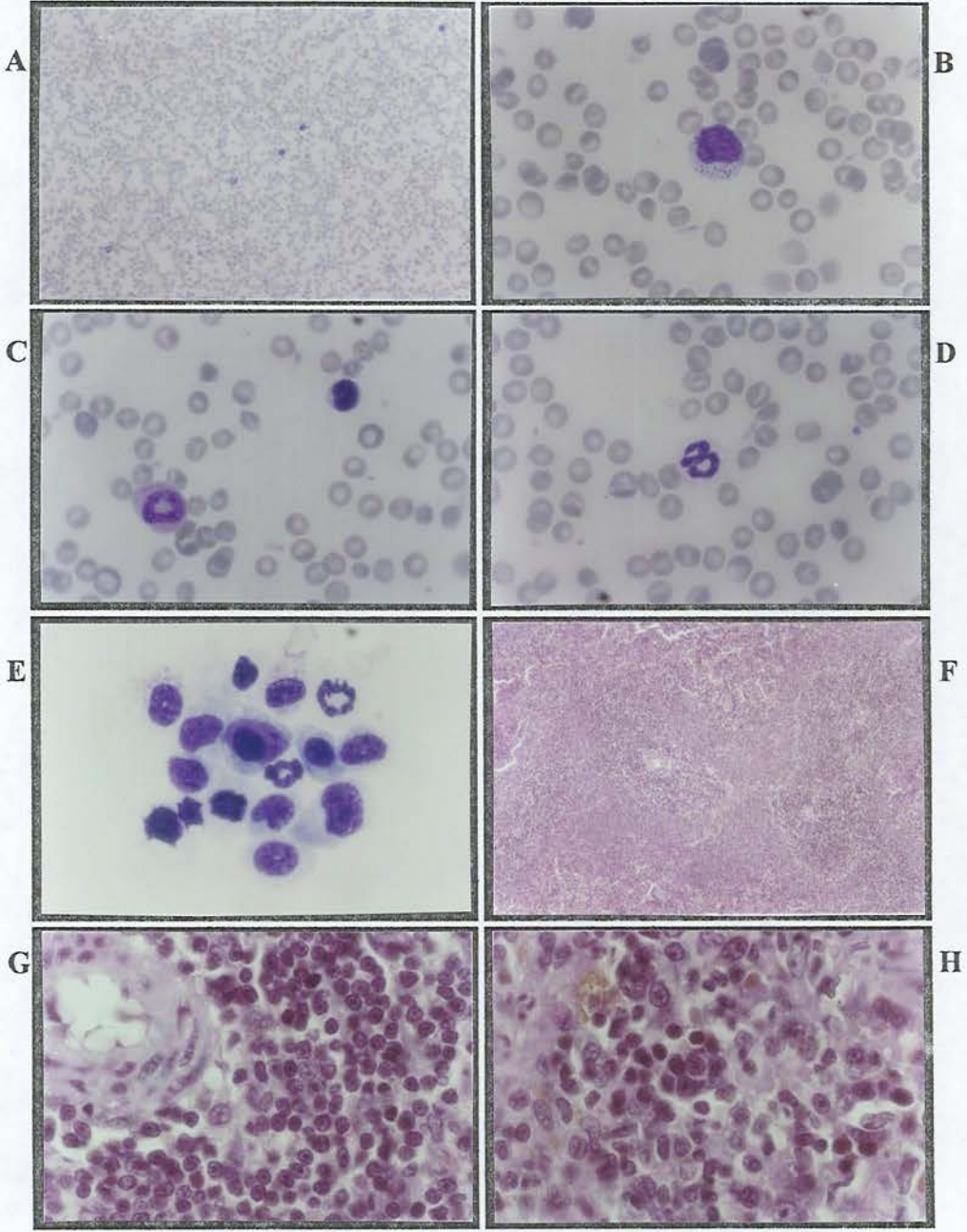


Şekil 3.6. T2 kimyasal maddesi uygulanmış deney grubu hayvanlarına ait değişik doku ve organ preparatlarının görünümleri, (A) May Grünwald-Giemsa ile boyanmış kan yayma preparatının genel görünümü X66. (B) Monosit X330. (C,D) Lenfosit ve hipersegmentasyon göstermiş nötrofiller X330. (E) May Grünwad-Giemsa ile boyanmış kemik iliği yayma preparatında deforme olmuş normoblastlar ve kalın bantlaşma göstermiş nötrofil metamiyelositler X330. (F) Hematoksilin-Eosin ile boyanmış dalak kesit preparatının genel görünümü X33. (G) Dalak preparatında ak pulpa ve merkez arterin görünümü X330. (H) Dalak preparatında kırmızı pulpa ve koyu eosinofil boyanmış geniş alanların görünümü X330

