

t
212

**BAZI KANSEROJEN MADDELERİN
CHIRONOMUS THUMMI K. (CHIRONOMIDAE, DIPTERA)
LARVALARININ TÜKRÜK BEZİNDEKİ
POLİTEN KROMOZOMLAR ÜZERİNE ETKİSİ**

Hülya Zeytinoglu /

T. C.
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANASI

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman : Prof. Dr. Atıf Şengün

Nisan 1987

Hülya Zeytinoglu'nun YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Bazı Kanserojen Maddelerin Chironomus thummi K. (Chironomidae, Diptera) Larvalarının Tükürük Bezindeki Politen Kromozomlar Üzerine Etkisi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

.17./04./1987

Üye : Prof. Dr. Atif Sengün

Atif Sengün 111

Üye : Dos. Dr. Ertan Üser

Ertan Üser

Üye : Dos. Dr. Yalçın Sahin

Y. Sahin

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 29.4.1987
gün ve 146.7... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Rüstem Kaya

Prof. Dr. Rüstem KAYA

Enstitü Müdürü

ÖZET

Dev kromozomlarının organizasyonunda kanserojen maddelerin etkisini araştırmak amacı ile Chironomus thummi K.'-in tükruk bezleri kullanılmıştır. Kromozom organizasyonunun içinde bulunduğu ortama göre değiştiği bilinmektedir. Radyoaktif bir atom ile işaretlenmiş bazı kanserojen maddelerin kromozomlara bağlandığı da tesbit edilmiştir.

Laboratuvarda yetiştirilen larvaların tükruk bezleri, % 0,1 ile % 0,01 lik derişimlerde hazırlanan $Ni(NO_3)_2$, $NiCl_2$ ve tiyoüre içinde 10 dakika tutulmuştur. Aseto-orcein ile boyanarak ezme preparatları hazırlanmıştır. Deneyler sonucunda dev kromozomlarında, kromozom turgorunun azaldığı, kromozomların yumuşadığı, yapışkanlık ve DNA denatürasyonu gözlenmiştir. Kromozomların hangi bölgelerinin veya hangi bandlarının daha çok etkilendiğini saptamak mümkün olamamıştır. Değişik derişimlerdeki kanserojen maddelerin etkilerinde büyük bir fark gözlenmemiştir. Kanserojen maddelerin dev kromozomlara etkisi ile ilgili çalışmalar az olduğu için yeterli karşılaştırma yapılamamıştır.

SUMMARY

In order to evaluate the effects of cancerogenic substances on the organization of giant chromosomes the salivary glands of Chironomus thummi K. is used. It is known that the organization of chromosomes differ due to their conditions. It is also known that some radioactively labeled cancerogenic substances incorporate to chromosomes.

The salivary glands of larvae which were raised in our laboratory were treated for 10 minutes by the solutions prepared in 0,1 %-0,01 % concentrations of $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$, NiCl_2 and tiyourea medium. The squash preparation, were then stained by aceto-orcein.

Our observations indicated increase of adhesiveness and the softness of chromosomes, and decrease of chromosomal turgor. It could not possible to detect the most affected areas or the bands of the chromosomes. A considerable difference is not detected between the different concentrations of these substances.

Since the number of studies concerning this area is limited, it could not possible to make a satisfying comparison of these results with other.

TEŞEKKÜR

Tez konumu seçen, çalışmalarımı henüz bitirmemişken elde edilen sonuçları, Türkiye XVIII. Ulusal Biyoloji Kongresi'nde tebliğ olarak sunmam da dahil tüm aşamalarda, sürekli yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın, Prof.Dr.Atıf Şengün'e, tezimin yazımı sırasında, sürekli eksikliklerimi tamamlayan bölüm başkanımız Sayın, Doç.Dr. Yalçın Şahin ve Sayın, Yard.Doç.Dr.Ahmet Özata'ya, büyük bir titizlikle şekilleri çizen Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Sayın Öğr.Gör.Melih Zeytinoglu'na teşekkürlerimi bir borç bilirim.

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Chironomus'un larva anatomisi ve diseksiyon bölgesi	3
2.2. Çok sayıda kromonemadan yapılmış dev kromozomun bir bölümünün şematik görünümü	4
2.3. Çeşitli büyüklükteki larvaların dördüncü tükruk bezi kromozomları	5
2.4. Erkek Chironomus sineği	7
2.5. <u>Chironomus thummi</u> yumurta paketi	7
2.6. Büyük bir <u>Chironomus thummi</u> K. larvası	8
3.1. Chironomus larvalarının üretildikleri kafes ..	11
3.2. <u>Chironomus thummi</u> K. larvasının tükruk bezleri	13
4.1.a. Normal 3:1 oranında a.alkol:g.asetik asit ve aseto-orcein ile hazırlanmış olan <u>C.thummi</u> K. kontrol preparatları	20
4.1.b. Normal 3:1 oranında a.alkol:g.asetik asit ve aseto-orcein ile hazırlanmış olan <u>C.thummi</u> K. kontrol preparatları	20
4.2.a. 10 dakika nikel nitrat ile muamele edilerek aynı şekilde hazırlanan <u>C.thummi</u> K. kromozomları	21
4.2.b. 10 dakika nikel nitrat ile muamele edilerek aynı şekilde hazırlanan <u>C.thummi</u> K. kromozomları	21
4.3.a. 10 dakika nikel klorür ile muamele edilerek aynı şekilde hazırlanan <u>C.thummi</u> K. kromozomları	22

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.3.b. 10 dakika nikel klorür ile muamele edilerek aynı şekilde hazırlanan <u>C.thummi K.</u> kromozomları	22
4.4.a. 10 dakika tiyoüre ile muamele edilmiş ve aynı şekilde hazırlanmış <u>C.thummi K.</u> kromozomları	23
4.4.b. 10 dakika tiyoüre ile muamele edilmiş ve aynı şekilde hazırlanmış <u>C.thummi K.</u> kromozomları	23
4.5.a. 10 dakika $FeCl_2$ ile muamele edilmiş aynı yöntemle hazırlanmış <u>C.thummi K.</u> kromozomları	24
4.5.b. 10 dakika $FeCl_2$ ile muamele edilmiş aynı yöntemle hazırlanmış <u>C.thummi K.</u> kromozomları	24

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Chironomus'ların Bilimsel Araştırmalarda ve Sitolojideki Önemi	3
2.2. <u>Chironomus thummi K.</u> 'in Biyolojik Özellikleri	6
2.3. Deneyde Kullanılan Kanserojen Maddelerin Özellikleri	9
3. MATERİYAL VE YÖNTEM	11
3.1. Deney Hayvanlarının Yetiştirilmesi	11
3.2. Sitolojik Çalışmalar	12
4. BULGULAR	15
4.1. Kontrol Preparatlarında Gördüklerimiz	15
4.2. Kanserojen Madde Olarak Kullanılan Maddelerin Dev Kromozomlar Üzerine Etkisi	17

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
5. TARTIŞMA	17
6. SONUÇ	20
KAYNAKLAR DİZİNİ	26

1. GİRİŞ

Son yıllarda, genetik aktivite ile ilgili sitolojik ve sitokimyasal araştırmalara konu olan dev (politen) kromozomlar üzerindeki ilgi gittikçe artmaktadır. Dev kromozomlar, bazı Dipter larvalarının tükrük bezi, barsak, trakea, yağ dokusu ve malpighi organlarının hücrelerinde bulunmaktadır (Şengün ve Karpuzoğlu, 1978; Alemdar, 1983; Demirsoy, 1985). Dev kromozomlar, interfazda gözlenebilenlerinden kromozom morfolojisi çalışmalarında, pek çok fiziksel kimyasal faktörün kromozom morfolojisine etkilerinin araştırılmasında büyük kolaylıklar sağlamaktadır.

