



ARAŞTIRMA MAKALESİ/RESEARCH ARTICLE

ANTİMİTOTİK OLDUĞU DÜŞÜNÜLEN BAZI KİMYASALLARIN RETİKÜLOEN- DOTEİAL SİSTEM (RES) ÜZERİNE ETKİLERİ

Mustafa UYANOĞLU¹, Melih ZEYTİNOĞLU²

ÖZ

Günümüzde doğal ya da yapay bir çok kimyasal bileşiğin antimitotik etkisinin bilinmesine karşın, etki mekanizmaları hakkında oldukça az bilgiye rastlanılmaktadır. Antimitotik olduğu bilinen kimyasal bir bileşen model alınarak sentetik yolla elde edilmiş olan Bis tetrathiafulvalene türevlerinin, mitotik inhibitör etkili olabileceği düşünülmüştür. Bu yolla yapay olarak sentez edilen ve T3, T5 olarak kodlanmış maddelerin formül yapısından yola çıkılarak antimitotik olabileceği düşünülmüş ve çalışmamızın kimyasal deney materyalini oluşturmuştur. Yaşam boyu mitotik aktivite gösteren hücreler içeren retiküloendotelial sistem (RES)' deki bazı dokular üzerine olası etkileri araştırılmıştır. Sentez edilen bu kimyasalların, in vivo olarak test edilmesine yönelik olan bu çalışmada kullanılan test materyallerinin olası etkilerini gösterebilmek amacıyla kan, kemik iliği ve dalak dokuları incelenmiş ve bu konuda bir test yöntemi de geliştirilmeye çalışılmıştır. Kimyasal maddelerin hedef dokular üzerindeki antimitotik etkileri, kontrol grupları ile deney grupları karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmanın sonucunda, test edilmiş olan kimyasal maddelerin antimitotik etkili olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: RES, Kan, Kemik iliği, Dalak, Antimitotik maddeler, Bis tetrathiafulvalene.

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

ABSTRACT

Nowadays, many natural or artificial chemicals are known as mitotic inhibitors but the information about their effect mechanisms is very little. Bis tetrathiafulvalene strains, which were synthesized by using an antimitotical chemical compound as a model, were thought to have mitotic inhibitor effects. Thus, chemicals with codenames T3 and T5, were synthesized with the way mentioned above and these chemicals became the main chemical materials of our research . Possible effects of these chemicals were investigated on some tissues of reticuloendothelial system (RES) which includes particular cells showing mitotic activity for the life. In this study, which was devoted to in vivo testing of the synthesized chemicals, to investigate the effects of test materials, blood, bone marrow and spleen tissues were examined and also a test method were tried to be developed about this subject. The antimitotic effects of the chemical materials on target tissues were evaluated comparatively both between test groups and between control groups. As a result of this study, it can be concluded that the tested chemical materials have antimitotic effects.

Keywords: RES , Blood, Bone marrow, Spleen, Antimitotic agents, Bis tetrathiafulvalene

¹ Osmangazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir ,26480, Türkiye.

² Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir, 26470, Türkiye

Tel:+90 222 335 05 80-9 hat- 5701; E-mail: mzeytino@anadolu.edu.tr

Geliş: 20 Eylül 2004; Düzeltme: 02 Mart 2004, 19 Aralık 2005; Kabul: 10 Şubat 2006

1. GİRİŞ

Genel olarak mitoz bölünme, organizmayı oluşturan hem normal hem de transform hücrelerde gözlenen bir çoğalma şekli olarak gösterilmektedir. Hücre döngüsü olarak belirtilen mitoz bölünmenin, sinir ve retina hücresi gibi özelleşmiş bazı hücrelerde görülmez iken deri, kemik iliği, epitel hücreleri ve daha pek çok hücre tipinde sıklıkla görüldüğü açıklanmaktadır (Demirsoy, 1991). Hücre döngüsünde mikrotübüllerin rol oynadığı “karyokinez” adı verilen çekirdek bölünmesinin hemen ardından aktin mikrofilamentleri aracılığıyla “sitokinez” adı verilen sitoplazma bölünmesi gerçekleşmektedir (Ozban, 1998).

Mikrotübüller, α ve β tubulin proteinlerinin polimerleşmesiyle oluşurlar (Correia, 1991; Iwasaki, 1993). Hücre şeklinin korunması, hücre içi hareketlerin sağlanması ve mitotik iğ iplikçiklerinin yapısını oluşturması gibi temel görevleri olan mikrotübüller, özgün antimitotik maddelere karşı duyarlıdırlar. Tubulin polimerleşmesinin engellenmesiyle mitoz bölünme engellenebilmektedir. Aktin mikrofilamentlerinin de mikrotübüller gibi özgün antimitotik maddelerden etkilenerek depolimerize olabildikleri, böylece sitoplazma bölünmesinin durdurulabileceği belirtilmiştir (Albert vd. 1989; Ozban, 1998).

Hücreleri mitoz iten pek çok faktör olduğu ifade edilmiş ve bunlar sitoplazma / çekirdek oranının artması ve hücrenin, hacim / yüzey alanı oranının bozulması, radyasyon, yüksek basınç, mutajenik faktörler, onkojenik DNA ve RNA virüsleri, pH değişimleri, sıcaklık, hücre içi ve dışı kimyasal uyarıcılar şeklinde genellemiştir (Demirsoy, 1991; Cande, 1986). Hücre mitozunun kontrol altında tutulmaması, günümüzün çözülmemiş problemi olan kanser hastalıklarının nedeni olarak gösterilmektedir. Kanser etkeni olarak belirtilen kimyasal faktörler çoğunlukla polisiklik ve heterosiklik aromatik hidrokarbon bileşikler, aromatik amin ve amidler, doğal, bitkisel ve mikrobiyal kökenli kimyasal ürünler ve tüm bu kimyasal bileşiklerin türevleri olarak belirtilmektedir (Kumar ve Rob-bins, 1990). 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 ilaçlar, kanserli hücrelerin mitozunu durdurmakla birlikte, organizmada normal bölünme periyodu gösteren hücrelerin çoğalmalarını da olumsuz yönde etkilemektedirler. Kayaalp (1989) tarafından mitotik inhibitörlerin, mitozun sürekli olduğu lenfoid dokulardaki (dalak, kemik iliği, lenf düğümleri, timus, tonsillalar) germinatif hücrelerin çoğalmalarını durdurarak hücrel ve humoral immüniteyi bloke ettikleri bildirilmiştir. Yapılan çok sayıda araştırmalar ile bazı antimitotik ajanların lenfotoksik etkileri ortaya konulmaya çalışılmıştır (Teerenhovi vd., 1985; Cozon vd., 1991).

1.1. Antimitotik Maddelerin Etki Mekanizmaları

Farklı kimyasal organizasyona sahip maddelerin, canlılar üzerindeki etki mekanizmaları, “antimitotik” olarak tanımlanan kimyasal maddeler de dahil olmak üzere farklı ya da benzer olabilmektedir (Cozon vd., 1991). Herhangi bir kimyasal maddenin etki mekanizması ya da etki derecesinin, in vivo ve in vitro koşullarda da farklı sonuçlar verebileceği bildirilmiştir (Darroudi ve Natarajan, 1994).

Kanser kemoterapilerinin çoğunda antimitotik ajanların kullanıldığı bilinmektedir (Hanuske vd., 1994). Bilinen anti-mitotik maddelerin çoğu doğal yoldan sentez edilmiş kimyasallardır. Bunlar içinde, günümüzde en yaygın kullanılan “kolçisin” ve “nokodazol” olarak adlandırılan antimitotik maddelerin, mikrotübül oluşumunu engelleyerek etki gösterdiği bilinmektedir (Manfredi ve Horwitz, 1984; Diez vd., 1987; Peyrot vd., 1992). Yaygın olarak kullanılan bir başka kimyasal olan sitokalasin, hücrede aktin polimerleşmesini önlemektedir (Bowman ve Rand, 1980; Ozban, 1998). Podofilotoksin ise tubulin heterodimer yapısını değiştirerek etkili olduğu belirtilmiştir (Correia, 1991). Antitümör madde olarak yaygın şekilde kullanılan vinblastin ve vinkristin’ in mikrotübülleri stabilize ederek etkili oldukları açıklanmaktadır (Jordan vd., 1992). Vinka alkaloidleri’ nin, tubulin proteinlerine bağlanarak ya da transform hücrelerin zarlarındaki büyüme faktörlerini engelleyerek, hücre bölünmesini bloke ettikleri belirtilmiştir (Manfredi ve Horwitz, 1984; Hanuske vd., 1994). “Taksol” adı verilen bir diğer antimitotik maddenin ise mikrotübül dimerlerinin birleşmesine engel olarak, mikrotübül sentezini engellediği ortaya konmuştur (Manfredi ve Horwitz, 1984; Alberts vd., 1989). Lee (1996) tarafından taksol’ün antimitotik etkisi vinblastin ve kolçisin ile karşılaştırılmış ve taksol’ün daha etkili olduğu ortaya konmuştur. Taksol’ün, ovaryum ve meme kanserlerinin tedavisinde olumlu etki gösterdiği bildirilmiştir (Makowski, 1995). Bir başka antimitotik ajan olan kolsemid’in etki mekanizmasının, taksol’ün etki mekanizması ile benzerlik göstererek, mikrotübül polimer yapılarını kararlı hale getirdiği bildirilmiştir (Lefvasseur ve Brown, 1987). Merkaptopeta-nol, hücrede mitotik merkezlerden sentriol-lerin duplikasyonunu önleyen bir antimitotik madde olarak belirtilmiştir (Alberts vd., 1989).

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 göstermektedir (Coley, 1997; Paci vd., 2001). Folik asit, purin ve pirimidin antimetabolit gruplarını oluşturan, antimitotik etkili kimyasal maddeler ise DNA, RNA ve protein gibi temel hücre moleküllerinin sentez basamaklarında en-zimleri inhibe ederek etkili olmaktadır. Antibiyotik niteliğinde bulunan antimitotik maddelerden kloramfenikol’ün,

protein sentezinde görev yapan enzimlerin aktivitesini; daktinomisin' in ise, hem DNA yapısını bozarak hem de mRNA sentezini engelleyerek antimitotik etki gösterdiği açıklanmıştır (Bowman ve Rand, 1980). Antibiyotik özellikteki antimitotik maddelere ayrıca doksorubisin, epirubisin, mitomisin, aklarubisin ve daunorubisin de örnek olarak gösterilmektedir (Kayaalp, 1989). Kanser tedavilerinde kullanılan sisplatin' in DNA çift zincirine çapraz bağlanarak antimitotik aktivite gösterdiği bilinmektedir (Abel, 2000; Wozniak vd., 2004).