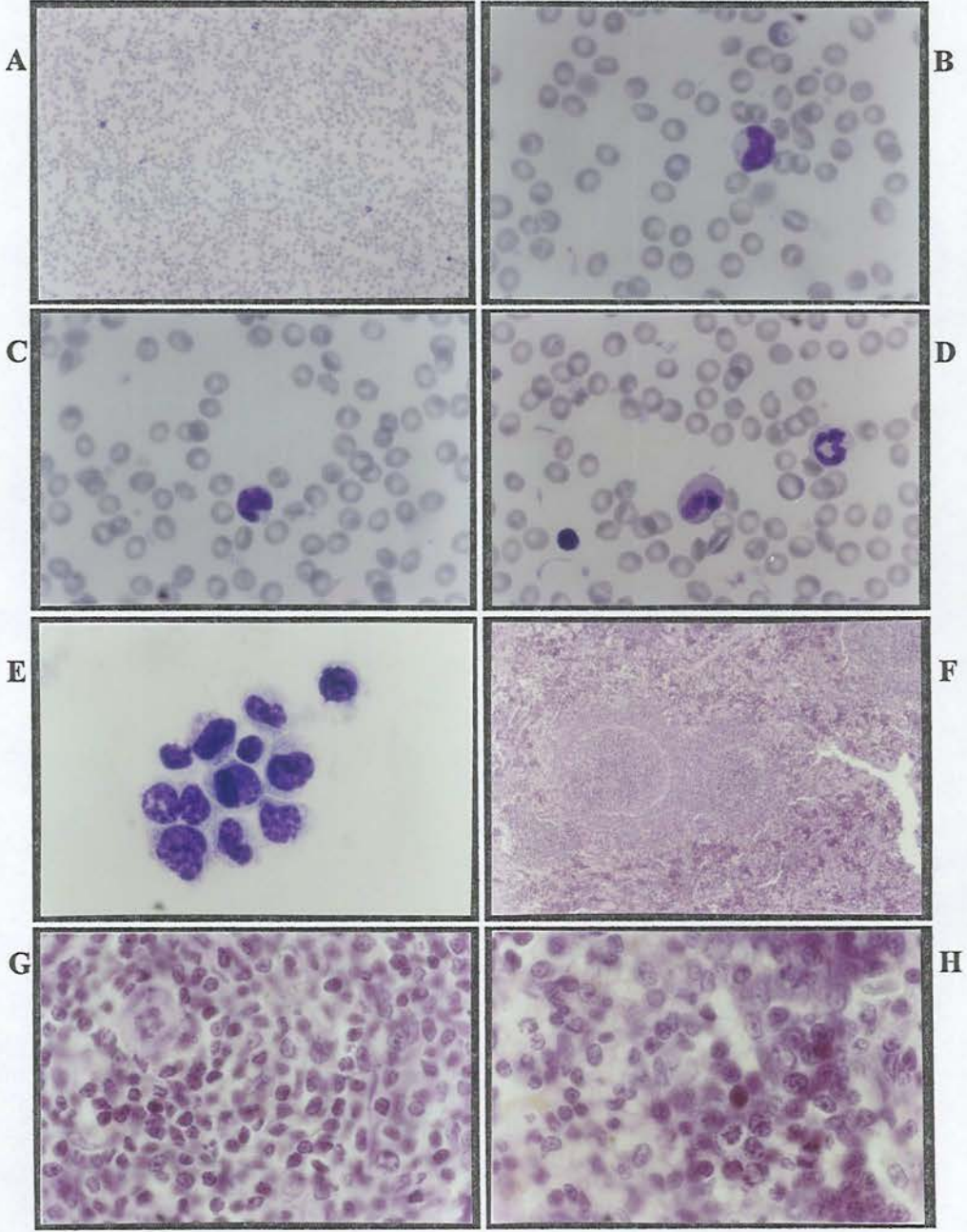


Şekil 3.7. T3 kimyasal maddesi uygulanmış deney grubu hayvanlarına ait değişik doku ve organ preparatlarının görünümleri, (A) May Grünwald-Giemsa ile boyanmış kan yayma preparatının genel görünümü X66. (B) Monosit benzeri hücre X330. (B,C) Lenfositler X330. (D) Büyük granüllü monosit benzeri hücre ve çekirdeği az segmentli nötrofil X330. (E) May Grünwald-Giemsa ile boyanmış kemik iliği yayma preparatında normoblastlar ve çekirdeği yumaklaşmış nötrofil metamiyelositler X330. (F) Hematoksilin-Eosin ile boyanmış dalak kesit preparatının genel görünümü X33. (G) Dalak preparatında ak pulpa ve arterin görünümü X330. (H) Dalak preparatında kırmızı pulpa ve bazofilik hücreler ile aralarındaki koyu eosinofilik geniş alanların görünümü X330