Yapılan bir çalışmada Chironomus tentans larvalarının izole edilen tükrük bezleri, çeşitli süreler için normalin üzerindeki farklı sıcaklıklarda inkübe edilmiş ve BR2 de ve IV-5e bölgesinin büyüklüğünde değişimler gösterilmiştir (Lezzi, 1984). Chironomus larvaları 24 saat süreyle 4°C ve 25°C de inkübe edildiğinde, malpighi organlarındaki en küçük kromozomun heterokromatik bölgesinin 4°C de çok spiralli olduğu, 25°C de ise spirallerinin açıldığı saptanmıştır (Şengün, 1952). D.melanoganter'in tükrük bezi dev kromozomlarında kafein'in etkisi, puffların büyüklük değişimi şeklinde gözlenmiştir (Srivastava and Bangia, 1985). C.thummi'lerde yapılan bir araştırmada, galaktoz ile beslenmenin pufflanmada değişiklikler oluşturduğu bildirilmiştir (Santa-Cruz, et.al., 1978). Chironomus larvalarına $ZnCl_2$ 'ün etkisi, ektizon hormonunun, belli bir kromozom yapısında meydana getirdiği değişikliğe benzer olmaktadır (Şengün, 1982). Bir başka çalışmada, Chironomus larvalarının etanol ile muamelesinin, politen kromozomlardaki pufflanmaya olan etkileri gösterilmiştir (Yagi, 1984). K^+ ve Na^+ iyonlarının, C.tentans'in politen kromozom bantları üzerinde belirgin bir farklılık oluşturduğu gözlenmiştir (Lezzi and Gilbert, 1970).

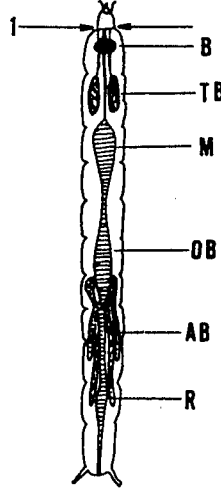
Birçok kimyasal maddenin çeşitli çevrelerde kullanılması sonucunda kanserleşmeye neden oldukları bilinmektedir. Kanserleşmeye neden olan bu maddelerin kromozom yapısındaki etkilerini ortaya koymak için değişik çalışmalar yapılmaktadır: Kanserojen bir madde olan benze pyrene diol epoxide'in politen kromozomlarda DNA'ya bağlanması araştırılmış ve DNA zincirine, kromatin yapısına ve gen lokalizasyonuna etkileri gösterilmiştir (Kurth and Bustin, 1985); bir mikotoksin olan aflatoxin B₁ ve aflatoxin B₁ 2,3-dichloride'in Drosophila X-kromozomunda mutajenik ve kanserojenik etkiler yaptığı saptanmıştır (Fahmy, et.al, 1978); kanserojen özelliğe sahip olan nikel bileşikleriyle yapılan deneylerde, Chines Hamster ovaryum hücrelerinde kromozomal bozukluklar (gap, kırılma, değişim) oluşmaktadır (Sen and Costa, 1985); rat'lar üzerinde yapılan çalışmalarda, nikel'in, böbrek ve karaciğer DNA'sında kırılmalara neden olduğu gösterilmektedir (Ciccarelli and Wetterhahn, 1984); kanserojen olarak bilinen diğer bir madde olan, tiyoüre'nin Chrysomya megacephala (Fabricius) (Diptera)'ya etkisi incelenmiş ve oosit DNA'sında farklılıklar oluşturduğu bildirilmiştir (Deepak and Chaudhry, 1979); bazı bilim adamlarının yapmış oldukları çalışmalarda, tiyoüre'nin memeli kültür hücrelerinde zayıf, ancak belirgin genotoksit ve mutajenik etkisi olduğu bildirilmektedir (Zeigler, et.al., 1985).

Bu ve bunlara benzer araştırmalar bize kanserojen maddelerin dev kromozom yapısında ne gibi bir değişikliğe neden olduğunu araştırmaya sevk etmiştir. Yaptığımız bu çalışmada, kanserojen madde olarak bilinen nikel bileşikleri (Ni(NO₃)₂, NiCl₂) ve tiyoüre'nin Chironomus thummi K. dev kromozomlarında morfolojik yapıyı etkileyip etkilemeyeceğini araştırdık (Vural, 1984; Sunderman, 1984; Sen and Costa, 1985; Ciccarelli and Wetterhahn, 1984; Duknudd and Leonard, 1982; Deepak and Chaudhry, 1979; Zeigler, et.al., 1985).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Chironomus'ların Bilimsel Araştırmalarda ve Sitolojideki Önemi:

Son yıllarda, kromozomlara dayalı birçok bilimsel çalışmalarda, genellikle Chironomid larvalarının protoraks veya diğer iki göğüs segmentinde bulunan tükrük bezinin epitel hücrelerine ait dev kromozomlar, tercih edilen bir materyal olmaktadır (Şahin, 1984)(Şek.2.1).



Şekil 2.1. Chironomus'un larva anatomisi ve diseksiyon bölgesi (B:beyin, TB:tükrük bezleri, M:mide, DB:orta barsak, AB:arka barsak, R:rektum) 1:diseksiyon bölgesi (Yagi, 1984'den)

Dev kromozomların, ard arda gelen dublikasyonları sonucu çapları büyümektedir. Bu nedenle yapıları yalnızca kromozomal seviyede değil gen seviyesinde de çalışmalara olanak sağlamaktadır (Kurth, et.al., 1978)(Şek.2.2.)

İlk kez Korschelt ve Carnoy 1880 yılında Chironomus'ların tükrük bezinde bulunan politen kromozomlarla çalıştılar. Hans Bauer ve Emil Heitz'in 1933'de dev kromozom-

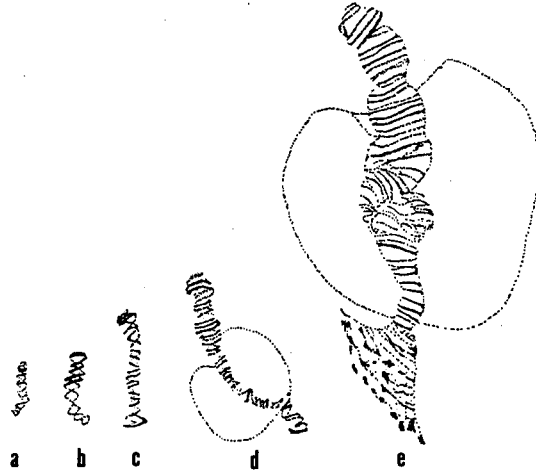
ları tanımlamalarıyla bilimsel çalışmalarda önem kazandı.