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

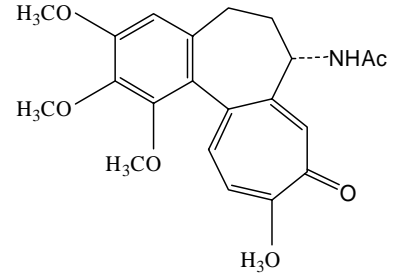
1.2. Antimitotik Olduğu Düşünülen Kimyasal Maddeler

Antimitotik etki gösteren doğal kimyasal ajanların, kimyasal yol ile sentez edilmiş olan türevlerinin de bu ajanlar gibi antimitotik etki gösterip göstermediklerini saptamak amacıyla deneysel çalışmalar yapılmaktadır. *In vitro* yapılan bir araştırma sonucunda MDL 27048 isimli maddenin antimitotik olduğu, etki mekanizmasının ise bilinen antimitotik maddelerden, kolçisin ve podofilotoksin' in etki mekanizmalarıyla benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Peyrot vd., 1992). Bir başka çalışmada ise antimitotik olduğu bilinen kimyasal maddelerin analogları sentez edilerek, bu analogların tubulin aktiviteleri üzerindeki etkileri gösterilmiştir (Iwasaki, 1993). Kolçisin, vin-blastin ve podofilotoksin' 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 de taksol gibi davranarak mikrotübülleri stabilize ettiği ortaya konmuştur (Voegelien, 1991).

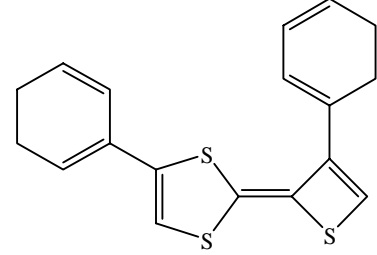
Antimitotik etkisi nedeniyle yaygın olarak kullanılan ve deniz süngerlerinden elde edilen doğal bir bileşen madde model alınarak, kimyagerler tarafından laboratuvar koşullarında sentezlenmiştir. Yapay yolla sentezlenen bu bileşenin iki değişik türevi, çalışmamızın kimyasal test materyalini oluşturmuştur (Şekil 1).

Bu çalışmada, antimitotik etkisi ve kimyasal yapısı çok iyi bilinen kolçisin' e yapı benzerliği olan bu kimyasal maddelerin, *in vivo* koşullarda oluşturabileceği antimitotik etkilerinin belirlenmesi de amacımızı oluşturmuştur.

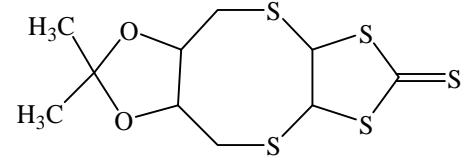
Bu amaca yönelik olarak yaşam boyu mitotik aktivite gösteren kan hücrelerinin oluşum ve olgunlaşma yeri olan, aynı zamanda RES' de yer alan hemapoietik dokulardan, dalak ve kemik iliği hedef seçilmiştir. Hemapoietik dokular üzerindeki olası etkilerini ortaya koymak açısından ayrıca kan dokusu inceleme materyali olarak seçilmiştir.



Kolçisin



T3



T5

Şekil 1 Antimitotik etkisi bilinen maddelerden kolçisin ve Bis tetrathiafulvalene türevlerinin açık kimyasal formülleri.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Deney Hayvanları

Deneysel çalışmamızda 12-15 haftalık, ortalama ağırlığı 250-300 gr. olan ergin Wistar cinsi toplam 40 adet sıçan kullanılmıştır. Cinsiyet ayrımı olmaksızın deney hayvanı olarak kullanılan tüm sıçanlar standart sıçan yemi ile beslenmişlerdir (Orhan, 1988).

2.2 Kimyasal Maddeler

Çalışmamızda TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi' nde yapay olarak sentez edilmiş bis (ethylenedithia) tetrathiafulvalene (BEDT) ve tetrathiafulvalene (TTF) türevi olan T3 ve T5 kodlu kimyasal maddeler kullanılmıştır (Bryce, 1995). Katı haldeki bu maddelerin, deney hayvanlarına enjeksiyonlarını sağlamak amacı ile dimetil-sülfoksit (DMSO) içinde çözülmesi sağlanmıştır (Levasseur ve Brown, 1987). Deney sonuçlarını karşılaştırmak üzere pozitif kontrol olarak kolçisin (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 kullanı-

lan deney hayvanları ile aynı koşulları ve stresi yaşama- ları amacıyla fizyolojik su enjeksiyonu yapılmıştır. Böylece çalışmamızda kullanılan tüm hayvanlardan iki temel grup oluşturulmuştur:

1. Kontrol grubu; (n= 25)
 - 1a) Fizyolojik su, negatif kontrol grubu,
 - 1b) DMSO kontrol grubu,
 - 1c) Kolçisin, pozitif kontrol grubu,
2. Deney grubu; (n= 15)
 - 2a) T3 maddesi uygulanmış deney grubu,
 - 2b) T5 maddesi uygulanmış deney grubu,

Ön çalışmalarımızda etkili dozu bulmak için kolçisin, T3 ve T5 maddelerinin herbiri için üçer sıçan- dan oluşturulmuş üçer deney grubu oluşturulmuştur. Deney gruplarındaki hayvanların ağırlıklarına oranla herbir kimyasal maddenin 0.1 mg/gün, 0.2 mg/gün ve 0.4 mg/gün' lük dozları 2.5 µl. DMSO içinde çö- zülmüşlerdir. Çözeltiler serum fizyolojik ile 0.5 ml'ye tamamlanarak enjekte edilmiştir. 0.4 mg/gün kolçisin verilen grupta 2. enjeksiyondan sonra; 0.2 mg/gün kolçisin verilen grupta 5. enjeksiyondan sonra tüm hayvanların öldükleri görülürken, 0.1 mg/gün kolçisin verilen grupta 7. enjeksiyondan sonra da tüm hayvanların yaşadıkları görülmüştür. T3 ve T5 maddesi uygula- nan gruplardaki hayvanlarda ise 7. enjeksiyondan sonra da ölüm meydana gelmemiştir. Ancak 0.4 mg/gün T3 ve T5 verilen grupların hayvanlarında 5. enjeksiyondan sonra davranış ve dış görünümünde bozukluklar görülmüştür. Tüm bu veriler doğrultusunda kolçisinin pozitif kontrol olarak kullanılacağı deneysel çalışma- mızda bu madde esas alınarak günlük enjeksiyon için her bir kimyasal deney materyalinden günlük 0.2 mg olmak üzere dört enjeksiyon yapılması planlanmıştır.

Dört gün süren uygulamalarda, kimyasal deney materyali intraperitoneal olarak, her bir deney hayva- nına 0.5 ml/gün enjekte edilmiştir (Ravid vd., 1985; Sarkar vd., 1993; Ashby vd., 1993).

2.3 Doku Örneklerinin Alınması

Kullanılan sıçanların tümünden, kalbin karıncık bölgesinden antikoagülan (%3.8 sodyumsitrat) çözeltisi içine kan örneği alınmıştır (Berkarda ve Eyüboğlu, 1983; Cozon vd., 1991). Tüm kanı alınarak öldürülen deney hayvanlarının dalakları tamamen çıkarılarak 0,5 cm³ lük parçalara bölünmüş ve taze olarak hazırlanmış Bouin fiksatifine içine aktarılmıştır (Prophet, 1992). Miyeloid doku incelemeleri için deney hayvanlarının femoral kemik iliği alınmıştır (Leung vd., 1985).

2.4 Mikropreparatların Hazırlanması

2.4.1 Kan Preparatlarının Hazırlanması

Deney hayvanlarından alınan kan örneklerinin her birinden bir seri yayma preparat yapılmıştır (Berkarda ve Eyüboğlu, 1983). Preparatlar saf metil alkol içinde 5 dakika bekletilerek fikse edilmişlerdir. May-Grünwald boyamanın ardından, Giem-sa [0.6 g Giemsa (Fluka), 50 ml metil alkol, 25 ml. gliserin] boyası ile 20-25 da-

kika kadar boyanmıştır (Hayhoe ve Flemans, 1982; Sobti vd., 1991; Henderson vd., 1993).

Çalışmamızda her bir deney grubuna ait kan ör- neklerinde hemositometrik yöntem ile Thoma lamı kullanılarak hücre sayımı yapılmıştır (Tamer vd., 1989; Onur, 1991). Örnekleme yöntemi ile seçilen kanlara ait parametreler hücre sayıcı ile yapılan kan sayımları ile desteklenmiştir.

2.4.2 Kemik İliği Preparatlarının Hazırlanması

Deney hayvanlarından alınan kemik ilikleri, içinde 0.5 ml RPMI 1640 (Sigma) bulunan 2 ml.' lik polietilen tüpler içine alınarak önce 1000 devir/dakika (rpm)'da 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp yerine 0.5 ml fosfat tuzu tampon çözeltisi (PBS) ilave edilerek ikinci kez 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant tekrar atılıp yerine absölu metanol : glasiyal asetik asit karışımından (3:1) 0.5 ml ilave edile- rek santrifüj tekrarlanmıştır. Süpernatant atılıp yerine absölu metanol : glasiyal asetik asit karışımı tekrar ilave edilmiştir (Farooqi vd., 1993). Her tüpteki dokudan birer seri yayma preparatlar hazırlanmıştır (Rooney ve Czepulkowski, 1992). Preparatlar May-Grünwald (Sigma) ile 3-5 dakika, sonra da Giemsa ile 5-10 dakika süre ile boyanmıştır (Clark, 1981; Amer ve Aboul, 1985).

