

Gebelik Döneminde Des (Diethylstilbestrol) Verilen Fareler ve Yavrularında, Ada (Adenozin Deaminaz) Enzim Aktivitesi ile Kromozomal Değişimler ve Msp I Enzimi ile Bant Alanlarının Saptanması*

*Ada (Adenosine deaminase) Enzyme Activity and Chromosome Alteration and Determination of the Banding Areas by Msp I Enzyme in Pregnant Mice who Receives des (Diethylstilbestrol) and their Offspring**

Yrd. Doç. Dr. İsmihan Göze¹ Prof. Dr. Ahmet Çolak²

Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas

¹ Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu

² Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Özet: Bu araştırmada farelere gebeliğin 14. gününden başlayarak 5 gün süre ile günlük 6 µg dozunda (6µg x5) mısır yağında çözündürülen DES (Diethylstilbestrol) oral yolla verildi. İlaçla doğrudan etkileşen küme ve bunların dişi yavrularından kemik iliği alınıp kromozomal aberasyonlar incelendi. Msp I enzimi ile verdikleri bant alanları saptandı. Ayrıca karaciğer homojenatında ADA (Adenozin deaminaz) aktiviteleri izlendi. Doğrudan ilaçla etkileştirilen anne farelerde hipodiploidi, hiperdiploidi ve toplam sayısal anomalilerde artış (p<0,05), telomerde birleşme, sentromerden birleşme ve toplam yapısal anomalilerde artış (p<0,05) izlendi. Ayrıca bu grupta mikroçekirdek ile anafaz köprüsü bulguları dikkat çekti. Bu farelerin dişi yavrularında ise bu anomalilerde anlamlı artış gözlenmedi. Msp I enzimi fikse kromozomlara uygulandığında dişi fareler ve yavrularında ve kontrollerde, G bant benzeri yapılar oluşturdu. ADA aktivitesi ise doğrudan ilaçla etkileşen farelerde anlamlı

Summary: In this research study, diethylstilbestrol (DES) dissolved in corn oil was applied orally to mice in daily dosages of 6µg (5x6 µg) for five days beginning on 14. the day of pregnancy. Bone marrow was obtained from the group directly affected by drug and the female offsprings their chromosomes were examined and banding regions of the chromosomes were determined by Msp I enzyme. In addition the adenosine deaminase (ADA) activity was measured from liver homogenate. Hyperdiploidy and hypodiploidy were observed in chromosomes of mice subjected to DES directly and significant increase in total numerical anomalies, telomere association, centromere association and total structural anomalies were noted. Also anaphase bridge and micronucleus findings of DES applied group were calling attention. Fewer anomalies were encountered in the female offsprings of these mice. Msp I RE (restriction endonuclease) was applied on the chromosomes of mother mice and their offsprings and control groups

artışa ($p<0,05$) neden olurken, yavrularında bu etkiyi göstermedi.

Anahtar Sözcükler: Diethylstilbestrol, adenozin deaminaz, kromozom aberasyonu, Msp I RE, I. II. Jenerasyon fare.

* Araştırma, 1. yazarın doktora tezine ek olarak yapılan enzim çalışmasını da içermektedir.

DES, nonsteroid yapılı sentetik östrojendir. Doğal ve sentetik östrojenlere oranla metabolizmaları ayrı ve yavaştır. Bir kez uygulanmasından haftalar sonra bile organizmada varlığı saptanabilir (1,2). Klinik ve hayvancılık alanında kullanımı yaygındır. İlk sentezlendiği 1950'li yıllardan beri, gebe kadınlarda düşüğü önlemek amacı ile kullanılmıştır (3). Fetal dönemde DES ile etkilenen kız çocuklarda, puberte sonrasında normal popülasyonda seyrek görülen vaginal adenokarsinom olgularında artış izlenmiştir (4). Bu durum adenokarsinom ile DES kullanımı arasında bir paralellik olabileceği biçiminde yorumlanmış ve bu ilacın kullanımı sınırlandırılmıştır (1, 4-6). Ayrıca fetal dönemde DES ile etkilenen erkek çocuklarda jinekomasti ve azospermi bildirilmiştir (6, 7). Ayrıca DES'in anabolizan olarak kullanımı da yaygındır. Karsinojenik etkilerinin belirlenmesi ile kullanımı bir çok ülkede yasaklanmış ya da sınırlandırılmıştır. Etlerdeki kalıntı düzeyleri özellikle izlenmektedir (2, 5, 6). Ülkemizde ithal edilen hayvanlarda anabolizanların kalıntı düzeyi incelenirken, yerli üretimde bu kontrolün yapıldığına ilişkin bulgu yoktur (1). 1734 sayılı Yem Yönetmeliğine göre, yemlerde anabolizan kullanımı yasak olmasına karşın, yapılan bir araştırmada, yemlerde DES varlığı saptanmıştır (6).