Şekil 2.2. Çok sayıda kromonemadan yapılmış dev kromozomun bir bölümünün şematik görünümü (Demirsoy, 1985'e göre Kühn'den).

Koller 1935'de bu kromozomların çok sayıda kromonemadan oluştuklarını saptayarak "politen" kromozom adını verdi (Alemdar, 1983; Şengün, 1948, 1954, 1951). Bu bilgiler ışığında, politen kromozomlar interfazda da kromatinin incelenmesi açısından kolaylık sağlamaktadır (Şengün, 1951). Daha sonraki çalışmalarla sitolojik ve genetik haritaları çıkartılmıştır (Şaylı, 1974).

Dev kromozomlar, gelişmelerinin başlangıcında, mitotik kromozomlar gibi küçük ve spirallidirler (Şek.2.3.a-b). Birbiri ardı sıra her kromonema birçok defa bölündüğü için kromozom gittikçe kalınlaşır ve bu kalınlaşma ile birlikte bir despiralizasyon meydana gelir (Şek.2.3.c-d). Öyle görülüyorki despiralizasyon derecesi ile kromonema bölünme sayısı arasında bir ilişki vardır. Örneğin; Drosophila melanogaster kromozomları, nukleus içinde birkaçkere spiral yapmış durumda görülürler. Buna karşılık onlara nazaran hiç olmazsa iki veya üç defa kalın olan Chironomus kromozomları, prepupa devresinin başında hiç spiral yapmamış durumdadırlar (A.Şengün, 1987, sözlü görüşme)(Şek.2.3.e).



Şekil 2.3. Çeşitli büyüklükteki larvaların dördüncü tükrük bezi kromozomları: a. 3,5 mm uzunlukta bir larvadan çizilmiş kromozom, b. 4-4,5 mm uzunlukta bir larvanın kromozomu, c. 5-5,5 mm uzunlukta bir larvanın kromozomu, d. 7-7,5 mm uzunlukta bir larvanın kromozomu, e. 11-11,5 mm uzunlukta bir larvanın büyük olan dördüncü kromozomu (Şengün, 1948'den).

Despiralizasyon, kromozomların uzamasına ve kalınlaşma, üzerlerindeki yapıların daha iyi görülmelerine neden olur. Kromozomun üzerinde DNA'nın bulunduğu bölgeler band, DNA'nın bulunmadığı bölgeler interband olarak işaretlenirler. Uzun seneler bandların görünüşünün ve sayısının sabit olduğu düşünülmüştür. Daha sonra yapılan araştırmalar, bandların hiç olmaz ise fizyolojik bakımdan değişikliklere uğradıklarını ve bu yüzden kromozom yapısının, kromozomun fizyolojik durumuna göre değiştiğinin ortaya çıkmasına neden oldular (Şengün, 1954, 1963). Kromozomların aktif bölgelerinde, yani mRNA ürettikleri bölgelerde bandlar görülmez olur, onun yerini bir şişlik işgal eder. Bu bölgelere puff adı verilir. Bunlar yukarıda da belirtildiği gibi kromozomun fonksiyonel yapılarıdır ve özellikle RNA ve protein sentezinin yapıldığı yerlerdir (Gavrila, 1982; Yagi, 1984; Alemdar, 1983; Demirsoy, 1985; A.Şengün, 1987, sözlü görüşme).

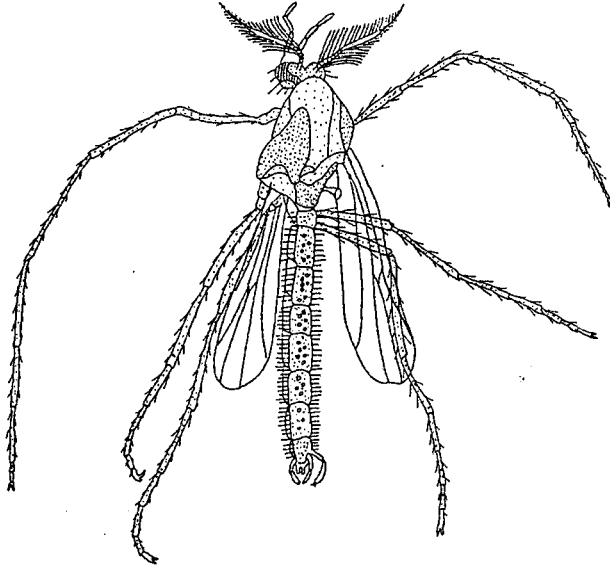
Chironomus'un bütün dokuları poliploid nukleusa sa-

hiptir, özellikle tükrük bezleri ile malpighi tubul hücrelerinin kromozomları çalışmalar için çok uygundur (Hägele, 1975). Bu verilerden yola çıkarak yaptığımız araştırmalara göre aşağıdaki belirtilen nedenlerden dolayı çalışmamızda Chironomus thummi K. larvalarını kullandık:

1. Chironomus thummi K.'in yetiştirilmesi kolaydır ve çabuk büyür,
2. Kromozom bantları belirgin olarak gözlenebilmektedir,
3. Kromozomlar kromasentride birleşme göstermemektedirler (Örn: Drosophila'da birleşme göstermektedir),
4. 4 adet olan kromozomların herbiri kolaylıkla analiz edilebilmektedir,
5. Ayrıntılı kromozom haritası bulunmaktadır (Kurth, 1978).

2.2. Chironomus thummi K.'in Biyolojik Özellikleri

Chironomus thummi K.'in doğal yaşam alanı göl ve akarsulardır. Daha çok suyun kirli ve bulanık olduğu kısımlarda, taşlar altında ve kum içinde bulunmaktadır (Şahin, 1984). Bu türün sivrisineğe benzeyen, ısırmayan erginleri 6-8 mm boyunda ve grimsi-kahverengi renktedir. Dişinin basit antenine karşın erkek büyük tüylü antene sahiptir. Ağız yapılarında delici organları olmadığından beslenme yapamazlar (Miall and Hammond, 1900; Hägele'den, 1975)(Şek.2.4.). Erginlerin yaşam süreleri yaklaşık 5 gündür. Çiftleşmeleri sürüler halinde uçuş sırasında gerçekleşir. Dişiler yumurta paketlerini suyun yüzeyindeki bir cisme jelatin iplerle bağlayarak bırakırlar. Yumurta paketi, bir jelatin kılıfın kuşattığı 400-800 yumurtadan oluşur ve bırakıldığında suya temas ettiği an jelatin şişerek yumurtaların suyun yüzünde durmasını sağlar (Hägele, 1975) (Şek.2.5.).