2.4.3 Dalak Preparatlarının Hazırlanması

Bouin fiksasyonundan sonra doku parçaları %50'lik etanol içinde bekletilerek yıkanmışlardır. Do- kuların dehidratasyonu ve parafinizasyonu ta- mamlandıktan sonra parafin bloklar oluşturulmuştur (Prophet, 1992). Mikrotom (Mikrom HM 310) ile 5'er mikrometre (µm) kalınlığında doku kesitleri alınmıştır. Kesitler, Hematoksilin & Eosin ile boyanmıştır (Gridley, 1954; Banchroft ve Stevens, 1977; Bills vd., 1992).

3. BULGULAR

3.1 Kan Dokusu

3.1.1 Kontrol Grubu Hayvanların Kan Parametreleri

Negatif kontrol grubu hayvanlarında kan sayımları yapıldığında toplam lökosit sayısının en yüksek (6333 adet/mm³), DMSO uygulanan kontrol grubu hayvanla- rında daha az (5083 adet/mm³) ve pozitif kontrol grubu hayvanlarında da en düşük sayıda (2250 adet/mm³) olduğu saptanmıştır (Tablo 3.1; Şekil 3.1).

Eritrosit sayısının negatif kontrol grubu hayvan- larında en düşük sayıda (8 800 000 adet/mm³), DMSO uygulanmış kontrol grubu hayvanlarında daha fazla (9 533 000 adet/mm³), kolçisin uygulan- mış pozitif kontrol grubu hayvanların kanlarında ise en yüksek sayıda (10 000 000 adet/mm³) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.1; Şekil 3.1).

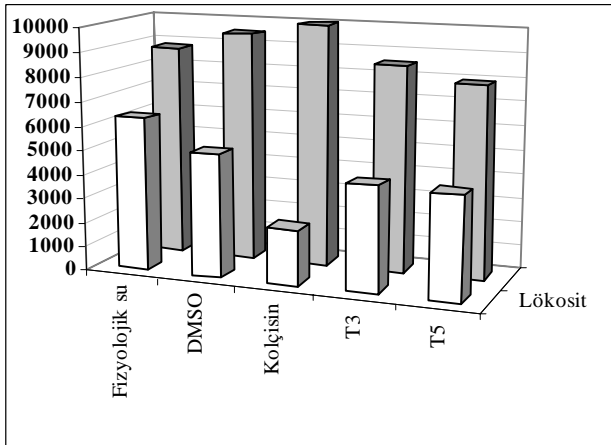
3.1.2 Deneysel Grubu Hayvanların Kan Parametreleri

Deneysel gruba hayvanlarına ait lökosit sayım sonuçlarından elde edilen değerler kendi aralarında karşılaştırıldığında T3 (4325 adet/mm³) ve T5 (4216 adet/mm³) maddesinin uygulandığı hayvanların periferik kanlarındaki lökosit sayıları arasında fark saptanmamıştır (Tablo 1; Şekil 2).

Deneysel grubundaki hayvanların kanlarında eritrosit sayımı yapıldığında ise hücre sayılarının 7 800 000- 9 000 000 adet/mm³ değerlerinin arasında değiştiği ve aralarında değer olarak büyük farkların olmadığı saptanmıştır (Tablo 1; Şekil 2).

Tablo 1. Kontrol ve deneysel gruba hayvanlarına ait kan sayımlarının ortalama değerleri.

GRUPLAR	HAYVAN SAYISI (n)	LÖKOSİT (adet/mm ³)	ERİTROSİT (adet/mm ³)
Fizyolojik su	8	6333	8800000
DMSO	9	5083	9533000
Kolçisin	8	2250	10000000
T3	8	4325	8533000
T5	7	4217	7933000



Şekil 2. Kontrol ve deneysel gruba hayvanlarına ait kan sayımlarının ortalama değerlerini gösteren grafik. [Lökosit: (adet/mm³), Eritrosit: (adet/mm³)X1000]

3.1.3 Lökosit Hücrelerin Morfolojisi

Tüm hayvanların periferik kan preparatları incelenmiş ve granülosit serisine ait hücrelerden bazofil ve eosinofil hücrelerine hiç rastlanmamıştır. Bu seriyeye ait olan nötrofil hücrelerinin, negatif kontrol grubu hayvanların yayma kan preparatlarında en fazla (\approx 19), pozitif kontrol grubunda ise en az değerde (\approx 7) olduğu tespit edilmiştir. DMSO uygulanmış kontrol grubunda bulunan sıçanların nötrofil hücrelerinin hipertrofi gösterdiği, çekirdek yapılarında da hipersegmentasyon bulunduğu, ancak bu segment

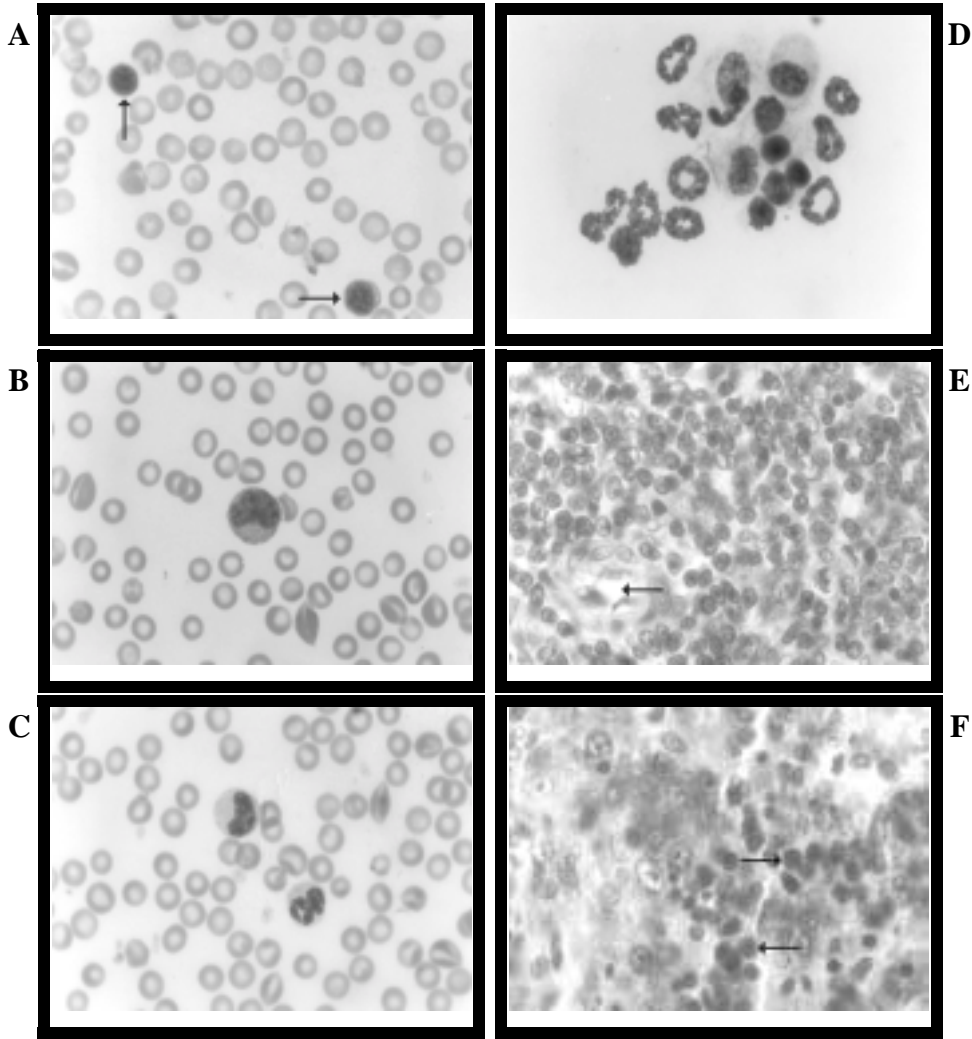
büyükliklerinde değişme olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4). Pozitif kontrol grubu hayvanların kanlarındaki nötrofil hücrelerin çaplarında değişme olmamasına karşın çekirdek segmentlerinin sayısında azalma, büyükliklerinde ise artma olduğu belirlenmiştir (Şekil 5). Nötrofil hücrelerin sitoplazmalarının, DMSO ve pozitif kontrol grubu hayvanlarında zayıf eosinofili gösterdiği tespit edilmiştir. Agranülosit serisine ait kan hücrelerinden lenfositlerin sayıca en fazla DMSO (\approx 20), ikinci olarak serum fizyolojik (\approx 17), en az ise kolçisin verilmiş (\approx 14) kontrol gruplarında buldukları tespit edilmiştir. Tüm kontrol gruplarında gözlenen lenfosit büyükliklerinin değişmemiş olmasına karşın, pozitif kontrol grubundaki lenfosit çekirdeklerinin sitoplazmayı tamamen kaplamış olduğu (Şekil 5), diğer grupların lenfositlerinde ise az da olsa sitoplazmanın görüldüğü belirlenmiştir. Aynı seride yer alan monositlerin sayıca en fazla olarak DMSO uygulanmış kontrol grubu hayvanlarının (\approx 20) ve pozitif kontrol grubu hayvanlarının (\approx 19); en az olarak ise negatif kontrol grubu hayvanların kanlarında (\approx 14) buldukları tespit edilmiştir. Monosit hücrelerinin büyüklükleri incelendiğinde ise sadece negatif kontrol grubunda sayıları yaklaşık %0.5 olan geniş çaplı hücreler olduğu saptanmıştır (Şekil 3).

Nötrofillerin kan preparatlarındaki yoğunluğunun T3 ve T5 maddelerinin uygulandığı hayvanlarda negatif kontrol grubundakilere göre daha düşük olduğu saptanmıştır. Nötrofil hücrelerinin çapları negatif kontrol grubuna oranla, T3 ve T5 maddelerinin uygulandığı gruplarda daha küçük olduğu gözlenmiştir. T3 maddesinin uygulandığı gruptaki nötrofillerin çekirdeklerinde segment sayısında azalma (Şekil 6), buna karşın T5 maddesinin verildiği gruptaki nötrofillerde çekirdeklerin band formunda ve segmentasyonun oldukça az olduğu ayrıca sitoplazmalarının daha eosinofilik boyandıkları gözlenmiştir (Şekil 7).