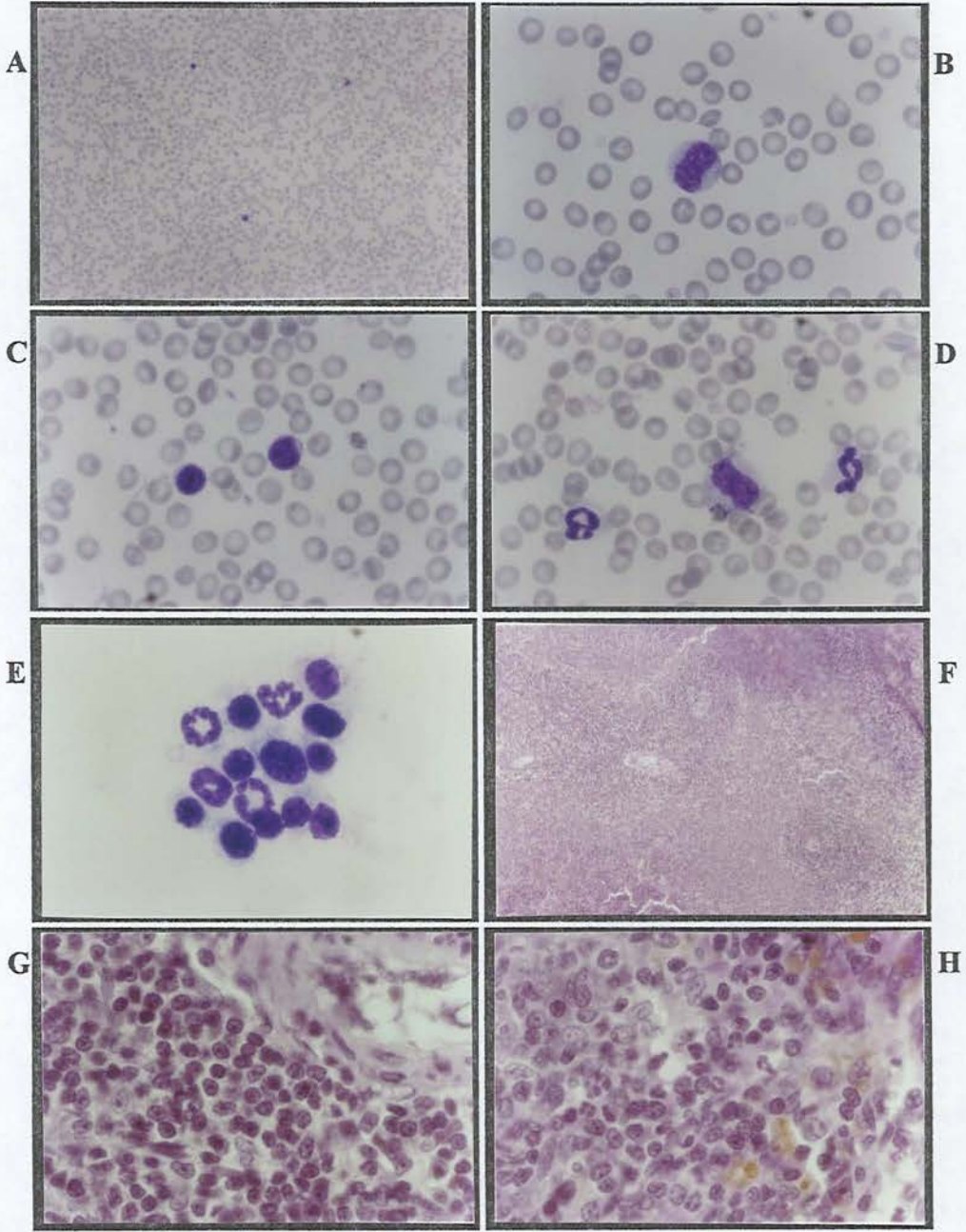




Şekil 3.8. T4 kimyasal maddesi uygulanmış deney grubu hayvanlarına ait değişik doku ve organ preparatlarının görünümleri, (A) May Grünwald-Giemsa ile boyanmış kan yayma preparatının genel görünümü X66. (B) Büyük ve granüllü monosit X330. (C) Lenfosit ve sitoplazması eosinofilik, segmentsiz halkasal çekirdekli nötrofil X330. (D) Nötrofil X330. (E) May Grünwald-Giemsa ile boyanmış kemik iliği yayma preparatında membran çıkıntılı normoblastlar ve çekirdeği kalın bantlaşma gösteren nötrofil metamiyelositler X330. (F) Hematoksilin-Eosin ile boyanmış dalak kesit preparatının genel görünümü X33. (G) Dalak preparatında ak pulpa ve arterin görünümü X330. (H) Dalak preparatında kırmızı pulpanın görünümü X330



Şekil 3.9. T5 kimyasal maddesi uygulanmış deney grubu hayvanlarına ait değişik doku ve organ preparatlarının görünümleri, (A) May Grünwald-Giemsa ile boyanmış kan yayma preparatının genel görünümü X66. (B) Monosit X330. (C) Küçük monosit X330. (D) Küçük lenfosit ve eosinofil sitoplazmalı nötrofil X330. (E) May Grünwald-Giemsa ile boyanmış kemik iliği yayma preparatında az deforme olmuş normoblastlar ve çekirdeği bant kalınlaşması göstermiş nötrofil metamiyelositler X330. (F) Hematoksilin-Eosin ile boyanmış dalak kesit preparatının genel görünümü X33. (G) Dalak preparatında geniş boşluklu ak pulpa ve daralmış, eosinofilik merkez arter X330. (H) Dalak preparatında kırmızı pulpa ve geniş boşluklar ile boya almamış hücresel yapılar X330



Şekil 3.10. T7 kimyasal maddesi uygulanmış deney grubu hayvanlarına ait değişik doku ve organ preparatlarının görünümleri, (A) May Grünwald-Giemsa ile boyanmış kan yayma preparatının genel görünümü X66. (B) Büyük monosit X330. (C) Lenfositler X330. (D) Büyük monosit ve çekirdeği az segmentleşmiş nötrofiller X330. (E) May Grünwald-Giemsa ile boyanmış kemik iliği yayma preparatında normoblast ve nötrofil metamiyelositlerin görünümü X330. (F) Hematoksilin-Eosin ile boyanmış dalak kesit preparatının genel görünümü X33. (G) Dalak preparatında ak pulpa ve çapı genişlemiş merkez arterin görünümü X330. (H) Dalak preparatında kırmızı pulpa ve hücreler arası geniş boşlukların görünümü X330

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hücrelerde mitozu durdurucu etkisi olduğu bilinen, örneğin kolşisin gibi maddeler çok hücreli organizmalara uygulandığında, organizma içinde mitotik aktivite gösteren tüm hücrelerin bu aktivitelerini olumsuz olarak etkileyeceği düşünülür. Çalışmamızda da kullandığımız yüksek organizmalı deney hayvanlarına antimitotik etkisi bilinen kolşisin uygulandığında, yaşam boyu mitotik aktivite gösteren kan hücreleri üzerinde olumsuz etki yapması, bu düşüncüyü doğrular niteliktedir. Çalışmamızda kolşisin uygulanan tüm hayvan gruplarının kan sayımları ve yayma kan preparat incelemeleri ile kemik iliği ve dalak preparatlarına ait bulguların tümünde, mitotik aktiviteleri yavaşlayan hücrelerin, genelde sayıca azaldıkları saptanmıştır. Negatif kontrol grubu hayvanları ile karşılaştırıldığında, pozitif kontrol grubu hayvanların kanlarındaki lökosit seriye ait, örneğin lenfosit ve nötrofillerin 2/3 oranında azalması, çalışmamızın en çarpıcı bir sonucu olup, bu ani düşüşte lökositlerin ortalama 6 saatlik yarılanma ömürlerinin [12] etkisi büyüktür. Teerenhovi ve arkadaşları [13] tarafından, kolşisin uygulanmış deney hayvanlarının kanlarındaki lenfosit hücre sayısının azalmış olduğu belirtilmiştir. Ilfeld ve arkadaşları [54] tarafından yapılmış olan bir diğer çalışmada ise, deney hayvanlarına bir hafta süre ile kolşisin uygulanmış ve süre sonunda yapılan kan sayımlarında, lökositler seriye ait tüm hücrelerin sayısal olarak belirgin biçimde azalmış oldukları tespit edilmiştir. Daha önce yapılan tüm bu çalışmalar, yaptığımız çalışma ile paralellik göstermiş olup, kolşisinin mitotik inhibitör olduğunu ortaya koyan kanıtlar niteliğindedir.