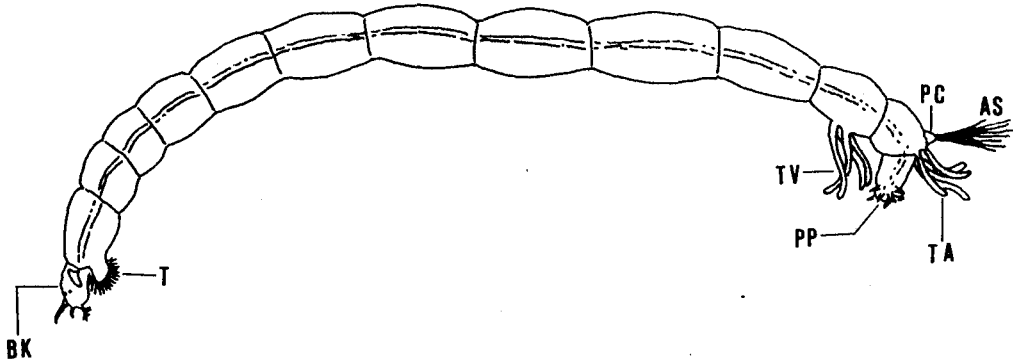
Şekil 2.4. Erkek Chironomus Sineği (Şengün ve Karpuzoğlu, 1970'den).



Şekil 2.5. Chironomus thummi yumurta paketi (Thienemann, 1974'den).

Larvaların gelişebilmesi için optimal sıcaklık 18°C dir. Bu sıcaklık altında larva, yumurtlamadan sonraki 2-3 gün içinde çıkar. Çıkan larvalar suyun dibinde, tükürük bezlerinin salgı ürününü, yiyecek parçalarını ve dip çamurunu kullanarak içine girebileceği büyüklükte tüpler yaparlar. Bu tüpler içinde büyüyerek pupaya dönüşürler (Şengün, 1970). Larvalar gelişimleri sırasında 4 larval dönem geçirirler. Birinci, ikinci ve üçüncü larval dönem-

lerden her biri 2-3 günlük bir süreye sahiptir. Dördüncü larval dönem ise 8-9. günde başlar ve 15-17 gün sürer. Bu dönemde larvanın hemolimfi koyu kırmızı olarak belirgin hale gelir. Gelişimini tamamlayan larva 1.0-1.2 mm genişliğinde, 12-15 mm uzunluğundadır (Hägele, 1975). Larva vücudu; baş, toraks ve abdomen olmak üzere üç kısımdan oluşur. Baş kapsülünden sonra 3 toraks ve 10 abdominal olmak üzere toplam 13 vücut segmentine sahiptir (Şek.2.6.).



Şekil 2.6. Büyük bir Chironomus thummi K. larvası (T:körelmiş ön ayak tarağı, PC:fırça, AS:fırça kilları, TV:ventral solungaçlar, TA:anal solungaçlar, PP:arka ayak, BK:baş kapsülü) (Şengün ve Karpuzoğlu, 1970'den değiştirilerek alınmıştır).

Larvalar birinci vücut segmentinde bir çift körelmiş ön ayak taşırlar. Onbirinci vücut segmentinde iki çift ventral solungaç, onikinci vücut segmentinde, arka kenarın dorso-lateralinde fırça bulunmaktadır. Son abdominal segmentte ise bir çift arka ayak kancaları ile 2 çift anal solungaç yer almaktadır (Bkz.Şek.2.6.) (Şahin, 1984). Larva yumurtadan çıktıktan 16 gün sonra prepupal dönem başlar. Prepupal dönemi izleyen pupasyon devresi yaklaşık 2 gün devam eder. Pupa sinek çıkmadan hemen önce suyun yüzeyine hareket eder ve sinek haline dönüşür. Erkek sinekler dişilerden daha önce gelişirler (Bkz.Şek.2.4.). Böylece Chironomus thummi K. 18°C de hayat devresi yaklaşık 4 hafta kadar sürer (Hägele, 1975). Sıcaklığın

değişmesi bu süreyi etkiler. Larvalar 4°C de bir sene kadar saklanabilmektedir.

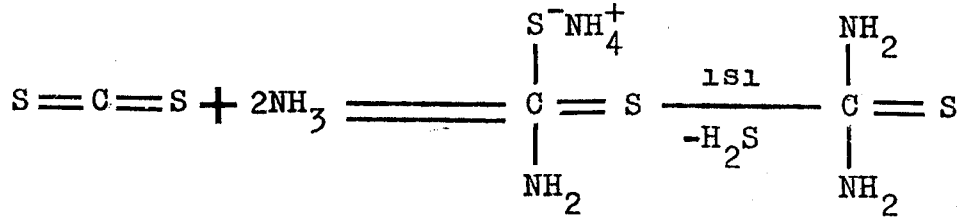
2.3. Deneyde Kullanılan Kanserojen Maddelerin Özellikleri

Kullandığımız nikel bileşiklerü ($Ni(NO_3)_2$, $NiCl_2$) ve tiyöüre'nin (H_2NCSNH_2) kanserojen etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Vural, 1984; Sunderman, 1984; Sen and Costa, 1985 Ciccarelli and Wetterhahn, 1984; Deepak and Chaudhry, 1979; Zeigler, et.al., 1985).

Nikel doğada genellikle arsenik nikel (NiAs), nikel galeni (NiS), arsenikli nikel galeni (NiAsS) ve ayrıca demir ve bakır içeren minerallerle birlikte bulunmaktadır (Pauling, 1959; Vural, 1984). Nikel endüstride nikel kaplama sanayinde, elektronik sanayinde, madeni para, pil ve besin endüstrisinde (katalizör olarak) ve paslanmaz çelik üretiminde, mıknatıs ve seramik yapımında, cama yeşil renk vermek için kullanılmaktadır (Weast, 1972-1973; Vural, 1984). Fosil kaynaklı sıvı yakıtların yanması ile havada da bulunabilir; jelatin ve kabartma tozu gibi besin maddelerinde, sigara dumanında bulunduğu gösterilmiştir (Vural, 1984).

Endüstride, anorganik bileşiklerden nikel tozuna maruz kalma ile akciğer kanseri arasında bir ilişki saptanmıştır; nikel bileşiklerine maruz kalmanın akciğer ve burun kanserlerine neden olduğu epidemiyolojik çalışmalarla da gösterilmiştir (Vural, 1984).

Tiyöüre sentetik bir madde olup bir karbonik asit türevidir. Karbon sülfür (CS_2)'ün amonyak ile reaksiyonu üzerinden tiyöüre elde edilir (İkizler, 1985):



Karbon Sülfür

Amonyum di
tiyokarbamat

Tiyöüre

Tiyöüre hipertroidizm tedavisinde bir antitroid madde olarak kullanılmakta ve troid hormonunun salgısını inhibe etmektedir (Biggs and Woodson, 1973).

Yukarıda geçen üç kanserojen maddenin bazı özellikleri Tablo I de verilmektedir.