T3 kimyasal maddesinin uygulandığı grupta bulunan ve agranülosit serisine ait olduğu düşünülen monosit benzeri hücrelerdeki çekirdeğin, hemen hemen tüm hücreyi kaplamış olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6). Kanda bulunan granülsüz hücrelerden lenfositlerin, deneysel grupları arasında farklılık göstermediği bulunmuştur. Lenfosit hücreleri büyüklük ve şekil açısından incelendiğinde, T5 maddesi uygulanmış grupta T3 maddesi uygulanmış gruba göre yaklaşık %20-30 daha küçük oldukları saptanmıştır (Şekil 7).

3.1.4 Eritrosit Hücrelerinin Morfolojisi

Negatif kontrol grubu hayvanlarının tüm kan preparatlarındaki eritrositlerin yaklaşık %5 oranında oval ya da iğ biçimli oldukları saptanmıştır. Preparatlarda gözlenen eritrositlerin yaklaşık olarak %1' inin hedef hücreleri olduğu belirlenmiştir (Şekil 3). DMSO uygulanmış hayvanlar ile pozitif kontrol grubu hayvanlarının kanlarındaki oval ya da iğ biçimli eritrositlerin, negatif kontrol grubundakilere oranla daha az olduğu tespit edilmiştir (DMSO \approx 2,



Şekil 3 Fizyolojik su uygulanmış negatif kontrol grubu hayvanlarına ait değişik doku ve organ preparatlarının X330 büyütmedeki görünüşleri. (A) Lenfositler. (B) Büyük monosit hücresi. (C) Monosit ve nötrofil. (D) Kemik iliği yayma preparatının ayrıntılı görünümü. (E) Dalak preparatında beyaz pulpa ve merkezi arterin görünümü. (F) Dalak preparatında kırmızı pulpa ve küçük gruplar oluşturmuş, koyu bazofilik hücrelerin görünümü.

negatif kontrol \cong %7). Buna karşın, pozitif kontrol grubunda bulunan eritrositlerin, yaklaşık %5'inin çıkıntılı zar yapısına ve yıldızsı görünümüne sahip oldukları tespit edilmiştir (Şekil 5). Tüm kontrol gruplarındaki eritrositler karşılaştırıldığında hücre büyüklüklerinin değişmediği saptanmıştır.

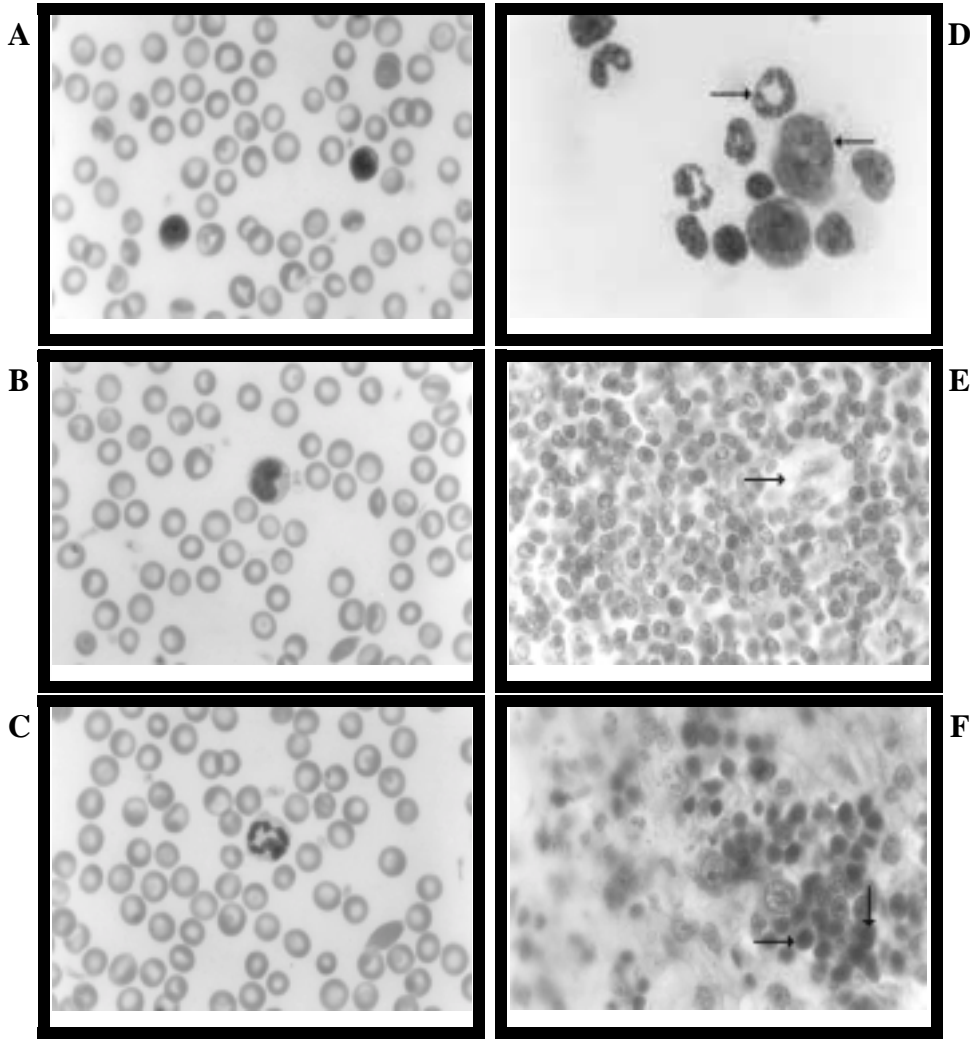
T3 maddesi uygulanan grupta %12 ve T5 maddesinin uygulandığı grupta %2 oranlarında daha küçük çaplı eritrositlere rastlanmıştır. Ayrıca T3 kimyasalının uygulandığı hayvanlarda yaklaşık %20 oranında deforme olmuş eritrositler tespit edilmiştir. T5 kimyasal maddesinin test edildiği hayvanlarda eritrosit deformasyonunun daha az olduğu, ayrıca hedef hücrelerinin olduğu ve pozitif kontrol grubu preparatlarındaki hedef hücrelerinin oranlarıyla paralellik gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak T3 maddesinin test edildiği deney hayvanlarının periferik kanlarındaki hedef hücre oranlarının T5 deney grubu hayvanlarından daha fazla olduğu ve DMSO uygulanmış kontrol grubundaki hedef hücrelerinin sayılarıyla benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

3.2 Miyeloid Doku (Kemik İliği)

3.2.1 Kontrol Grubu Hayvanların Miyeloid Dokuları

Pozitif kontrol grubu hayvanlarının kemik iliğinde yapılan incelemeler, bu grupta bulunan eritrosit öncüllerinden normoblast hücrelerinin en yüksek değerde (\cong %65) olduğunu ortaya çıkarmıştır. Ancak normoblastların, DMSO uygulanan kontrol grubunda daha az (\cong %30), negatif kontrol grubu hayvanlarında ise en düşük (\cong %20) değerde bulunduğu belirlenmiştir. Pozitif kontrol gruplarında normoblast çekirdeklerinin düzgün oval olmadığı, değişik boyutlarda ve loba benzer çıkıntılıların bulunduğu tespit edilmiştir (Şekil 5).

Negatif kontrol grubu hayvanlarının kemik iliği preparatlarındaki nötrofil metamiyelosit hücrelerinin sayısına (\cong %40) oranla, DMSO uygulanmış kontrol gruplarında daha düşük (\cong %25) olduğu saptanmıştır. Pozitif kontrollerin miyeloid doku preparatlarında nötrofil metamiyelosit hücrelerine hiç rastlanmamıştır. DMSO uygulanmış grubun nötrofil



Şekil 4 DMSO uygulanmış kontrol grubu hayvanlarına ait değişik doku ve organ preparatlarının X330 büyütmedeki görüntüleri. (A) Lenfositler. (B) Açık bazofilik monosit. (C) Hipertrofi ve çekirdek hipersegmentasyonu göstermiş nötrofil. (D) Kemik iliği yayma preparatında düzgün halkasal ve koyu bazofilik çekirdekli nötrofil metamiyelositler. (E) Dalak preparatında beyaz pulpa ve daralmış merkezi arterin görünümü. (F) Dalak preparatında kırmızı pulpa ve küçük gruplar oluşturmuş, koyu bazofilik hücrelerin görünümü.

metamiyelosit hücre çekirdeklerinin, negatif kontrol grubundakilere oranla daha düzgün ve oval biçimli olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4).

3.2.2 Deney Grubu Hayvanların Miyeloid Dokuları

T5 maddesinin test edildiği grupta normoblast hücre yoğunluklarının yaklaşık %10-12 oranında olduğu saptanmıştır. Ancak T3 maddesinin test edildiği grupta bu oranın %10-13 daha da arttığı görülmüştür. Biçim olarak, normoblast hücrelerinin oval ve dairesel görünümlü çekirdeklerinin, T3 ve T5 kimyasal maddelerinin uygulandığı hayvanlarda az oranda deforme olduğu, hücrelerin boyanma özelliklerinin ise aynı olduğu tespit edilmiştir. (Şekil 6, 7).