Kolşisinin lökositler üzerindeki bu olumsuz etkisi çalışmamızın kemik iliği preparatlarında, en belirgin tanınma özelliği olan lökosit serisine ait öncüllerinden nötrofil metamiyelosit hücrelerine bakıldığında sayısal değerinin sıfır bulunması, kolşisinin antimitotik etkili olduğunun bir diğer kanıtı olarak kabul edilebilir. Lökositler seriye ait hücrelerin yapımı organizmalarda birden fazla doku ve organda gerçekleşmektedir [4]. Bu nedenle organizmadaki sayıları fazla olması gerekirken, çalışmamızda DMSO kontrol grubu hayvanların lökositlerinde sayıca azalma, DMSO'nun çalışmalarda sözü edilen toksik etkisinin olduğunu gösterir niteliktedir [6]. Bu neden ile DMSO organik çözücüsünün, canlı yapılara uygun olmadığı, yapılan

çalışmalar ile kanıtlanmıştır [55]. Çalışmalarımız ve daha önce örnek olarak verilen bilimsel çalışmalar, deney hayvanlarına uygulanan bir mitotik inhibitörün etkisinin, lökosit sayılarına bakılarak ortaya konulabileceğini göstermektedir. Bu yaklaşımla negatif, DMSO ve pozitif kontrol grubu hayvanlar ile, T kodlu maddelerin uygulandığı hayvanların kan parametreleri çalışmamızda karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. T kodlu maddelerin uygulandığı hayvanların kanlarındaki lökosit sayıları da karşılaştırmalı olarak incelendiğinde, bu maddelerden, özellikle T3 ve T5 maddelerinin, negatif kontrole oranla, lökosit hücre sayılarında bir azalmaya neden olduğundan olumsuz bir etki yaptığı tespit edilmiştir. Hücre çoğalması üzerine olumsuz etkisi kesin olarak bilinen kolşisin uygulanmış hayvanların dalağı genelde bazofilik boyanma özelliği göstermiş, ayrıntılı incelemelerde de lenfositlerin lenfoblastlara oranla artmış olduğu görülmüştür. Olgun lenfositlerdeki bu artış, dalak kesitlerindeki nodüllerin klasik görüntülerinin kaybolmasına da neden olmuştur. Bu durum, kolşisinin etkisiyle lenfoblast üretiminin durduğunu, bunun sonucu olarak dalakta açık sitoplazmalı, olgunlaşmamış lenfoblast sayısının azaldığını göstermektedir. Çalışmamızda, dalak görüntülerinin periferik kandaki lökosit parametrelerini destekleyen bu görüntüsü yanında lenf nodüllerinin küçülmesi ve diffüze olarak belirgin görüntüsünü kaybetmesi de bir diğer destekleyici unsurdur. Kolşisin uygulanmış hayvanların dalak preparatları ayrıntılı incelendiğinde,, negatif kontrole göre hücre sayısında ve çeşitinde belirgin azalma yanında, hücrelerin belirli doğrultuda dizilim gösterdikleri dikkat çekmektedir. Kolşisinin dalak üzerindeki bu çarpıcı etkileri, test edilen bazı T kodlu maddeler uygulandığında da görülmüştür. Çalışmamızda da tüm T kodlu maddelerin uygulandığı hayvan dalaklarında, normal görümlü belirli çapta, sınırları belli, açık ve koyu alanların görüldüğü nodüllerin tespit edilememesi, bu hayvanlarda lenf yapım ve olgunlaşmasının olumsuz olarak etkilediğinin bir ifadesidir. T2, T3 ve T7 maddelerinin uygulandığı hayvanların dalak kesitlerinde tespit edilmiş ve bulgularımızda “sarı boya almış” olarak tanımladığımız alanların, eritrosit hücreleri olduğu düşünülmektedir. Bu düşünce, dolaşım kanıyla gelen eritrositlerin, azalan lenfositlerin oluşturduğu boşlukları doldurmasıyla açıklanabilir. Ancak, T2 ve T3 maddeleri uygulanmış hayvanların dalak kesitlerinde olduğu gibi oluşan bu boşlukların büyüklük ya da genişliği düşünüldüğünde, sadece eritrositlerin bu boşlukları doldurmasını düşünmek yanlışlığı