DNA nükleotid yapı taşlarını oluşturan, dört azotlu bazdan sitozine metil kökünün bağlanması, gelişen hücrelerde genetik açma, kapama olayını sağlar. Metil kökünün varlığı ya da yokluğu sinyal gibi düzenleyici proteinleri etkiler. Başlangıçta metilli olan bölgeler hipometile olursa sessiz genlerin aktivite kazandığı gözlenir (9). Bu durum genetik şifrenin ayrılaşması ve yanlış kodlamalara neden olur (9). DNA üzerindeki metil köklerinin dağılımı kimi Restriction endonuclease (RE) enzimleri ile belirlenir ve DNA haritalanması ile biyoteknoloji alanında yaygın olarak kullanılır (9-11). RE'ler üç ana başlıkta incelenir; Tip I ve III tepkimede ATP kullanırken, Tip II ATP kullanmaz. Msp I RE Tip II enzimlerinden (12).

used as experimental material. It has been observed a G bant-like structure had formed. Although activity of ADA affects mice exposed to drug directly and this is confirmed by statistical analyses ($p<0,05$), no such effects were observed in offsprings.

Key Words: Diethylstilbestrol, adenosine deaminase, chromosome aberation, Msp I RE, I. II. generation mice.

ADA purin nükleotid yıkımında adenozinin inozine çevrilmesinde etken olan bir enzimdir. Yalnız adenezine özgü olmayıp 2-deoksiadenozinin deoksiinozine deamine edilmesini de sağlar (13, 14). Bu enzimin eksikliği durumunda, ağır immun yetmezlik bulgusu gösteren adenozin deaminaz yetersizliği ortaya çıkar.

Besin zinciri ile ya da ilaç olarak organizmayı etkileyen DES'in kanserojen etkileri yanısıra, kromozomal anomaliler oluşturabildiği gösterilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda kontrol grubuna karşı, ilaç verilen farelerin yavrularında ve kendilerinde olası kromozomal anomalileri, Msp I RE ile de metillenen bölgelerin vercekleri bantların ayırımı izlemek amaçlanmıştır. Ayrıca, DNA sentezinde yıkıma bağlı aktivite ayırımı oluşabileceği düşünülerek ADA aktivitesi de çalışılmıştır.

Gereç ve Yöntem

Araştırma iki bölüm olarak planlanmıştır. I. bölümde kromozom incelemeleri ve Msp I RE ile verilen bant alanları saptanmış, II. bölümde ise karaciğer homojenatında ADA aktivitesi spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

I. Araştırma kümesine 16, kontrol kümesine 8 adet gebe fare (8 haftalık, 25-30 gr ağırlığında Mus musculus var. albino) alındı. Gebeliğin 14. gününden sonra günlük 6 µg dozunda mısır yağında çözölen DES oral gavaj ile çalışma kümesine uygulandı. Kontrol kümesine ise aynı yolla yalnız mısır yağı verildi. Gebelik sonunda yavrular süttten kesilinceye dek anne ile birlikte tutuldu. Bazı yavruların ölmesi ile 54 denek, 28 kontrol olmak üzere dişi yavrular çalışma kümesine alındı. Seksüel olgunluğa erişmesi beklenen yavrular 21 gün sonra servikal dislokasyon ile öldürüldü. Aynı biçimde, anne fareler de öldürüldü ve her iki kümeden de kemik iliği alınarak, kromozom çalışması yapıldı. İstatistiksel değerlendirme için "t" testi kullanıldı.