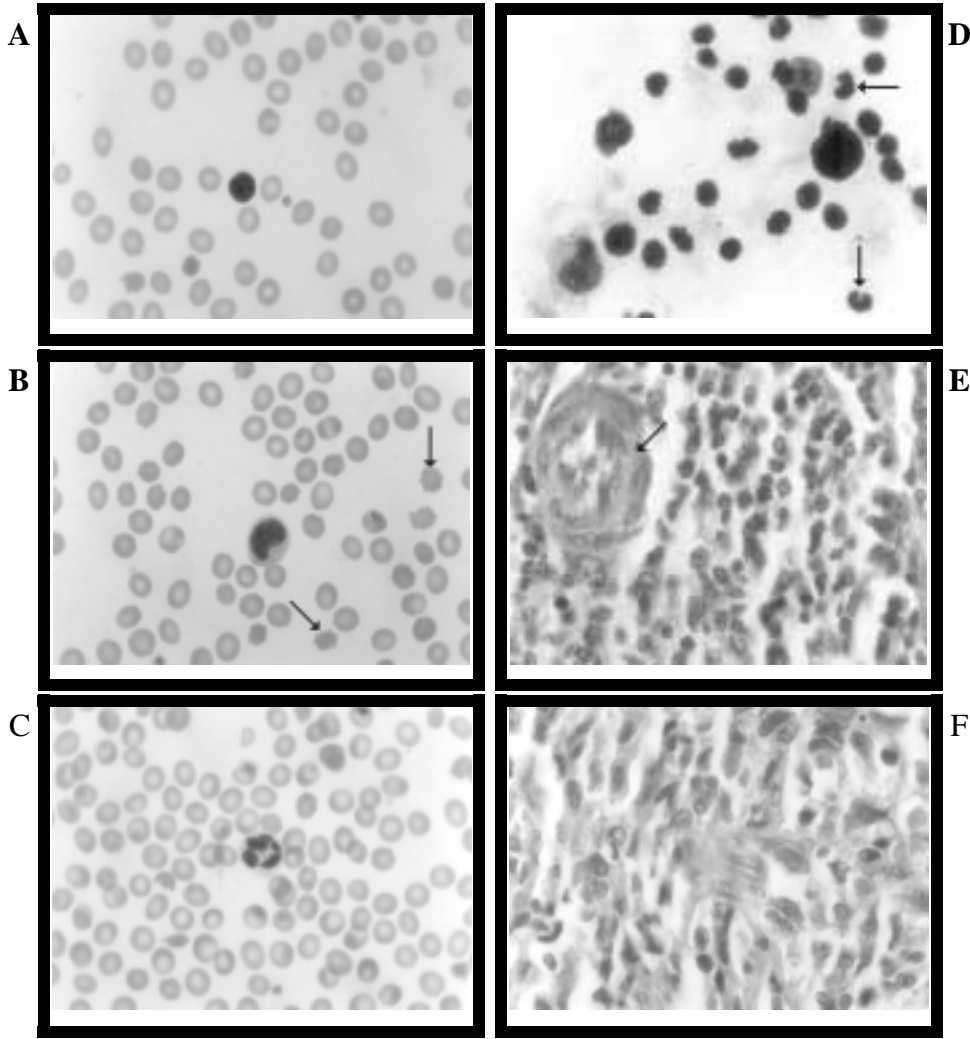
Deney grubu hayvanlarındaki nötrofil metamiyelosit hücre sayılarının yaklaşık %4-5 oranında olduğu tespit edilmiştir. T3 test maddesinin uygulandığı grupta, nötrofil metamiyelosit çekirdeklerinin halkasal şekillerinin deforme olduğu saptanmıştır. Ayrıca, nötrofil metamiyelosit hücrelerinin

≈%30'unda çekirdeklerin yumaklaşmış oldukları görülmüştür (Şekil 6). T5 maddesinin uygulandığı grupta ise nötrofil metamiyelositlerin çekirdeklerinin aşırı bant kalınlaşması gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 7).

3.3 Dalak Morfolojisi

3.3.1 Kontrol Grubu Hayvanların Dalak Dokuları

DMSO gruplarında eosinofilik alanların dallanarak nodüllerin aralarına ve yer yer nodül içlerine kadar uzandıkları belirlenmiştir. Negatif kontrol hayvanlarının dalak kesitlerinde, bazofilik adacıkların küçük ve sayıca çok olduğu, DMSO kontrol grubunda ise bu adacıkların büyük ve sayıca az olduğu saptanmıştır. Dalaktaki toplam lenf nodülü sayıları açısından, negatif kontrol ve DMSO uygulanmış gruplara göre, pozitif kontrol gruplarının nodül sayılarında azalma olduğu tespit edilmiştir. Pozitif kontrol grubunda nodül çaplarının, diğer kontrol gruplarına oranla küçüldüğü tespit edilmiştir. Ayrıca negatif ve



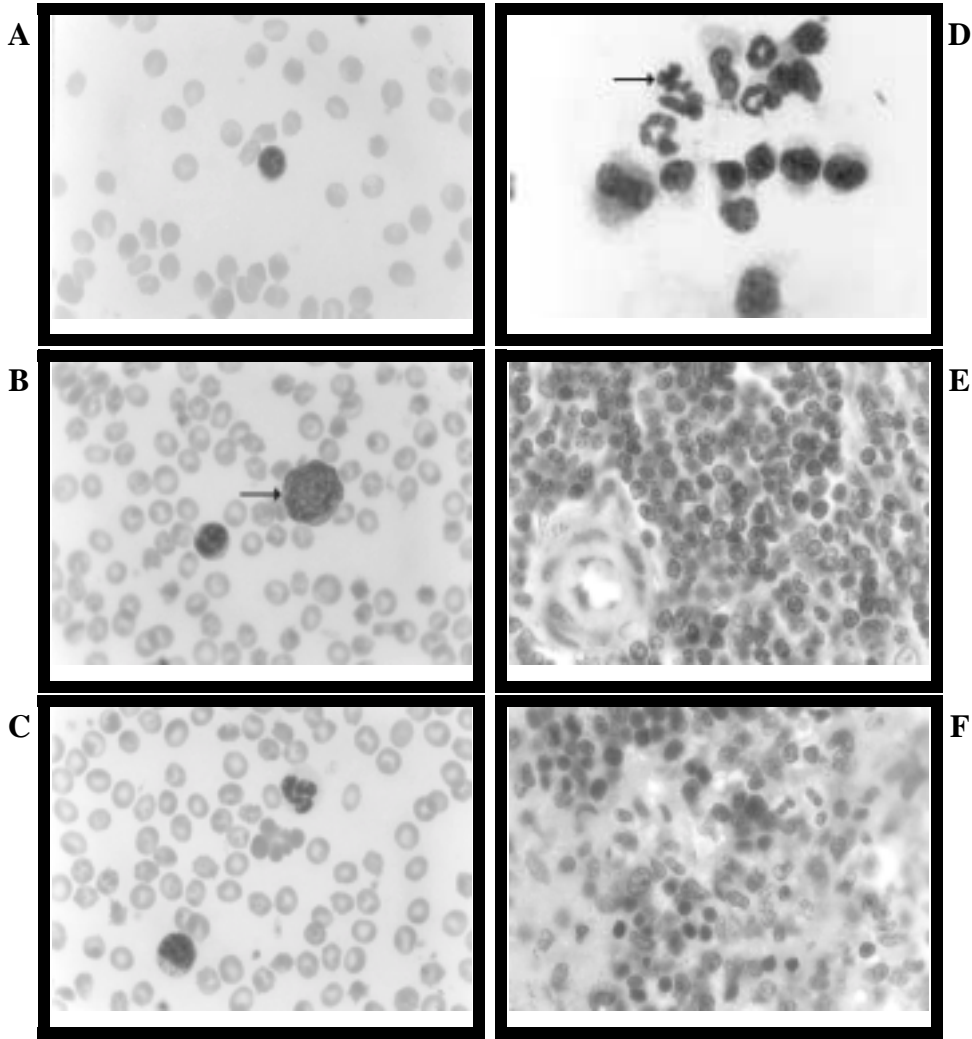
Şekil 5 Kolçisin uygulanmış pozitif kontrol grubu hayvanlarına ait değişik doku ve organ preparatlarının X330 büyütmedeki görünüşleri. (A) Koyu bazofilik lenfosit. (B) Koyu bazofilik monosit ve ok ile gösterilen yıldızsı görünümlü eritrositler. (C) Hipertrofik nötrofil. (D) Kemik iliği yayma preparatında zar çıkıntılı normoblastlar. (E) Dalak preparatında beyaz pulpa, koyu eosinofilik arter ve koyu bazofilik hücreler ile aralarındaki geniş boşluklar. (F) Dalak preparatında kırmızı pulpa ve geniş boşluklar.

DMSO kontrol gruplarının dalaklarındaki lenf nodüllerinin çoğunda merkezi açık boyanmış dairesel bir alan gözlenirken, pozitif kontrollerde benzer bir yapıya rastlanmamıştır.

DMSO ve kolçisin uygulanmış kontrol gruplarına ait dalak preparatlarında görülen lenf nodüllerindeki arter çapları, görsel olarak 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 4). Pozitif kontrol grubundaki arter duvarının diğer kontrol gruplarına oranla çok daha geniş olduğu ve koyu eosinofilik boyanma özelliği gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 5). Ayrıca endotel hücrelerinin biçimsel bozukluk ve deformasyon göstererek lümene doğru çıkıntılar yapmış oldukları saptanmıştır. Bununla birlikte media tabakası genişlemiş olarak gözükün pozitif kontrol grubu arterlerinin dış çevresinde düzgün ve dairesel dizili, oval çekirdekli hücrelerin var olduğu dikkati çekmiştir (Şekil 5).

Dalak kesitlerinin beyaz pulpalarındaki hücreler arası boşlukların, negatif ve DMSO kontrol gruplarında düzensiz, homojen ve az, buna karşın pozitif kontrol grubunda tek yönlü ve daha çok olduğu bulunmuştur. Bu bölgedeki sayısal hücre yoğunluklarının, negatif kontrol grubuna oranla, pozitif kontrol gruplarında az, DMSO uygulanmış grupta ise daha yoğun olduğu tespit edilmiştir. Negatif kontrol ve DMSO kontrol gruplarında koyu bazofil çekirdekli, küçük ve oval biçimli hücrelere rastlanılmış olup bu tip hücrelerin pozitif kontrol grubu dalaklarında daha da fazla sayıda olduğu gözle çarpmıştır. Açık boyanmış, küçük, oval şekilli hücre sayılarının DMSO ve pozitif kontrol gruplarında, negatif kontrole göre azalmış olduğu belirlenmiştir. Fizyolojik su ve DMSO kontrol gruplarının beyaz pulpalarında bulunan açık boyanmış, büyük oval çekirdekli hücrelere, diğer grupta hiç rastlanmamıştır.