olur. Organizma bedeninde hücre ve dokular arası tüm boşlukların bağ ve destek dokularıyla kaplı oldukları ve bu dokularda hücre sitoplazmaları ve amorf ara maddelerinin genel olarak eosinofilik boyanma özelliği gösterdiği bildirilmektedir [1, 3, 56]. Bu bilgiler ışığında T2 ve T3 uygulanmış hayvan dalaklarında, hücreler arası boşluklarda yoğun olarak gözükten eosinofilik alanların, bağ dokusu olduğu düşünülmektedir. Ayrıntılı incelemelerde gözlenen uzun, oval ya da iğ biçimli çekirdeklere sahip ve bağ dokusu hücrelerinin özelliğini gösteren yapılardaki artış bu görüşü desteklemektedir. Antimitotik maddelerin damar yapıları üzerine etkileri, kolşisin uygulanmış ve negatif kontrol grubu hayvanların dalak arterleri karşılaştırılacak olursa, antimitotik etkili olan kolşisinin, arter lümeni ve media tabakasını genişlettiği, bir bulgu olarak çalışmamızda ortaya çıkmıştır. Çalışmamızın devamında, hemen tüm T kodlu maddelerin uygulandığı hayvanların dalak arterleri üzerine etkilerinin kolşisine benzemesi nedeniyle, antimitotik etkili oldukları söylenebilir. Ancak, tüm bu yaklaşımlar ışığında antimitotik etkileri test edilen T kodlu maddeler, kendi aralarında karşılaştırmalı olarak değerlendirildiklerinde, en etkili antimitotik olarak T3 ve T5 maddelerinin olduğu söylenebilir. Ancak bu maddelerin, rakamsal olarak lökosit hücre sayılarına etkileri, DMSO grubu lökosit sayılarıyla paralellik göstermektedir. Bu maddelerin, DMSO içinde çözülerek hayvanlara uygulandığı göz önünde tutulduğunda, lökosit sayılarındaki azalmanın, uygulanan karışım içindeki DMSO etkisiyle olabileceği de düşünülebilir. Bu yaklaşım gözardı edilerek, mitotik aktivite üzerine etkileri test edilen tüm T kodlu maddelerin lökosit sayılarına etkileri karşılaştırmalı olarak incelenip, organizmanın tüm hücrelerine genelleştirildiğinde, T3 ve T5 maddelerinin en etkili mitoz durdurucu madde oldukları ortaya çıkmaktadır. Kemik iliği preparatlarındaki lökositler seriyeye ait nötrofil metamiyelosit hücrelerinin incelenmesi ile ortaya çıkan 4/5 oranı diğer T kodlu maddelerle karşılaştırıldığında en fazla azalma oranını gösterdiğinden T3 ve T5 maddelerinin en etkili olduğu ortaya çıkar. Ayrıca, lökositler seriyeye ait hücrelerin dramatik bir şekilde azalmasına yönelik bu bulgu, periferik kandaki lökositler seriyeye ait hücrelerdeki sayısal azalmanın, bu maddelerin çözücüsü olarak kullanılan DMSO etkisi nedeniyle olmadığını da bir kanıtı olarak kabul edilebilir.

Çalışmamızda, eritrosit yapım merkezi olan miyeloid dokular incelendiğinde, eritrosit prekürsörü olan normoblast hücrelerinin sayısı, kolşisin uygulanmış olan hayvanlarda yüksek bulunmuştur. Kolşisin uygulanmış hayvanlarda periferik kana bakıldığında, sayıca yüksek olduğunu gördüğümüz eritrositlere karşın, lökositlerin düşük olduğu saptanmıştır. Aynı deney grubunun kemik iliği preparatları incelendiğinde, lökositler seri öncüllerinden nötrofil metamiyelositlere hiç rastlanılmamıştır. Bu durumda periferik kanda eritrosit yarılanma ömürlerinin, lökositlere oranla fazla olduğu [12] düşünülerek, kemik iliğinde üretimi durdurulmuş tüm hücreler arasında normoblastların sayıca yoğunluk göstermiş olması, olası bir durum olarak karşılanmıştır. Benzer olarak, bulgularımızda negatif kontrole oranla, kolşisin uygulanan pozitif kontrol grubu hayvanların, periferik kanlarındaki eritrosit miktarındaki artış, kolşisinin dalak üzerindeki olumsuz etkileriyle açıklanabilir. Çalışmamızdaki dalak incelemeleri, kolşisin uygulanmış hayvanlarda, dalağın küçülerek dumura uğradığı ve fonksiyonunu yapamaz hale geldiğini göstermiştir. Daha önceki çalışmalar, en önemli görev olarak dalağın, eritrosit yıkıcı bir organ olduğunu belirtmektedir [4, 56, 57]. Kolşisinin etkisiyle, fonksiyonunu yitiren dalağa sahip pozitif kontrol grubu hayvanların periferik kandaki ömrünü doldurmuş eritrositler, büyük oranda yok edilmediğinden, total eritrosit sayısında bir artış olarak kendini göstermektedir. Pozitif kontrol grubu hayvanların periferik kan eritrosit incelemelerimizde, deforme olmuş ve şekil bozukluğu gösteren eritrositlerin varlığı da, bu yaklaşımı destekler niteliktedir. Deney grubu hayvanlarının kemik iliği preparatlarına bakıldığında kolşisin uygulanmış grupların kemik iliğine oranla normoblastların sayıca en fazla, T3 ve T4 kolşisin grubuna yakın olarak da T2 ve T5 maddelerinde buldukları görülmüştür. Bu bulgular T2, T3, T4 ve T5'in normoblastlar üzerine kolşisine benzer bir etki gösterdiğini düşündürür. Ancak, bu dört madde arasından T3 ve T5 uygulanmış grubun kemik iliği normoblastlarında, diğer test grubu kemik iliklerine oranla, daha bazofilik boyanma özelliği ve görülen biçimsel bozukluklar bu maddelerin normoblastların olgunlaşması üzerine olumsuz etkili olduğunun ve dolayısı ile diğerlerine oranla kolşisine daha yakın etkilerinin olduğunun bir kanıtı olarak gösterilebilir. Yaptığımız bu tartışmalar, T kodlu maddeler içinde T3 ve

T5 maddelerinin diğer T kodlu maddelere oranla daha etkili olduğunu ortaya koyar niteliktedir.