Kromozom araştırması için farelere intraperitoneal olarak kolşisin injekte edildi. İki saat sonra servikal dislokasyonla öldürüldü ve femur kemikleri çıkarıldı. Kemik temizlendikten sonra proksimal ucu kesilip 0,5 ml fetal dana serumu içeren enjektöre çekildi. Bu karışım 100rpm de 10 dk. santrifüj edildi. Supernatan atılıp pelet üzerine 7ml hipotonik (0,075 M KCl) çözelti eklenip 37 C etüvde 25 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 1000rpm de 10 dk. santrifüj edildi. Pelet üzerine Carnoy fiksatif (glisial asetik asit/metanol 1/3) eklenip santrifüj edildi. Pelet fiksatifle iki kez daha aynı işlem uygulandı. Son kalan pelet temizlenmiş lamlara yayıldı. Lamlar bir gece oda sıcaklığında bekletildi. 0,1M fosfat tamponu ile hazırlanan %3 giemsa ile boyandı. Her kümeden iki adet preparat G bant ile bantlanarak değerlendirildi.

Standart işlemden sonra, elde edilen kromozom preparatlarından her küme için iki adet olacak biçimde MspI RE ile bantlanması yapıldı. Her biri için 40 l enzim kullanıldı. MspI enzimi tamponu ile (l'de 0,5 ui enzim bulunacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan preparat nem sağlayan kağıt diskler bulunan petri kutularına yerleştirildi ve 37 C etüvlere kondu. 2-3 saatlik sürelerle bant kalitesi denendi % 4 giemsa ile boyandı.

II. ADA aktivitesini saptamak için yapılan deneyde ise 6 denek, 4 kontrol gebe fare kullanıldı. Bunlara da oral gavaj yolu ile mısır yağında çözülmüş DES günlük 5 ug dozunda, gebeliğin 14. gününden itibaren uygulandı. Kontrol grubuna ise yalnız mısır yağı verildi. Gebelik sonunda deney için 18, kontrol için 12 yavru fare elde edildi. Yavruların süten kesilmesinden sonra, 21 günde seksüel olgunluğa erişmesi beklendi. Bu süreler sonunda, anne ve yavru fareler servikal dislokasyonla öldürülüp, karaciğerleri çıkarıldı. 0,15 KCl ile yıkandı, kaba terazide tartılıp 1 gr lik parçalar özütlemeye kullanıldı. 1:3 g/ml oranında 0,15 KCl ekleyip 1400 devir/dakika'da teflon cam özütleyicide (B. Braun) üç vuruşta ezildi. Homojenat JA 21 rotor ile 0 C'de vakumlu olarak 4800 g

15 dakika santrifüj edildi (Soğutmalı, vakumlu- Beckman model J 2 santrifüj). Elde edilen supernatanda ADA aktivitesi saptandı (15). Özgül aktivite Shimadzu UV-1201, UV-Vis spektrofotometre ve bağlı çalışan Nüve BM 101 ataşmanı ile belirlendi. Optik dansite 265 nm de ADA aktivitesi ölçülüp U/mg olarak değerlendirildi. Kromozom aberasyonları için istatistiksel değerlendirmeler; kontrol ve denek kümesi her fare için 100 metafaz sayılarak kromozom aberasyonları incelendi. Elde edilen veriler "iki yüzde arasındaki ayırımın önemlilik testi ile değerlendirildi. ADA aktivitesi için istatistiksel değerlendirmelerde "Mann-Whitney U" testi kullanıldı (16).

Bulgular

DES ile doğrudan etkilenen anne fareler, kontrol kümesi ile yapısal ve sayısal anomali yönünden karşılaştırıldı. Hipodiploidi, hiperdiploidi ve toplam anöploidi yönünde kümeler arası ayırımın anlamlı ($p<0,05$) olduğu görüldü (Tablo I). Ayrıca kontrollerde hiç rastlanmamasına karşın poliploidi gösteren metafaz alanları yaygın olarak belirlendi (Resim 1). Aynı kümede yapısal anomali sıklığı izlendi. Telomerden birleşme, sentromerden birleşme ve toplam anomalide anlamlı fark bulundu ($p<0,05$) (Tablo II). Bu kümede ayrıca anafaz köprüsü ve mikroçekirdek bulguları dikkati çekti (Resim 2, 3).