Kontrol grubunda kırmızı pulpadaki hücre dağılımlarının homojen olmadıkları, kolçisin uygulanmış grupta ise bu bölgedeki hücrelerin çoğunlukla deform oldukları dikkati çekmiştir (Şekil 5). Şekil bozukluğu gösteren bu hücrelerin sıralı gibi



Şekil 6 T3 kimyasal maddesi uygulanmış deney grubu hayvanlarına ait değişik doku ve organ preparatlarının X330 büyütmedeki görünüşleri. (A, B) Lenfositler. (B) Monosit benzeri hücre. (C) Büyük granüllü monosit benzeri hücre ve çekirdeği az segmentli nötrofil. (D) Kemik iliği yayma preparatında çekirdeği yumaklaşmış nötrofil metamiyelositler. (E) Dalak preparatında beyaz pulpa ve arterin görünümü. (F) Dalak preparatında kırmızı pulpa ve bazofilik hücreler ile aralarındaki koyu eosinofilik geniş alanların görünümü.

görülen dizilimde oldukları, silindirik çekirdekli hücrelerin ise bu dizilimin yönüne dik olarak farklı bir dizilim gösterdikleri tespit edilmiştir. Fizyolojik su uygulanmış grupta koyu bazofilik çekirdekli hücrelerin küçük gruplar meydana getirmiş oldukları (Şekil 3), DMSO grubunda bulunan aynı tip hücrelerin ise büyük ve yoğun gruplar oluşturdukları, bu hücre grupları aralarındaki alanlarda ise geniş boşlukların oluştuğu dikkati çekmiştir (Şekil 4).

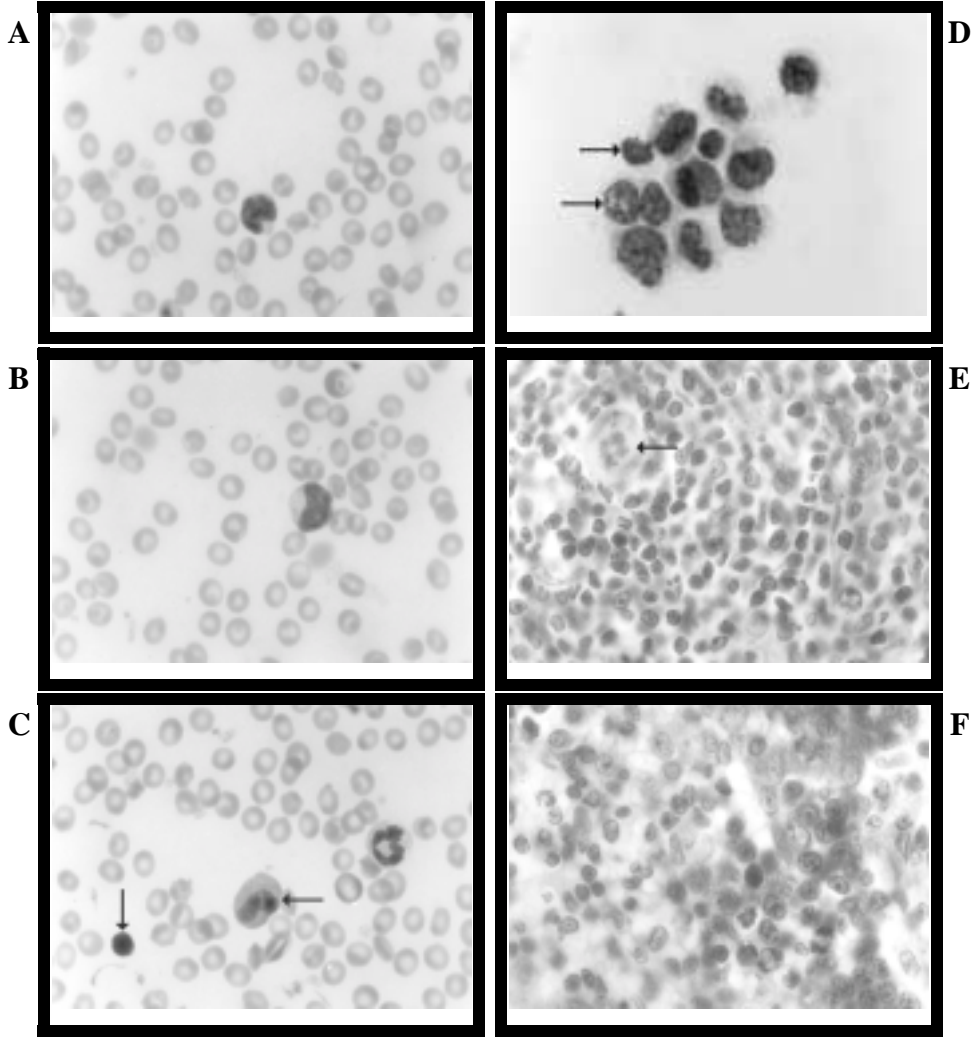
3.3.2 Deney Grubu Hayvanların Dalak Dokuları

T3 ve T5 maddesi uygulanmış grupların dalak kesitlerinde küçük görünen ve sadece kırmızı pulpada yer almış kanal biçimli yarıkların olduğu tespit edilmiştir. Deney grubu hayvanlarının dalak kesitlerinin karşılaştırılması sonucunda, kesitlerin genel görüntülerinde saptanmış olan lenf nodülü sayılarının birbirine sayıca benzerlik gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Dalak kesitlerinde, lenf nodüllerinin merkezine yakın bölgelerde lokalize olmuş merkezi arterlerin çap genişliği açısından, T3 maddesinin test edildiği grupta

daralmış olduğu saptanmış; ancak T5 kimyasalının test edildiği deney grubunda ise daha da daralarak arter lümeninin görülemeyecek duruma geldiği gözlenmiştir (Şekil 7). T5 maddesi uygulanmış hayvanların dalak preparatlarında, arter endotelinde, lümeneye doğru çıkıntı yapmış bazofilik hücrelerin buldukları tespit edilmiştir (Şekil 7). T3 ve T5'in test edildiği grubun merkezi arterlerin media tabakalarının eosinofilik özellikte olduğu belirlenmiştir (Şekil 6, 7). T3 deney grubunda media tabakası içinde, damar lümenine paralel, iğ biçimli ve yer yer oval şekilli koyu bazofilik boyanmış hücrelere rastlanılmış (Şekil 6), T5 uygulanmış deney grubunda ise bu hücrelere seyrek olarak rastlanılmıştır.

Dalak kesitlerinde, beyaz pulpada dağılım gösteren hücrelerin T5 deney grubunda, sayıca yoğun ve hücrelerarası boşlukların az olduğu tespit edilmiştir (Şekil 7). T3 maddesi uygulanan grupta, dalakların beyaz pulpasında koyu bazofil çekirdekli, küçük ve oval biçimli hücreler tespit edilmiştir. Buna karşın, T5 maddesi uygulanan grupta, bu tip hücre sayı



Şekil 7 T5 kimyasal maddesi uygulanmış deney grubu hayvanlarına ait değişik doku ve organ preparatlarının X330 büyütmedeki görünümleri. (A) Küçük monosit. (B) Monosit. (C) Küçük lenfosit ve eosinofil sitoplazmalı nötrofil. (D) Kemik iliği yayma preparatında az deforme olmuş normoblastlar ve çekirdeği bant kalınlaşması göstermiş nötrofil metamiyelositler. (E) Dalak preparatında geniş boşluklu beyaz pulpa ve daralmış, eosinofilik merkezi arter. (F) Dalak preparatında kırmızı pulpa ve geniş boşluklar ile boya almamış hücresel yapılar.

larının belirgin biçimde az olduğu saptanmıştır. T5 maddesi uygulanmış grupta gözlenen çok sayıda açık boyanmış, küçük ve oval şekilli hücrelerin, T3 maddesi uygulanmış deney grubunda sayıca çok daha az olduğu tespit edilmiştir. Açık boyanmış, büyük ve oval çekirdekli hücrelerin, T5 maddesinin test edildiği grupta daha fazla olduğu da gözlenmiştir.

T3 maddesinin test edildiği grupta eosinofilik alanların geniş yer kapladığı tespit edilmiştir (Şekil 6). Benzer alanların, T5 deney grubunda da bulunduğu ancak eosinofilik olmadığı gözlenmiştir (Şekil 7). T3 uygulanmış grubun kırmızı pulpalarında farklı boyutlarda, koyu bazofilik, yuvarlak ve oval hücrelerin yer aldığı tespit edilmiştir. Açık bazofilik boyanmış, büyük hacimli ve küçük çekirdekli polimorf hücrelerin, T3 maddesinin test edildiği grupta az, T5 grubunda ise daha fazla sayıda olduğu belirlenmiştir. Sarı renkte boyanmış hücrelerin ise oransal olarak T3 grubunda az, T5 grubunda çok daha az oldukları gözlenmiştir. Ayrıca, T5' in test edildiği grubun kırmızı pulpalarında hiç boya almamış, çekirdekleri olmayan

ya da gözükmeyen, sıkı yapıda doku oluşturur görünümde hücresel yapılara da rastlanılmıştır (Şekil 7).

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hücrelerde mitozu durdurucu etkisi olduğu bilinen kolçisin gibi maddelerin çok hücreli organizmalara uygulandığında, mitotik aktivite gösteren tüm hücrelerin bu aktivitelerini olumsuz olarak etkileyeceği düşünülmektedir. Teerenhovi ve arkadaşları (1985) ile Ilfeld ve arkadaşları (1986) tarafından, kolçisin uygulanmış deney hayvanlarının kanlarındaki lenfosit sayısının azalmış olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda kolçisin uygulanan tüm hayvan gruplarının kan sayımları ve yayma kan preparatlarının incelemeleri ile kemik iliği ve dalak preparatlarına ait bulguların tümünde, mitotik aktivite gösteren hücrelerin, genelde sayıca azaldıkları saptanmıştır. Negatif kontrol grubunda-ki hayvanlar ile karşılaştırıldığında, pozitif kontrol grubu hayvanların kanlarındaki lenfosit ve nötrofillerin 2/3 oranında azalması, çalışmamızın en çarpıcı sonuçlarından birisidir. Yaptığımız

çalışma daha önce yapılan çalışmalar ile bu açıdan paralellik göstermiştir.