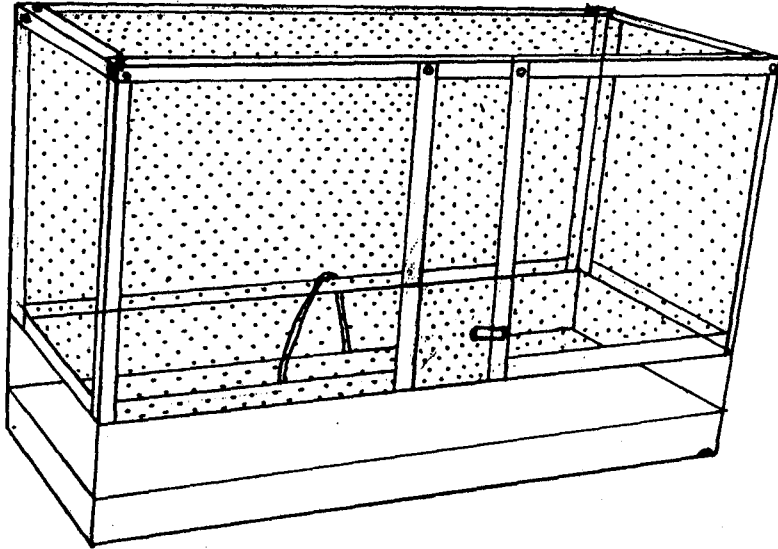
	100 cc'de çözünürlükleri			kristal formları
	soguk su	sıcak su	alkol, asitler, vs.	
Ni(NO ₃)	238.5 20°C	∞	alkol, NH ₄ OH	yeşil, monoklinik granüller
NiCl ₂ ·6H ₂ O	254 20°C	599 100°C	ençok alkolde	yeşil, monoklinik granüller
Tiyöüre	9.18 13°C	—	alkol, çok az eterde	rombik, beyaz taneli

Tablo I. Denede kullanılan kanserojen maddelerin bazı kimyasal özellikleri (Weast, 1972-1973'den).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Deneysel Hayvanlarının Yetiştirilmesi

Deneysel hayvanlar Diptera ordosundan Chironomidae (Tenipedidae) familyasına ait Chironomus thummi K. kullanılmak üzere yetiştirilmiştir. Boyutları 110 cm x 45 cm x 20 cm olan bir cam havuz hazırlanarak, üzerine sinekler için 110 cm x 45 cm x 50 cm boyutlarında, sık dokumalı tel ile kaplanmış bir kafes oturtulmuştur. Yumurta paketlerinin ve larvaların toplanabileceği, kültür ortamına besinin eklenebileceği uygun bir yere kapak yapılmıştır (Şek.3.1.).



Şekil 3.1. Chironomus larvalarının ürettikleri kafes.

Önemli bir koşul olan, havalandırma hortumu için telde bir delik açılarak sulu ortamın havalandırılması sağlanmıştır.

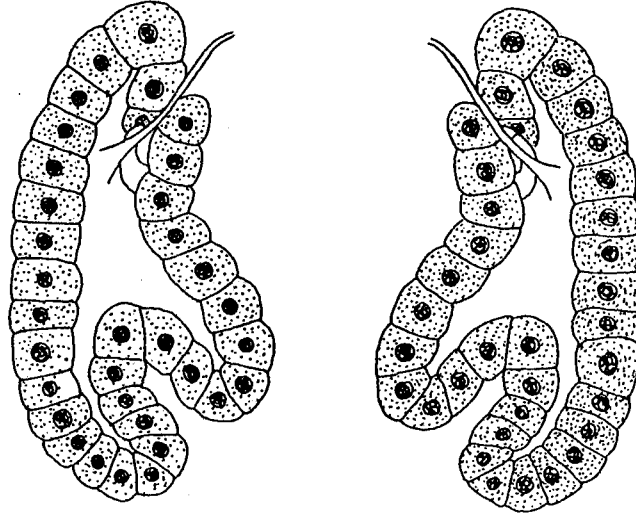
Havuz suyu yerine geçecek olan, larvalara uygun sıvı aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır: 0,35 gr NaCl, 0,30 gr MgSO₄, 0,27 gr CaCl₂, 0,05 gr NaHCO₃, 0,02 gr KH₂PO₄,

% 1 lik sıvı $FeCl_3$ 'den 0,1 mlt alınmış ve 100 mlt distile suya eklenerek tuz solusyonu hazırlanmıştır. Bu 100 mlt tuz solusyonu, 10 litre distile suyu karıştırılmış ve havuz suyu olarak 6 cm yüksekliğe kadar cam havuza doldurulmuştur (Hägele, 1975).

Anadolu Üniversitesi, Yunus Emre Kampus'unda bulunan havuzlardan bir tek yumurta paketi (Bkz.Şek.2.5.) alınarak, hazırlanan kültür ortamına bırakılmıştır. Larvalara beslenmesi için, toz haline getirilmiş ısırgan otu yaprağı ile selülozdan yapılmış bir karışım hazırlanmıştır. Bu karışımdan larva sayısına uygun miktarda alınarak sıvı ortama eklenmiştir (Şengün ve Karpuzoğlu, 1970; Hägele, 1975). Ayrıca bu besine ek olarak çok az miktarda ticarî balık yemi ilave edilmiştir (Santa-Cruz, et.al., 1978; Yagi, 1984). Larvalar oda sıcaklığında ($18^{\circ}C-22^{\circ}C$) gelişmeye bırakılmışlardır. Sürekli havuz sıvı seviyesinin aynı kalmasına dikkat edilmiş ve larvaların sağlıklı yetişip yetişmedikleri kontrol edilmiştir. Araştırmamızda kullanılmak üzere yetiştirilen larvaların tür tayinleri, spesialisti olan Doç.Dr.Yalçın Şahin tarafından yapılmıştır.

3.2. Sitolojik Çalışmalar

Chironomus thummi K. larvaları, dördüncü larval döneme geldiklerinde (1,5 cm boyuna) deney için ayrıldılar. Larva, diseksiyon mikroskobu altında, lam üzerine konan % 0,7 lik fizyolojik suyun bir damlası içersine alınarak tükrük bezleri çıkartılmıştır (Alemdar, 1980) (Şek. 3.2.). Diseksiyon sırasında elektrolit etkisi oluşturmamak amacıyla cam iğneler kullanılmıştır. Larvanın baş kapsülünü I.toraks segmentinden ayırmak suretiyle tükrük bezleri dışarı alınmıştır (Yagi, 1984) (Bkz.Şek.2.1.). Aynı larvadan alınan tükrük bezlerinden bir tanesi kontrol (a)



Şekil 3.2. Chironomus thummi K. larvasının tükürük bezleri.

grubu olarak, diğeri ise deney (b) grubu olarak muamele edilmiştir (Lezzi and Gilbert, 1970). Kontrol grubu, hemen 3:1 oranında absölü etil alkol:glasial asetik asit fiksatifli ile 5 dakika fikse edilmiştir (Santa-Cruz, et.al., 1978). Diğeri tükürük bezi ise 10 dakika süreyle kanserojen madde içerisinde tutulmuştur. Kanserojen maddeler, de-iyonize su içinde eritilerek hazırlanmış, % 0,1, % 0,01 lik derişimlerdeki nikel nitrat ($\text{Ni}(\text{NO}_2)_3$), nikel klorür (NiCl_2) ve tiyoüre (H_2NCSNH_2) dir. Kanserojen maddenin boyanmaya herhangi bir etkisini önlemek amacı ile tükürük bezleri, 1-2 dakika % 0,7 lik fizyolojik su ile yıkanarak aynı şekilde hazırlanan fiksatife alınmıştır. Fizyolojik su ile kanserojen madde bir kurutma kağıdı ile dikkatlice emdirilmiştir. Fiksatife alınmadan önce tükürük bezlerine herhangi bir şekilde dokunulmamıştır. Her iki tükürük bezi 5 dakika fiksatifte tutulmuş, sonra 15 dakika süreyle % 1 lik aseto-orcein ile boyanmıştır. Boyanan tükürük bezi üzerine % 45 lik asetik asit damlatılarak lamel kapatılmıştır ve ezme preparatı hazırlanmıştır.