Fetal dönemde DES ile etkilenen yavru farelerde ise yalnız toplam yapısal ve sayısal anomaliler kontrole karşı anlamlı olarak saptandı ($p<0,05$) (Tablo III, IV).

Msp I enzimi ile etkileştirilen kromozomlar hem kontrolde hem de deneklerde her iki kümede de G bant benzeri yapı oluşturdu (Resim 4). Bant alanlarında değişim gözlenmedi.

ADA aktivite değerleri ölçümünde ise kontrol ve denek anneler arasında anlamlı değişim izlenirken ($U= 16$, $p<0,05$) kontrol ve denek yavrular arasında bu değer önemsiz bulundu (Tablo V).

Tablo I. DES verilen farelerde sayısal kromozom anomalileri.

	Sayılan metafaz	Hipodiploit n=39	Hiperdiploit n=41>	Poliploidi	Normal n=40	Toplam Anöpl.
Kontrol anne n=8	100	2(%2)	-	-	98(%98)	2(%2)
Denek Anne n=16	100	4(%4)	-	4(%4)	92(%92)	8(%8)
Sonuç	-	t=2,11 p<0,05*	-	t=2,11 p<0,05*	-	t=2,29 p<0,05*

Tablo II. DES verilen farelerde yapısal kromozom anomalileri.

	Sayı meta	Disent Krom.	Ring Krom.	Gap yapı	Telomer birleş	Sentrik füzyon	Frag. krom	Fragil krom	Toplam Anomali
Kontrol n=8	100	--	4	--	2	2	--	--	8
Denek n=16	100	2	6	1	6	7	2	2	26
Sonuç	-	t=1,53 p>0,05	t=0,66 p>0,05	t=1,02 p>0,05	t=2,0 p<0,05*	t=2,5 p<0,05*	t=1,53 p>0,05	t=1,53 p>0,05	t=3,46 p<0,05*

Tablo III. Denek dişi yavrularda sayısal kromozom anomalileri.

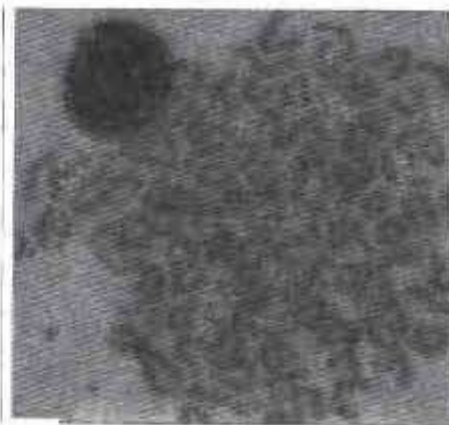
	Sayılan. Metaf	Hipodiploidi			Normal n=40	Toplam Anöp	
		n=39<	n=41	n=42			n=43
Kontrol n=28	100	3(%3)	--	2(%2)	--	95(%95)	5(%5)
Denek n=54	100	7(%7)	2(%2)	--	2(%2)	89(%89)	11(%11)
Sonuç	-	t=1,33 p>0,05	t=1,53 p>0,05	t=1,53 p>0,05	t=1,53 p>0,05	--	t=2,00 p<0,05*

Tablo IV. Denek dişi yavrularda sayısal kromozom anomalileri.

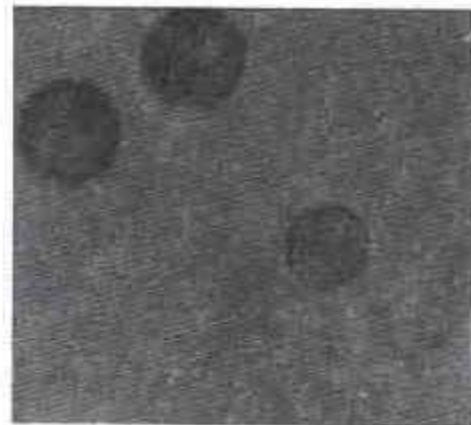
	Sayı Metasf.	Disent Krom.	Ring Krom.	Gap Yapı.	Telomer Birleş	Sentrik Füzyon	Frag. Krom.	Fragil Krom.	Toplam Anomali
Kontrol n=28	100	--	2	--	1	3	--	--	6
Denek n=54	100	1	5	--	3	6	--	1	15
Sonuç	-	t=1,02 p>0,05	t=1,2 p>0,05	--	t=1,05 p>0,05	t=1,15 p<0,05	--	t=1,02 p>0,05	t=2,27 p<0,05*

Tablo V. ADA aktivitesinin (U/mg) kontrol ve deneklerde karşılaştırılması.
(Mus Musculus karaciğer homojenatından spektrofotometrik ölçüm).