Kolçisinin lökositler üzerindeki bu olumsuz etkisi, çalışmamızın kemik iliği preparatlarında nötrofil metamiyelosit hücrelerinin bulunmamasıyla paralel değerlendirilebilir. DMSO organik çözücüsünün canlı yapılara uygun olmadığı, yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Hayashi vd., 1994). Lökositler seriye ait hücrelerin yapımı, organizmalarda birden fazla doku ve organda gerçekleşmektedir (Paker, 1990). Bu nedenle organizmadaki sayıları fazla olması gerekirken, çalışmamızda DMSO kontrol grubu hayvanların lökositlerinde azalma, DMSO'nun çalışmalarda sözü edilen toksik etkisinin olduğunu gösterir niteliktedir (Correia, 1991). Çalışmamız ve daha önce verilen bilimsel çalışmalar, deney hayvanlarına uygulanan bir mitotik inhibitörün etkisinin, lökosit sayılarına bakılarak ortaya konulabileceğini göstermektedir. T3 ve T5 maddelerinin, negatif kontrole oranla, lökosit hücre sayılarında bir azalmaya neden olduğundan hücrelerdeki mitotik aktivite üzerine olumsuz bir etki yaptığı söylenebilir. Kolçisin uygulanmış hayvanların dalağı genelde bazofilik boyanma özelliği göstermiş ve ayrıntılı incelemelerde de lenfositlerin lenfoblastlara oranla sayıca artmış olduğu ve nodüllerin klasik görüntülerinin kaybolmasına da neden olduğu görülmüştür. Bu durum, kolçisinin 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. Kolçisin uygulanmış hayvanların dalak preparatları ayrıntılı incelendiğinde, negatif kontrole göre hücre sayısında ve çeşitinde belirgin azalma yanında, hücrelerin belirli doğrultuda dizilim gösterdikleri dikkat çekmektedir. Çalışmamızda da T kodlu maddelerin uygulandığı hayvan dalaklarında, normal görünümlü, belirli çapta, sınırları belirgin, açık ve koyu alanların görüldüğü nodüllerin tespit edilememesi, bu hayvanlarda lenf yapım ve olgunlaşmasının olumsuz olarak etkilediğinin bir göstergesidir. T3 maddesinin uygulandığı hayvanların dalak kesitlerinde tespit edilmiş ve açık boyanmış geniş alanlardaki hücrelerin eritrositler olduğu düşünülmektedir. Bu düşünce, dolaşım kanıyla gelen eritrositlerin, azalan lenfositlerin oluşturduğu boşlukları doldurmasıyla açıklanabilir. Ancak bu boşlukların büyüklük ya da genişliği düşünüldüğünde, sadece eritrositlerin bu boşlukları doldurmasını düşünmek yanlış olur. Organizmada hücre ve dokular arası tüm bolukların bağ ve destek dokularıyla kaplı oldukları, bu dokularda hücre sitoplazmaları ve şekilsiz ara maddelerinin genel olarak eosinofilik boyanma özelliği gösterdiği bildirilmektedir (Cireli, 1993; Erbeni, 1987; Akay, 1996). Bu bilgiler ışığında T3 uygulanmış hayvanların dalaklarında, hücreler arası boşluklarda yoğun olarak gözükten eosinofilik alanların, bağ dokusu olduğu düşünülmektedir. Ayrıntılı incelemelerde gözlenen uzun, oval ya da iğ biçimli çekirdekle-

re sahip ve bağ dokusu hücrelerinin özelliğini gösteren yapılarıdaki artış, bu görüşü desteklemektedir.

Dalak kesitlerinde bir bulgu olarak, antimitotik etkili olan kolçisinin, arter lümeni ve media tabakasını genişlettiği ortaya çıkmıştır. T kodlu maddelerin uygulandığı hayvanların dalak arterleri üzerine etkilerinin kolçisine benzemesi nedeniyle, anti-mitotik etkili oldukları söylenebilir. Ancak bu maddelerin 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 T3 ve T5 kodlu maddelerin lökosit sayılarına etkileri karşılaştırmalı olarak incelenip, organizmanın tüm hücrelerine genelleştirildiğinde etkili mitoz durdurucu madde oldukları ortaya çıkmaktadır. Kemik iliği preparatlarındaki lökositler seriye ait nötrofil metamiyelosit hücrelerinin sayıca incelenmesi sonucu elde edilen % 4-5 oranından T3 ve T5 maddelerinin etkili olduğu açıklık kazanmıştır. Ayrıca, lökositler seriye ait hücrelerin dramatik bir şekilde azalmasına yönelik bu bulgu, periferik kandaki lökositler seriye ait hücrelerdeki azalmanın, bu maddelerin çözücüsü olarak kullanılan DMSO etkisi nedeniyle olmadığının da bir kanıtı olarak kabul edilebilir.

Normoblast hücrelerinin sayısı, kolçisin uygulanmış olan hayvanlarda yüksek bulunmuştur. Bu hayvanlarda periferik kana bakıldığında, sayıca yüksek olduğunu gördüğümüz eritrositlere karşın, lökositlerin düşük olduğu saptanmıştır. Aynı deney grubunun kemik iliği preparatlarında nötrofil metamiyelositlere hiç rastlanılmamıştır. Bu durumda periferik kanda eritrosit yarılanma ömürlerinin, lökositlere oranla uzun olduğu (Kayaalp, 1989) düşünülerek, kemik iliğinde üretimi durdurulmuş tüm hücreler arasında normoblastların sayıca yoğunluk göstermiş olması, olası bir durum olarak karşılanmıştır. Benzer olarak, bulgularımızda negatif kontrole oranla, kolçisin uygulanan pozitif kontrol grubu hayvanların, periferik kanlarındaki eritrosit miktarındaki artış, kolçisinin dalak üzerindeki olumsuz etkileriyle açıklanabilir. Çalışmamızdaki dalak incelemeleri, kolçisin uygulanmış hayvanlarda, dalağın küçülerek dumura uğradığı ve buna bağlı olarak fonksiyonunu yapamaz hale geldiğini düşündürmektedir. Dalağın eritrosit yıkıcı bir organ olduğu belirtilmektedir (Kayaalp, 1984; Paker, 1990; Akay, 1996). Bu durumda kolçisinin etkisiyle, fonksiyonunu yitiren dalağa sahip pozitif kontrol grubu hayvanların periferik kanlarındaki 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, kolçisin uygulanmış grupların kemik iliğine oranla normoblastların sayıca en fazla T3,

kolçisin grubuna yakın olarak da T5 uygulanmış deney grubunda buldukları görülmüştür. Bu bulgular T3 ve T5'in normoblastlar üzerine kolçisine benzer bir etki gösterdiğini düşündürmüştür. T3 ve T5 uygulanmış grupların kemik iliği normoblastlarında daha bazofilik boyanma özelliği tespit edilmiştir. Ayrıca normoblastlarda görülen biçimsel bozukluklar bu maddelerin kolçisine yakın etkilerde olduğunun bir kanıtı olarak gösterilebilir. Yaptığımız bu tartışmalar T3 ve T5 maddelerinin etkili olduğunu ortaya koyar niteliktedir.

Yapılan çalışmalar, kolçisin gibi antimitotik etkili maddelerin kimyasal yapılarında, metil (-CH₃) grubunun sayıca artmasının, maddenin mitoz durdurucu etkisini arttırdığını göstermiştir (Iwasaki, 1993). Çalışmamızda test edilen ve mitozu engelleyici maddelerden biri olan T5 kodlu maddenin kimyasal yapısına bakıldığında, iki adet metil grubunun olduğu görülür. Bu durumda T5'in antimitotik etkisinin, yapısındaki metil gruplarından kaynaklanabileceği söylenebilir. Çalışmamızda ortaya çıkan etkili diğer bir antimitotik ajan olan T3 maddesinin kimyasal yapısında, beşgen ve altıgen olmak üzere dört adet kimyasal halka içerdiği görülür. Çalışmalarla antimitotik etkileri kanıtlanmış, örneğin *podofillotoksin* ve türevleri gibi maddelerin yapılarında da benzer halkaların çokluğu ortaya konmuştur (Iwasaki, 1993; Peyrot vd., 1992). Bu durumda mitotik inhibitörlerin kimyasal yapılarındaki bu halkaların sayıca fazla olması, etkilerini arttıracakı düşüncesini doğurur.

Test edilen maddelerin kimyasal yapılarında, birbirine komşu olmayan iki kükürt elementinin (S) yer aldığı ve bir beşgen halkasının varlığı ortak bir özellik olarak dikkati çekmektedir. 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 (Williams vd., 1985; Bryce, 1995). Ancak literatür taramalarımızda, aynı ya da benzer yapıya sahip hiç bir antimitotik kimyasal madde yapısına rastlanılmamıştır.

Bulgularımıza göre test maddelerinin antimitotik oldukları ve kanser hücreleri üzerinde de bu etkiyi gösterebilecekleri düşünülmektedir. Ancak farklı tümör hücreleri üzerine in vitro çalışmalar ile bu düşüncemiz desteklenmeli ve çalışmamızda olduğu gibi in vivo uygulamalar ile test edilmelidir.

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.

5. KAYNAKÇA

- Akay, T.M. (1996). Genel Histoloji. Üçüncü baskı, İmaj Yayınevi, Ankara, s. 42-108.
- Abel, E.A. (2000). Immunosuppressant and Cytotoxic Drugs: Unapproved Uses or Indications. *Clinics in Dermatology* 18, 95-101.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. ve Watson, J.D. (1989). *Molecular Biology of the Cell*. Second Edition, Garland Publishing, New York, USA.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. ve Watson, J.D. (1994). *Molecular Biology of the Cell*. Third Edition, Garland Publishing, New York, USA.
- Amer, S.M. ve Aboulela, E.I. (1985). Cytogenetic Effects of Pesticides III. Induction of Micronuclei in Mouse Bone Marrow by The Insecticides Cypemethrin and Rotetone. *Mutation Research* 155, 135-142.
- Ashby, I., Vogel, E.W., Tinwell, H., Callander, R.D. ve Shuker, D.E.G. (1993). Mutagenicity to Salmonella, Drosophila and the Mouse Bone Marrow of the Human Antineoplastic Agent Fotemustine: Prediction of Carcinogenic Potency. *Mutation Research* 286, 101-109.
- Banchroft, J.D. ve Stevens, A. (1977). *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Living Stone, Newyork.
- Berkarda, B. ve Eyüboğlu, H. (1983). *Hematoloji Laboratuvar Yöntemleri*. Ar Basım-Yayım ve Dağıtım A. Ş., İstanbul, s. 53-79.
- Bills, N.D., Koury, M.J., Clifford, A.J. ve Dessypris, E.N. (1992). Ineffective Hematopoiesis in Folate-Deficient Mice. *Blood* 9(79), 2273-2280.
- Bowman, W.C. ve Rand, M.J. (1980). *Text Book of Pharmacology*. Second Edition, Blackwell Scientific Publications, London.
- Bryce, M.R. (1995). Carrent Trends in Tetrahiäfulvalene Chemistry: To Wards Increased Dimensionality. *J. Mater. Chem.* 5(10), 1481-1496.
- Cande, W.Z. (1986). Reactivation of Mitosis i vitro. *TIBS* 11, 447-449.
- Cireli, E. (1993). *Genel Histoloji, Hücre ve Dokular*. 2. Baskı, Murat Ofset Karşıyaka, İzmir.
- Clark, G. (1981). *Staining Procedures*. Fourth edition, Williams&Wilkins, U.S.A., p. 304.