Yapılan çalışmalar, kolşisin gibi antimitotik etkili maddelerin kimyasal yapılarında, metil (-CH<sub>3</sub>) grubunun sayıca artması, maddenin mitoz durdurucu etkisini arttırdığını göstermiştir [7]. Çalışmamızda test edilen ve mitozu engelleyici en etkili maddelerden biri olan T5 kodlu maddenin kimyasal yapısına bakıldığında (Şekil 1.3), diğer test maddelerinde olmayan iki adet metil grubunun olduğu görülür. Bu durumda T5'in antimitotik etkisi, yapısındaki metil gruplarından kaynaklanabileceği söylenebilir. Çalışmamızda ortaya çıkan en etkili diğer bir antimitotik madde olan T3 maddesinin kimyasal yapısında, beşgen ve altıgen olmak üzere, diğer test maddelerinin hiç birinde görülmeyen dört adet kimyasal halka içerdiği görülür (Şekil 1.3). Çalışmalarla antimitotik etkileri kanıtlanmış örneğin, *podofillotoksin* ve türevleri gibi maddelerin yapılarında da benzer halkaların çokluğu ortaya konmuştur [7, 18]. Bu durumda mitotik inhibitörlerin kimyasal yapılarındaki bu halkalarının sayıca fazla olması, etkilerinin arttıracığı düşüncesini doğurur.

Test edilen maddelerin tümünün kimyasal yapılarında, birbirine komşu olmayan iki kükürt elementinin (S) yer aldığı ve bir beşgen halkasının varlığı ortak bir özellik olarak dikkati çekmektedir (Şekil 1.3). Bu ortak yapı nedeniyle bu test maddelerinin etkileri de benzer olarak beklenir ve bulgularımız da bu doğrultudadır. T kodlu maddelerin sentezinde model olarak kullanılan ana maddenin *Bis tetrathiafulvalene* olduğu bildirilmiştir [33, 58]. Ancak literatür taramalarımızda, aynı ya da benzer yapıya sahip hiç bir antimitotik kimyasal madde yapısına rastlanılmamıştır. Tüm T kodlu maddelerin etkileri, kolşisine benzerlik göstermesine rağmen, bazı farklı bulguların ortaya çıkması, kimyasal yapılarında, sözünü ettiğimiz farklılık nedeniyle olduğu düşünülebilir. Diğer taraftan, çoğu test maddelerinin çoğunun yapısında bulunan (Şekil 1.3) çift bağlı kükürt (=S) elementi, sözü edilen farklı etkilerin ortaya çıkmasına neden olduğu düşünülebilir.

Kimyacıların sentez ettikleri ve kendi yöntemleriyle antimitotik etkili olduklarını iddia ettikleri, T kodlu maddeler, çalışmamızda bu iddiayı hepsi için kesin olarak doğrular nitelikte bulunmamıştır. Kontrol grubu çalışmaları, ortaya koyduğumuz ve çalışmamızda uyguladığımız yöntemin güvenilirliğini gösterdiğinden, benzer testler için



uygulanabilir niteliktedir. Çözülebilir özelliğe sahip olan maddelerin, organizmaya enjeksiyonu sonucu, etkilerinin RES'e ait doku ve organlardan dalak ve kemik iliğinde aranması biçiminde uyguladığımız yöntemimizde T kodlu maddelerin, iddia edilen etkilerinden sapmasının, aşağıda belirteceğimiz nedenlerden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Deneyimizde, kullandığımız T kodlu maddeler, sadece DMSO'da çözülebilmektedir. Bu nedenle, zararlı etkisi kanıtlanmış bu çözücünün [6] hücreler üzerindeki etkisi, deneyin sonucunu da olumsuz etkileyebilmektedir. Oysa ki kimyacıların yönteminde kullanılan araçların, saf maddeyi test ettiği bildirilmiştir. Bu olumsuzluğun giderilmesi, organizmaya zararlı etkileri olmayan bir çözücünün kullanılması ya da oral yol ile verilmesi gibi farklı bir yöntem uygulanmasıyla mümkün olabilir.

Kimyacıların aksine, canlı organizmada etkilerini gösterebilmek için belirli cins, yaş, ağırlık gibi özelliklerin dikkat ederek kullandığımız deney hayvanlarının biyolojik savunma mekanizmaları, maddelerin antimitotik etkileri üzerinde değişikliklere neden olabilir. Sözü edilen bu olumsuz etkinin giderilmesi, hedef organ, doku ya da hücrelerin saf kültürleri kullanılarak *in vitro* yöntemler kullanılarak en aza indirilebilir.

Test edilen maddenin sterilizasyonu, hedef organa direk olarak verilmesi, test edilecek maddeyi içeren solüsyonun enjekte edilen total miktarı, enjeksiyon süresi ve toplam deney süresi organizmadaki etkilerini değiştirebilecek nedenler olarak düşünülebilir.

Sonuçları etkileyebilecek diğer faktörler arasında, uygulanan maddelerin etkilerini ortaya koyabilecek (lenf bezleri, peyer plakları, tonsilla, apendiks, timus, karaciğer, deri ...v.b.) tüm organ ve dokuların incelenmesi ve uygun preparasyon tekniklerinin hatasız kullanılması sayılabilir.

Bu yaklaşımla, sahip olduğumuz olanak ve bilgiler doğrultusunda, özel özen göstererek sürdürdüğümüz çalışmalarımız beş değişik yapıda T kodlu maddelerin etkileri, tez metnimizin değişik yerlerinde sözünü ettiğimiz biçimde, net olarak ortaya konmuştur. Sonuç olarak, organizmanın mitotik aktiviteleri üzerinde etkili olduğu düşünülen herhangi bir maddenin, yaptığımız çalışmaya benzer ve önerilen biçimde test edilebileceği ve bu nedenle, konunun değişik çalışmalara ışık tutacağı inancındayız.