Daha sonra bu preparatlar Krezot yöntemi ile daimî hale getirilmişlerdir (Şengün, 1948, 1954). Eğik bir yere yerleştirilen preparat önce % 45 lik asetik asit ile birkaç kez yıkanmış, sonra % 80 lik etil alkol ile birkaç kez yıkanarak krezot damlatılmıştır. Alkolün yerini krezotun tamamen alabilmesi için 3-4 gün preparatlar düz bir yerde bekletilmiştir. Daha sonra lamellerin etrafı Kanada Balsamı ile kapatılarak etüvde kurumaya bırakılmışlardır. Preparatlar Nikon HFX-II mikroskobu ile incelenerek fotoğrafları çekilmiştir.

Kromozom yapısının değişmesine, deneyde kullanılan sıvıların neden olup olmadığını anlamak için, larvaların bir kısmı % 0,7 lik fizyolojik suda, bir kısmı distile suda, bir kısmı ise farklı derişimlerdeki kanserojen madde içerisinde açılarak 10 dakika tutulmuştur. Daha sonra 3:1 oranında absolu etil alkol:glasial asetik asit ile 5 dakika fikse edilerek % 1 lik aseto-orcein ile boyanmışlardır. Gözlenen etkinin kullanılan kanserojen maddelerden mi oluşup oluşmadığını anlamak için ikinci bir kontrol preparatı hazırlanmıştır. Bu amaçla kanserojen etkisi olmadığı bilinen demir klorür ($FeCl_2$)'ün % 0,01 lik derişiminde, tükruk bezleri 10 dakika muamele edilmiştir ve daha sonrada yukarıda sözü edilen aynı yöntemle preparatları hazırlanmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada kromozomların genel durumları üzerinde durulmuştur. Şöyle ki:

- a) Kromozomların gerginliğinin azalmış olup olmadığı,
- b) Yapışkanlık dereceleri,
- c) DNA denatürasyon derecesi,
- d) Bütün bir kromozomun veya kromozom bölgelerinin çok fazla uzayıp yada kısalma dereceleri,
- e) Kromozom üzerindeki bandlara göre belli bölgelerinin tanınma derecesi incelenmiştir.

4.1. Kontrol Preparatlarında Gördüklerimiz.

Kontrol preparatları:

- a) Normal 3:1 oranında glasial asetik asit:absolü etil alkol fiksatifi ve aseto-orcein ile boyanan preparatlar,
- b) Çeşme suyunda 10 dakika tutulduktan sonra a'daki gibi boyanan preparatlar,
- c) % 0,7 lik fizyolojik suda 10 dakika tutulduktan sonra a'daki gibi boyanan preparatlar,
- d) % 0,01 lik $FeCl_2$ içinde 10 dakika tutulduktan sonra a'daki gibi boyanan preparatlar,

Yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan kontrol preparatlarının incelenmesi, aralarında herhangi bir fark bulunmadığını göstermiştir.

4.2. Kanserojen Madde Olarak Kullanılan Maddelerin Dev Kromozomlar Üzerine Etkisi

Deney sonuçları Tablo II de gösterilmiştir. Nikel nitrat ($Ni(NO_3)_2$) ve nikel klorür ($NiCl_2$) 'ün etkileri birbirine çok benzemektedir. Aynı bir madde olan tiyoüre'nin etkisi ise bu iki maddenin gösterdiği etkiden biraz farklı gözlenmiştir. Buna karşılık kanserojen bir madde olmayan demir klorür ($FeCl_2$) hemen hemen kromozomları hiç değiştirmemiştir ve kontrol serisindeki kromozomlara çok benzemektedir.

5. TARTIŞMA

Kanserojen maddelerin dev kromozomları üzerine etkisini araştırdığımız bu çalışmada, ölçü olarak kullandığımız kriterlere göre, kanserojen maddelerin etkisi olduğu, yani kromozom yapısını değiştirdiği gözlenmiştir. Kontrol preparatlarının incelenmesi sonucu ise, kontrol olarak kullanılan maddelerin, kullanılan derişimlerde, Chironomus thummi K.'in dev kromozomlarını etkilemediklerini ortaya koymuştur.

Diğer taraftan yoğunluk dereceleri ve belki bizim kontrol edemediğimiz bazı faktörler (larvanın yaşı, fizyolojik durumu, oda sıcaklığı vb.) de kromozomun yapısını etkilemektedirler. Örneğin; soğukta tutulan larvaların kromozomları daha iyi boyanmakta ve üzerlerindeki bantlar daha iyi belli olmaktadır. Hatta bunlar, ezme esnasında, sıcakta tutulan larvaların kromozomlarına nazaran daha güzel bir şekilde yayılmaktadırlar (Şengün, 1952). Onun için aynı seride görülen farkların, şu anda kontrol edemediğimiz ve yukarıda adı geçen faktörlerden ileri geldiği düşünülebilir.

Tablo II. Deney Sonuçları

$Ni(NO_3)_2$	<p>Bu madde içinde, kromozomların gerginliği azalmış ve bazılarında kromatin denatürasyonu çok göze çarpar bir hale gelmiştir. Kromozomların bazı bölgeleri veya tamamı, diğer bir kromozoma yada aynı kromozomun başka bölgelerine yapışmış durumdadır. Kullanılan iki ayrı yoğunluk arasında büyük bir fark göze çarpmamaktadır (Şek.4.1.a-4.1.b.:kontrol şekilleri, 4.2.a-4.2.b.:deney şekilleri).</p>
$NiCl_2$	<p>Bu maddenin etkisinde kalmış preparatların incelenmesi, değişikliklerin nikel nitratla gözlenenlere çok benzediğini göstermektedir. (Şek. 4.3.a-4.3.b.).</p>
Tiyüre	<p>Bu madde sanki daha az DNA denatürasyonuna neden oluyormuş gibi görünmektedir. Çünkü kromozomlar üzerinde DNA bölgeleri, yani bandlar daha iyi belli olmaktadır. Bandların iyi belli olmadıkları yerlerde de boyanmış kitlelere daha çok tesadüf edilmektedir (Şek.4.4.a-4.4.b.).</p>
$FeCl_2$	<p>Demirklorür içinde tutulmuş tükrük bezi kromozomları incelendiğinde değişikliğin hemen hemen hiç olmadığı, yani kromozomların turgor derecesinde, DNA denatürasyonunda ve yapışkanlıkta bir özellik bulunmadığı göze çarpar (Şek.4.5.a-4.5.b.).</p>

Deneyde kullanılan kanserojen maddelerin, farklı derişimlerinin muamelesi sonucunda, preparatlarda büyük bir fark göze çarpmamaktadır. Nikel klorür (NiCl_2) ile nikel nitrat ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$) serisindeki preparatlarda görülen etkinin birbirine çok benzemesi ve buna karşılık demir klorür (FeCl_2) serisi arasında farklılık bulunmasının doğrudan doğruya nikel'den ileriye geldiği söylenebilir. Nitekim yukarıda, giriş kısmında, tamamen başka yöntemlerle yapılan deneylerde nikel'in kanserojen bir madde olduğu saptanmıştır (Sunderman, 1984; Sen and Costa, 1985; Ciccarelli and Wetterhahn, 1984; Deknudt and Leonard, 1982).