- Coley H.M. (1997). N-(Hydroxymethyl) Melamines. *Gen. Pharmac.* Vol. 28, No. 2, 177-182.
- Correia, J.J. (1991). Effects of Antimitotic Agents on Tubulin- Nucleotide Interactions. *Pharmac. Ther.* 52, 127-147.
- Cozon, G., Cannella, D., Langevin, A.P., Jeannin, M., Trublereau, P., Ecochard, R. ve Revillard, J.P. (1991). Transient Secretory IgA Deficiency in Mice After Cyclophosphamide Treatment. *Clinical Immunology and Immunopathology* 61(1), 93-102.
- Darroudi, F. ve Natarajan, A.T. (1994). Induction of Sister Chromatid Exchanges Micronuclei and Gene Mutations by Indirectly Acting Promutagens Using Human Hepatoma Cells as an Activation System, *Acta* 22, 445-453.
- Demirsoy, A. (1991). *Yaşamın Temel Kuralları, Genel Biyoloji-Genel Zooloji*. Cilt 1, Bölüm 1, Hacettepe Üni. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Ankara, s.146-153
- Diez, J.C., Avila, J., Nieto, J.M. ve Andreu, J.M. (1987). Reversible Inhibition of Microtubules and Cell Growth by the Bicyclic Colchicine Analogue MTC. *Cell Motility and The Cytoskeleton* 7, 178-186.
- Erbengi, T. (1987). *Histoloji 1. 2. Baskı*, Beta Yayın Dağıtım, İstanbul, s. 27-33.
- Faroogi, Z., Törnquist, M., Ehrenberg, L., ve Natarajan, A. T. (1993). Genotoxic Effects of Ethylene Oxide and Propylene Oxide in Mouse Bone Marrow Cells. *Mutation Research* 288(2), 223-228.
- Gridley, M.F. (1954). (Çeviren: Aker, O.N.), *Laboratuvar El Kitabı- Hususi Boyama Teknikleri*. Gülhane As. Tıp Akademisi Patoloji Anatomi Enstitüsü Yayını, Ankara, s. 28.
- Hanauske, A.R., Depenbrock, H., Shirvani, D. ve Rastetter, J. (1994). Effects of the Microtubule-Disturbing Agents Docetaxel, Vinblastine and Vincristine on Epidermal Growth Factor-Receptor Binding of Human Breast Cancer Cell Line in vitro. *Eur. Journal of Cancer*, 11(30), 1688-1694.
- Hayashi et al. (1994). In vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay. *Mutation Res.* 312, 293-304.
- Hayhoe, F.G.J. ve Flemans, R.J. (1982). *A Colour Atlas of Haematological Cytology*. Wolfe Medical Publications Ltd., Netherlands.
- Henderson, L., Fedyk, J., Windebank, S. ve Smith, M. (1993). Induction of Micronuclei in Rat Bone Marrow and Peripheral Blood Following Acute and Subchronic Administration of Azathioprine. *Mutation Research.* 291, 79-85.
- Ifeld, D.N., Mazar, A., Garty, M., Fink, G., Spitzer, S., Pecht, M., Netzer, L., Trainin, N. ve Kuperman, O. (1986). Effect of Oral Colchicine on T Cell Subsets, Monocytes and Concanavalin A-Induced Suppressor Cell Function in Asthmatic Patients. *Clinical Allergy.* 16, 407-416.
- Iwasaki, S. (1993). Antimitotic Agents: Chemistry and Recognition of Tubulin *Molecule. Medicinal Research Reviews* 23(2), 183-198.
- Jordan, M.A., Thrower, D. ve Wilson, L. (1992). Effects of Vinblastine, Podophyllotoxin and Nocodazole on Mitotic Spindles. *Journal of Cell Science* 102, 401-416.
- Kayaalp, O. (1989). *Tıbbi Farmakoloji*. 1. Cilt, 5. Baskı, Ankara.
- Kayalı, H. (1984). *Özel Histoloji*. Taş Matbaası, İstanbul.
- Kumar, M. ve Robbins, S. (1990). (çeviren: Uluoğlu, Ö.), *Basic Pathology*. 4. Baskı, Güneş Kitabevi, W.B. Sounder Company.
- Lee, L.F., Maly, C.S., Lofquist, A.K., Hoafte-nday, C., J.P.Y., White, C.M., Martin, B.K. ve Haskill, J.S. (1996). Taxol- Dependent Transcriptional Activation of IL-8 Expression in A Subset of Human Ovarian Cancer. *Cancer Research* 56,1303-1308.
- Leung, K.P., Russell, S.W., Le Blanc, P.A., ve Caballero, S. (1985). Heterogeneity Among Macrophages Cultured from Mouse Bone Marrow. *Cell Tissue Research.* 239(3), 693-701.
- Levasseur, M.P. ve Brown, D.L. (1987). Vimentin Dynamics During the Mitogenic Stimulation of Mouse Splenic Lymphocytes. *Cell Motility and The Cytoskeleton* 8(3), 227-237.
- Makowski, L. (1995). Taxol Found on Tubulin. *Nature* 375, 361-362.
- Manfredi, J.J. ve Horwitz, S. (1984). Taxol: An Antimitotic Agent With Any Mechanism of Action. *Pharmac. Ther.* 25, 83-125.
- Onur, M.A. (1991). *Fizyoloji Laboratuvar Kılavuzu*. Hacettepe Üni. Fen Fakültesi Basımevi., Ankara, s.19-24.
- Orhan, M. (1988). *Benzenin Farelerde Yapmış Olduğu Hemapatolojik ve Histopatolojik Bulgular*. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üni., Fen Bil. Enstitüsü, Eskişehir, s.37.

- Ozban, N. (1998). *Hücre, Sitoloji Ders Kitabı*. 2. Baskı, Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, s. 236.
- Paci, A., Rieutord, A., Brion, F. ve Prognon, P. (2001). Separation methods for alkylating anti-neoplastic compounds. *Journal of Chromatography B* 764, 255–287.
- Paker, Ş. (1990). *Histoloji*. Uludağ Üni. Basımevi 32. Yayın, Bursa, s. 52-53.
- Peyrot, V., Leynadier, D., Sarazin, M. ve Briand, C. (1992). Mechanism of Binding of the New Antimitotic Drug MDL 27048 to the Colchicine Site of Tubulin; Equilibrium Studies. *Biochemistry* 31, 11125-11132.
- Prophet, E.B. (1992). *Laboratory Methods in Histotechnology*. American Registry of Pathology, Washington, D.C., p. 13, 68.
- Ravid, M., Chen, B., Bernhcim, J., ve Kedar, I. (1985). Ascorbic acid-Induced Regression of Amyloidosis in Experimental Animals. *Br. J. exp. Path.* 66, 137-141.
- Rooney, D. E. ve Czepulkowski, B. H. (1992). *Human Cytogenetics*. Oxford Uni. Press, New York.
- Sarkar, D., Sharma, A., ve Talukder, G. (1993). Differential Protection of Chlorophyllin Against Clastogenic Effects of Chlordane in Mouse Bone Marrow in vivo. *Mutation Research* 301(1), 33-38.
- Sobti, R.C., Bharwaj, D.K., ve Gupta, B.D. (1991). Spontaneous Chromosomal Aberrations in the Peripheral Blood Lymphocytes of Patients With Cancer. *Med. Sci. Res.* 19, 23-25.
- Tamer, A.Ü., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalioğlu, M. ve Oğultekin, R. (1989). *Mikrobiyoloji Laboratuvar Kılavuzu*. Anadolu Üni., Eskişehir, s. 46-47.
- Teerenhovi, L., Wasenius, V.M., Franssila, K., Keinanen, M. ve Kuunitila, S. (1985). 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.
- Voegelien, F.G., Guenard, D., Levelle, F., Goff, M.T.L., Mangatal, L. ve Potier, P. (1991). Relationships Between the Structure of Taxol Analogues and Their Antimitotic Activity. *J. Med. Chem.* 34, 992-998.
- Williams, J.M., Beno, M.A., Wang, H.H., Leung, P.C.W., Emge, T.J., Geiser, U. ve Carlson,

K.D. (1985). Organic Superconductors: Structural Aspects and Design of New Materials. *Aml.. Chem. Res.* 18, 261-267.

Wozniak, K., Czechowska, A. ve Blasiak, J. (2004). Cisplatin-evoked DNA fragmentation in normal and cancer cells and its modulation by free radical scavengers and the tyrosine kinase inhibitor STI571. *Chemico-Biological Interactions* 147, 309



Mustafa Uyanoglu, 1973 yılında Eskişehir’de doğdu. 1995 yılında Anadolu Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 1997 yılında Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Bilim Dalında yüksek lisansını tamamladı. 2006 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Bilim Dalından doktorasını aldı. Çalışma alanı sitoloji ve histolojidir.



Melih Zeytinoglu, 1954 yılında Eskişehir’de doğdu. 1981 yılında Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümünden Biyolog olarak mezun oldu. Anadolu Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji - Embriyoloji Anabilim Dalından 1986 yılında Tıp Uzmanlığını aldı. 1992 yılında İngiltere, Norwich East Anglia Üniversitesi, Cell Biology’de doktorasını tamamladı. 1988 yılından bu yana Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümünde çalışmaktadır. Özel araştırma ve çalışma alanları Kanser ve hücre iskeleti moleküler biyolojisi ve hücre kültürü ile fluoresans mikroskopisidir.