## KAYNAKLAR

1. CİRELİ, E., *Genel Histoloji, Hücre ve Dokular*. 2. Baskı, Murat Ofset Karşıyaka, İzmir, 1983.
2. DEMİRSOY, A., *Yaşamın Temel Kuralları, Genel Biyoloji-Genel Zooloji*. Hacettepe Üni. Fen Fakültesi Biyoloji Böl., Ankara, 1991.
3. ERBENGİ, T., *Histoloji 1*. 2. Baskı, Beta Yayın Dağıtım, İstanbul, 1987.
4. PAKER, Ş., *Histoloji*. Uludağ Üni. Basımevi 32. Yayın, Bursa, 1990.
5. OZBAN, N., *Hücre, Sitoloji Ders Kitabı*. 2. Baskı, Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 1988.
6. CORREIA, J. J., *Effects of Antimitotic Agents on Tubulin- Nucleotide Interactions.*, *Pharmac. Ther.*, 52, 127-147, 1991.
7. IWASAKI, S., *Antimitotic Agents: Chemistry and Recognition of Tubulin Molecule.*, *Medicinal Research Reviews*, 23(2), 183-198, 1993.
8. ALBERTS, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., *Molecular Biology of the Cell*. Second Edition, Garland Publishing, New York, USA, 1989.
9. CANDE, W.Z., *Reactivation of Mitosis In Vitro.*, *TIBS*, 11, 447-449, 1986.
10. KUMAR, M. and Robbins, S., (çeviren: Uluoğlu, Ö.), *Basic Pathology*. 4. Baskı, Güneş Kitabevi, W.B. Sounder Company, 1990.
11. ALBERTS, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., *Molecular Biology of the Cell*. Third Edition, Garland Publishing, New York, USA, 1994.
12. KAYAALP, O., *Tıbbi Farmakoloji*. 1. Cilt, 5. Baskı, Ankara, 1989.
13. TEERENHOVI, L., Wasenius, V.M., Franssila, K., Keinanen, M. and Kuunitila, S., *A Method For Analysis of Cell Morphology, Banded Karyotype and Immunoperoxidase Identification of Lymphocyte Subset on the Same Cell.*, *Brief Scientific Reports*, 5(85), 602-604, 1985.
14. COZON, G., Cannella, D., Langevin, A.P., Jeannin, M., Trublereau, P., Ecochard, R. and Revillard, J.P., *Transient Secretory IgA Deficiency in Mice After Cyclophosphamide Treatment.*, *Clinical Immunology and Immunopathology*, 61(1), 93-102, 1991.

## KAYNAKLAR (Devam)

15. DARROUDİ, F. and Natarajan, A.T., *Induction of Sister Chromatid Exchanges Micromuklei and Gene Mutations by Indirectly Acting Prommutagens Using Human Hepatoma Cells as an Activation System.*, Acta., 22, 445-453, 1994.
16. MANFREDİ, J.J. and Horwitz, S., *Taxol: An Antimitotic Agent With Any Mechanism of Action.*, Pharmac. Ther., 25, 83-125, 1984.
17. DIEZ, J.C., Avila, J., Nieto, J.M. and Andreu, J.M., *Reversible Inhibition of Microtubules and Cell Growth by the Bicyclic Colchicine Analogue MTC.*, Cell Motility and The Cytoskeleton, 7, 178-186, 1987.
18. PEYROT, V., Leynadier, D., Sarazin, M., Briand, C., *Mechanism of Binding of the New Antimitotic Drug MDL 27048 to the Colchicine Site of Tubulin; Equilibrium Studies.*, Biochemistry, 31, 11125-11132, 1992.
19. BOWMAN, W.C. and Rand, M.J., *Text Book of Pharmacology*. Second Edition, Blackwell Scientific Publications, London, 1980.
20. PRESTON, T. M., King, C. A., Hyams, J. S., *The Cytoskeleton and Cell Motility*. First published, Typesetting by Thomson Press, New York, 1990.
21. JORDAN, M.A., Thrower, D., Wilson, L., *Effects of Vinblastine, Podophillotoksin and Nocodazole on Mitotik Spindles.*, Journal of Cell Science, 102, 401-416, 1992.
22. HANAUSKE, A.R., Depenbrock, H., Shirvani, D. and Rastetter, J., *Effects of the Microtubule-Disturbing Agents Docetaxel, Vinblastine and Vincristine on Epidermal Growth Factor-Reseptor Binding of Human Breast Cancer Cell Line in vitro.*, Eur. Journal of Cancer, 11(30), 1688-1694, 1994.
23. LEE, L.F., Maly, C.S., Lofquist, A.K., Hoaften-Day, C., J.P.Y., White, C.M., Martin, B.K. and Haskill, J.S., *Taxol- Dependent Tanscriptional Activation of IL-8 Expression in A Subset of Human Ovarian Cancer.*, Cancer Research, 56, 1303-1308, 1996.
24. LEVASSEUR, M. P. and Brown, D.L., *Vimentin Dynamicks During the Mitogenik Stimulation of Mouse Splenic Lymphocytes.*, Cell Motility and The Cytoskeleton, 8, 227-237, 1987.

## KAYNAKLAR (Devam)

25. WINDHOLDZ, M., Budavari, S., Blumetti, R.F. and Otterbein, E.S., *The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals Drugs and Biologicals*. Tenth Edition, USA, 1983.
26. REYNOLDS, J. E. F., *Martindale the Extra Pharmacopoeia*. 29. Press, The Pharmaceutical Press, London, 1989.
27. LEVY, M., *The Rationale for Antimitotic Treatment Prior to Bone Marrow Transplantation.*, *Transplantation*, 6(41), 790-792, 1986.
28. JENSEN, C. G., Davison, E.A., Bowsen, S. S. and Rieder, C. L., *Primary Cilia Cycle in Pt K2 Cells: Effects of Colcemid and Taxol on Cilia Formation Resorption.*, *Cell Motility and The Cytoskeleton*, 7, 187-197, 1987.
29. DONOWSKI, B. A., *Fibroblast Contractility and Actin Organization are Stimulated by Microtubule inhibitors.*, *Journal of Cell Science*, 93, 89-108, 1991.
30. MAKOWSKI, L., *Taxol Found on Tubulin.*, *Nature*, 375, 361-362, 1995.
31. VOEGELEIN, F. G., Guenard, D., Levelle, F., Goff, M. T. L., Mangatal, L. and Potier, P., *Relationships Between the Structure of Taxol Analogues and Their Antimitotic Activity.*, *J. Med. Chem.*, 34, 992-998, 1991.
32. ORHAN, M., *Benzenin Farelerde Yapmış Olduğu Hemapatolojik ve Histopatolojik Bulgular*. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üni., Fen Bil. Enstitüsü, Eskişehir, 1988, 37 sayfa.
33. BRYCE, M. R., *Carrent Trends in Tetrahydrofulvalene Chemistry: To Wards Increased Dimensionality*, *J. Mater. Chem.*, 5(10), 1481-1496, 1995.
34. LEVASSEUR, M.P. and Brown, D.L., *Vimentin Dynamics During the Mitogenic Stimulation of Mouse Splenic Lymphocytes*, *Cell Motility and Cytoskeleton.*, 8(3), 227-237, 1987.
35. BİLLS, N. D., Koury, M. J., Clifford, A. J., Dessypris, E. N., *Ineffective Hematopoiesis in Folate-Deficient Mice*, *Blood.*, 9(79), 2273-2280, 1992.
36. RAVİD, M., Chen, B., Bernhcim, J., and Kedar, I., *Ascorbisc acid-Induced Regression of Amyloidosis in Experimental Animals*, *Br. J. exp. Path.*, 66, 137-141, 1985