Diğer bir kanserojen madde olan tiyoüre'nin etkisi, NiCl_2 ile $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ 'a nazaran, bantların biraz daha iyi belli olması nedeniyle daha az olmuştur, fakat onların gösterdiği etkiye benzemektedir. Giriş kısmında, yine farklı yöntemlerle yapılan deneylerde, tiyoüre'nin zayıf etkisi olduğu bildirilmektedir (Zeigler, et.al., 1985; Deepak and Chaudhry, 1979).

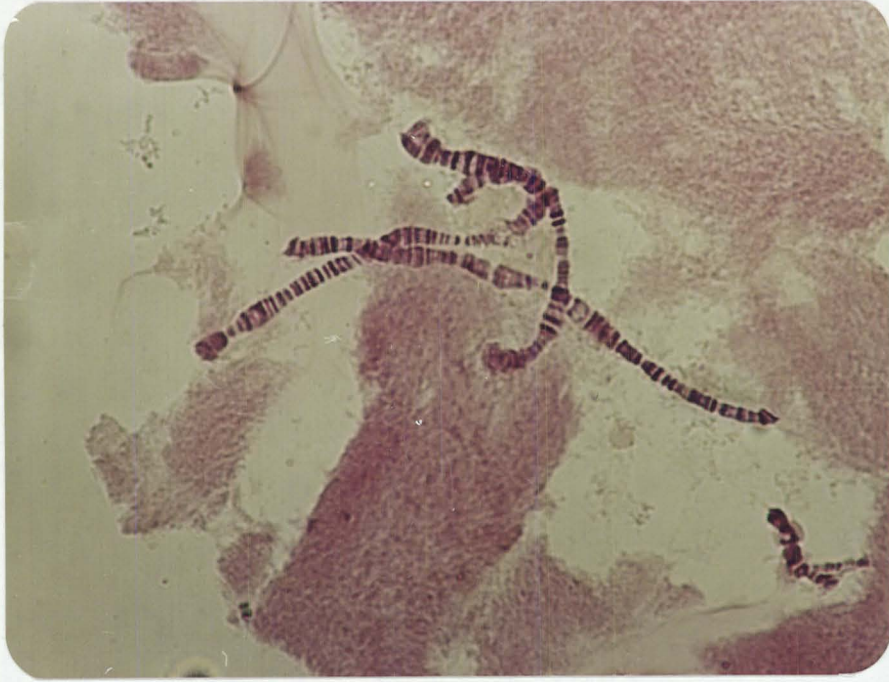
6. SONUÇ

Dev kromozomlar üzerine kanserojen maddelerin etkisi konusunda yeterli çalışma bulunamadığı için bu konuda sağlıklı karşılaştırma yapılamamıştır. Deneylerimizde kromozom haritası ile çalışmak mümkün olamadığından, kromozomların hangi bölgelerinin veya hangi bantlarının daha çok etkilendiğini söylememiz mümkün olamamıştır.

Kanserojen madde olarak bilinen nikel nitrat ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$), nikel klorür (NiCl_2) ve tiyoüre (H_2NCSNH_2)'nin Chironomus thummi K.'in dev kromozomlarında yapışkanlık, kromozom

gerginliğinin azalması, DNA denatürasyonu ve kromozom boyunda uzama meydana getirdiği gözlenmiştir.

Bu nedenle yeni çalışmalarla, kromozomların hangi bölgelerinin yada bantlarının etkilendiği, kromozoma bağlanıp bağlanmadığı konusunda, daha değişik yöntemler kullanılarak araştırmalar yapılabilir. Aynı zamanda çeşitli kanserojen maddelerin kromozomlar üzerine etkileri araştırmalara açık bir konudur.



Şekil 4.1.a. Normal 3:1 oranında absöü alkol: g.asetik asit ve aseto-orcein ile hazırlanmış olan C.thummi K. kontrol kromozomları (X400).



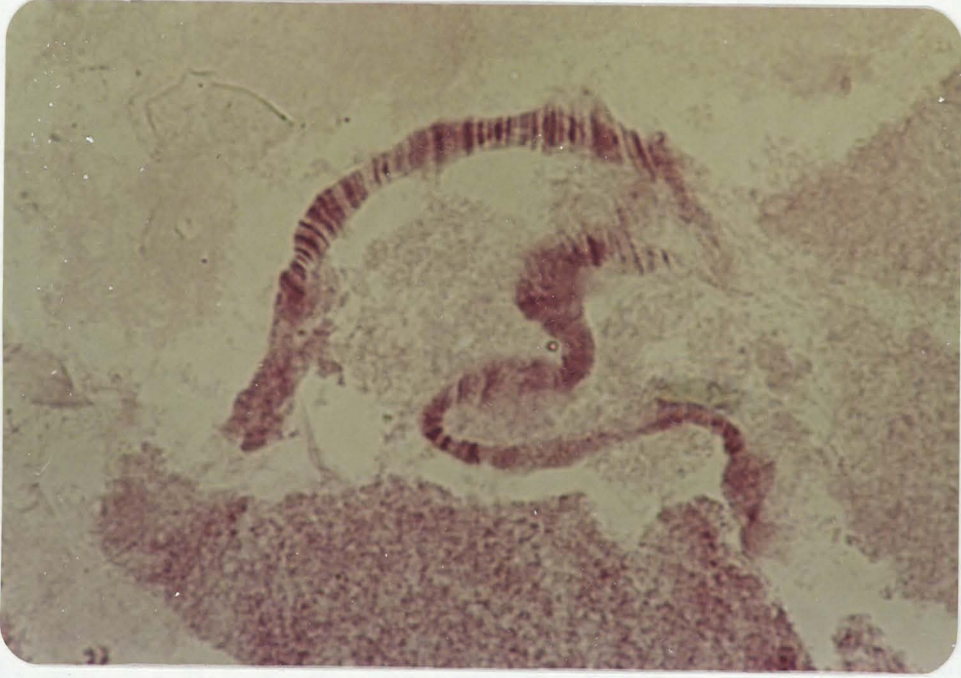
Şekil 4.1.b. Normal 3:1 oranında absöü alkol: g.asetik asit ve aseto-orcein ile hazırlanmış olan C.thummi K. kontrol kromozomları (X800).



Şekil 4.2.a. 10 dakika nikel nitrat ile muamele edilerek aynı şekilde hazırlanan C. thummi K. kromozomları (X800).



Şekil 4.2.b. 10 dakika nikel nitrat ile muamele edilerek aynı şekilde hazırlanan C. thummi K. kromozomları (X800).



Şekil 4.3.a. 10 dakika nikel klorür ile muamele edilerek aynı şekilde hazırlanan C.thummi K. kromozomları (X800).



Şekil 4.3.b. 10 dakika nikel klorür ile muamele edilerek aynı şekilde hazırlanan C.thummi K. kromozomları (X800).



Şekil 4.4.a. 10 dakika tiyoüre ile muamele edilmiş ve aynı şekilde hazırlanmış C.thummi K. kromozomları (X400).



Şekil 4.4.b. 10 dakika tiyoüre ile muamele edilmiş ve aynı şekilde hazırlanmış C.thummi K. kromozomları (X800).



Şekil 4.5.a. 10 dakika FeCl_2 ile muamele edilmiş ve aynı yöntemle hazırlanmış C.thummi K. kromozomları (X800).



Şekil 4.5.b. 10 dakika FeCl_2 ile muamele edilmiş ve aynı yöntemle hazırlanmış C.thummi K. kromozomları (X800).

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alemdar, N., 1980, *Drosophila*'nın morfolojik, anatomik yapısı ve bazı sitogenetik denemeler, Atatürk Üniversitesi Yayınları, No:568, 92 s.
- Alemdar, N., 1983, Sitoloji, Atatürk Üniversitesi Yayınları, No:612, 210 s.
- Biggs, H.G.; Woodson, G., 1973, *Clinical biochemistry*, Harper and Row Publishers, INC NewYork, 283 p.
- Ciccarelli, R.B.; Wetterhahn, K.E., 1984, Molecular basis for the activity of nickel, IARC Sci.Publ., 53 (Nickel Hum. Environ.), 201-13.
- Deepak, V.; Chaudhry, H.S., 1979, Effect of thiourea on DNA in the ovariole components of *Chrysomya megacephala* (Fabricius)(Diptera:Calliphoridae), Appl. Entomol. Zool., 14(4), 499-500.
- Demirsoy, A., 1985, Yaşamın temel kuralları Cilt-I/Kısım-I, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, A/52, 770 s.
- Duknuddt, G.; Leonard, A., 1982, Mutagenicity tests with nickel salts in the male mouse, Toxicology, 25(4), 289-292.
- Fahmy, M.J.; Fahmy, O.G.; Swenson, D.H., 1978, Aflatoxin B₁-2,3-dichloride as a model of the active metabolite of Aflatoxin B₁ in mutagenesis and carcinogenesis, Cancer Research, 38,2608-2616.
- Gavrila, L., 1982, Cytology of polytene chromosomes in *Chironomus*, *Mycetophila* and *Rhagoletis*, II. chromosomal rearrangements, puffing and nucleolar-organizer, Cytologia, 48, 741-748.
- Hägele, K., 1975, *Chironomus*, Reprinted from: Handbook of Genetics, Vol:3, Edited by R.C. King (Plenum Press, 1975), 269-278.
- İkizler, A., 1985, Organik kimyaya giriş, Karadeniz Üniversitesi Basımevi, 398 s.
- Kurth, P.D.; Moudrianakis, E.N.; Bustın, M., 1978, Histone localization in polytene chromosomes by immunofluorescence, Journal of Cell Biology, 78, 910-918.
- Kurth, P.D.; Bustın, M., 1985, Site-specific carcinogen binding to DNA in polytene chromosomes, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82(20), 7076-80.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Lezzi, M.; Gilbert, L.I., 1970, Differential effects of K^+ and Na^+ on specific bands of isolated polytene chromosomes of *Chironomus tentans*, J.Cell Sci., 6, 615-627.
- Lezzi, M., 1984, Heat-shock phenomena in *Chironomus tentans*. II. invitro effect of heat and overheat on puffing and their reversal, Chromosoma (Berl), 90, 198-203.
- Pauling, L., 1959, General chemistry, An introduction to descriptive chemistry and modern chemical theory, W.H. Freeman and Company San Francisco, 710 p.
- Santa-Cruz, M.C.; Villanueva, A.; Diez, J.L.; 1978, Effect of galactose treatment in the puffing pattern of *Chironomus thummi* Balbiani Rings, Chromosoma (Berl), 69, 93-100.
- Sen, P.; Costa, M., 1985, Induction of chromosomal damage in Chinese Hamster ovary cells by soluble and particulate nickel compounds: preferential fragmentation of the heterochromatic long arm of the X-chromosome by carcinogenic crystalline NiS particles, Cancer Research, 45(5), 2320-2325.
- Srivastava, J.P.; Bangia, K.K., 1985, Effect of caffeine on puffing pattern in the polytene chromosomes of salivary glands of *Drosophila melanogaster*, Curr. Sci., 54(13), 651-2.
- Sunderman, F.W.; 1984, Carcinogenicity of nickel compounds in animals, IARC Sci.Publ., 53(Nickel Hum. Environ), 127-42.
- Şahin, Y., 1984, Doğu ve Güney Doğu Anadolu Bölgeleri akarsu ve göllerindeki Chironomidae (Diptera) larvalarının teşhisi ve dağılışları, Anadolu Üniversitesi Yayınları, No:57, 145 s.
- Şaylı, B.S., 1974, Medikal genetik:3, Biyokimyasal genetik Diyarbakır Tıp Fakültesi Yayınları, No:9, 439 s.
- Şengün, A., 1948, Chironomidae'lerin muhtelif dokularındaki dev kromozomlar üzerinde karşılaştırmalı ontogenetik araştırmalar I, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Mecmuası, Cilt I, 186-249.
- Şengün, A., 1951, Chironomidae'lerin muhtelif dokularındaki dev kromozomlar üzerinde karşılaştırmalı ontogenetik araştırmalar II, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Mecmuası, Seri B, Cilt XVI, Sayı 1, 1-44.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Şengün, A., 1952, Chironomus larvalarının dev kromozomları üzerine ısının tesiri, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Mecmuası, Seri B, Cilt XVII, Sayı 4, 357-361.
- Şengün, A., 1954, Variability of the banding patterns of giant chromosomes, Journal of Heredity, Vol XLV, No:3, 119-122.
- Şengün, A., 1954, Dev kromozomlarının spiral strüktürü, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Mecmuası, Cilt XIX, Sayı:3, 169-178.
- Şengün, A., 1963, Kromozomların değişen karakterleri, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Mecmuası, Cilt XXVIII, Sayı:1-2, 55-62.
- Şengün, A.; Karpuzoğlu, Y., 1970, Chironomusun deney hayvanı olarak kullanılışı, Türk Biyoloji Dergisi, Cilt: 20, Sayı:1-4, 139-145.
- Şengün, A., 1982, Eczacılar için genel zooloji, Ar Yayın Dağıtım İstanbul, 191 s.
- Thienemann, A., 1974, Chironomus, E.Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 834 p.
- Vural, N., 1984, Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No:56,416 s.
- Weast, R.C., 1972-1973, Handbook of chemistry and physics, CRC Press A Division of the Chemical Rubber Co.
- Yagi, S., 1984, Effects of Ligation on ethanol-induced Balbiani Ring puffing in salivary glands of Chironomus, Chromosoma, 89, 274-279.
- Zeigler-Skylakakis, K.; Rossberger, S.; Andrea, U., 1985 Thiourea induced DNA repair synthesis in primary rat hepatocyte cultures and gene mutations in V-79 Chinese Hamster cells, Arch.Toxicol., 5(1), 5-9.