## KAYNAKLAR (Devam)

37. SARKAR, D., Sharma, A., and Talukder, G., *Differential Protection of Chlorophyllin Against Clastogenic Effects of Chlordane in Mouse Bone Marrow in vivo.*, Mutation Research, 301(1), 33-38, 1993.
38. ASHBY, I., Vogel, E. W., Tinwell, H., Callander, R. D., Shuker, D. E. G., *Mutagenicity to Salmonella, Drosophila and the Mouse Bone Marrow of the Human Antineoplastic Agent Fotemustine: Prediction of Carcinogenic Potency.*, Mutation Research., 286, 101-109, 1993.
39. SILBERNAGL, S., DESPOPULOS, A., (Çeviren: HARİRİ, N. ), *Renkli Fizyoloji Atlası. Ege Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı*, İzmir, 1989.
40. BERKARDA, B., ve Eyüboğlu, H., *Hematoloji Laboratuvar Yöntemleri*. Ar Basım-Yayım ve Dağıtım A. Ş., İstanbul, 1983.
41. PROPHET, E. B., *Laboratory Methods in Histotechnology*. American Registry of Pathology, Washington, D. C., 1992.
42. LEUNG, K. P., Russell, S.W., Le Blanc, P. A., and Caballero, S., *Heterogeneity Among Macrophages Cultured form Mouse Bone Marrow.*, Cell Tissue Research., 239(3), 693-701, 1985.
43. HAYHOE, F. G. J., Flemans, R. J., *A Clour Atlas of Haematological Cytology*. Wolfe Medical Publications Ltd., Netherlands, 1982.
44. SOBTİ, R.C., Bharwaj, D. K., and Gupta, B. D., *Spontaneous Chromosomal Aberrations in the Peripheral Blood Lymphocytes of Patients With Cancer.*, Med. Sci. Res., 19, 23-25, 1991.
45. HENDERSON, L., Fedyk, J., Windebank, S., Smith, M., *Induction of Micronuclei in Rat Bone Marrow and Peripheral Blood Following Acute and Subchronic Administration of Azothioprine.*, Mutation Research., 291, 79-85, 1993.
46. TAMER, A. Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M., Oğultekin, R., *Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu*. Anadolu Üni., Eskişehir, 1989.
47. ONUR, M.A., *Fizyoloji Laboratuvar Kılavuzu*. Hacettepe Üni. Fen Fakültesi Basımevi., Ankara, 1991.

## KAYNAKLAR (Devam)

48. FAROOGI, Z., Törnquist, M., Ehrenberg, L., and Natarajan, A. T., *Genetoxic Effects of Ethylene Oxide and Propylene Oxide in Mouse Bone Marrow Cells.*, Mutation Research., 288(2), 223-228, 1993.
49. ROONEY, D. E., Czepulkowski, B. H., *Human Cytogenetics.* Oxford Üni. Press, Newyork, 1992.
50. CLARK, G., *Staining Procedures.* Fourth edition, Williams & Wilkins, U. S. A., 1981.
51. AMER, S. M., and Aboul-ela, E. I., *Cytogenetic Effects of Pesticides III. Induction of micromuklei in Mouse Bone Marrow by The Insecticides Cypemethrin and Rotetone.*, Mutation Research, 155, 135-142, 1985.
52. GRIDLEY, M. F., *Laboratuvar El Kitabı-Hususi Boyama Teknikleri.* (Çeviren: Aker, O. N. ), Gülhane As. Tıp Akademisi Patoloji Anatomi Enstitüsü Yayını, Ankara, 1954.
53. BANCROFT, J. D., Stevens, A., *Theory and Practice of Histological Techniques.* Churchill Living Stone, Newyork, 1977.
54. ILFELD, D. N., Mazar, A., Garty, M., Fink, G., Spitzer, S., Pecht, M., Netzer, L., Trainin, N., Kuperman, O., *Effect of Oral Colchicine on T Cell Subsets, Monocytes and Concanavalin A-Induced Suppressor Cell Function in Asthmatic Patients.*, Clinical Allery., 16, 407-416, 1986.
55. HAYASHI et al., *In vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay.*, Mutation Res., 312, 293-304, 1994.
56. AKAY, T. M., *Genel Histoloji.* İmaj Yayınevi, Ankara, 1996.
57. KAYALI, H., *Özel Histoloji.* Taş Matbaası, İstanbul, 1984.
58. WILLIAMS, J. M., Beno, M. A., Wang, H. H., Leung, P. C. W., Emge, T. J., Geiser, U., Carlson, K. D., *Organic Superconductors: Structural Aspects and Design of New Materials.*, Acc. Chem. Res., 18, 261-267, 1985.