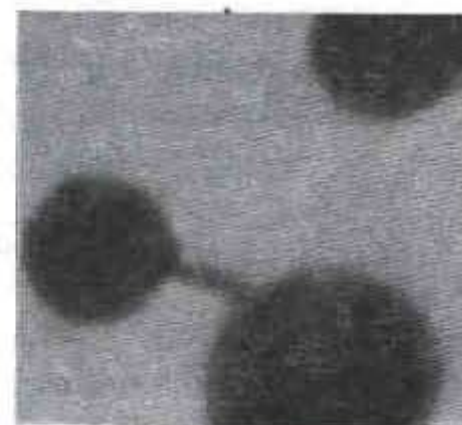
DES Denek ve kontrol (DES)	n	X+Sx	Sonuç
Kontrol, Anne	4	0,043+0,011	U=16,p<0,05*
Denek, Anne	6	0,021+0,0017	
Kontrol, Dişi Yavru	12	0,019+0,0017	U=14,p>0,05
Denek, Dişi Yavru	18	0,028+0,004	



Resim 1. Denek anne farede poliploid yapı gösteren metafaz alanı (2n>40) (x1000).



Resim 2. Denek anne farede mikroçekirdek örneği (x1000).



Resim 3. Denek anne farede anafaz köprüsü örneği (x1000).



Resim 4. Denek anne farenin Msp I RE ile etkileşimi sonucu G bant benzeri yapı ayrıca telomerden birleşme (x1000).

Tartışma

Kimyasal mutagenesis ve deneylerinden elde edilen sonuçlar pek çok mutajen ve karsinojenin aynı zamanda anöploidi indükleyicisi olduğunu bildirmektedir (9, 17). DES ile yapılan kimi araştırmalarda, kromozomlarda çeşitli bozukluklara neden olduğu bildirilmiştir (18, 19). Tümör gözlemlerinde yapılan bir araştırmada 11 ve 19. kromozomlarda trizomi saptanırken (20), insan ve Suriye hamsterlerinin fibroblastlarını karşılaştıran bir başka araştırmada tetraploidi ve heteroploidi artışı görülmüştür (21). Doza bağlı yapısal ve sayısal anomaliler de bildirilmiştir (17). Araştırmamız sonuçları bu veriler ile uyumluluk göstermektedir. DES'in anöploidi frekansında artışa neden olduğu, bunu da mitotik aygıtta incinme yaparak ortaya çıkardığı belirtilmiştir (20). Çalışmamızda, özellikle poliploidinin doğrudan ilaç alan kümede artışı mitotik aygıt incinmesine dolayısı ile mikrotübül topluluğunun bozulmasına bağlanabilir. Yapısal kromozom düzensizliklerinde de değişik sonuçlar bildirilmiştir. Örneğin, Ekmekci ring kromozom yapısında anlamlı artış izlenmiş (17) olmasına karşın, biz bu yapıda değişiklik gözleyemedik.

Çalışmamızda, telomer ve sentromerden birleşme ve toplam anöploidi yönünden anlamlı artış saptandı. DES verilen annelerin yavrularında ise tek, tek sayısal ve yapısal anomalilerde ayırım izlenmemesine karşın, ancak hem toplam sayısal hem de toplam yapısal yönden anlamlı artış belirledik. DES ile yapılan araştırmalar daha çok karsinojenik etkilerine yöneliktir. Deney hayvanları ile yapılan bir araştırmada farelerde vagina, serviks, uterus, ovaryum ve testiste, ratlarda hipofiz ve meme tümörleri izlenmiştir (22). DES verilmiş hayvanların etleri ile beslenen ratlarda ciddi üreme bozuklukları bildirilmiştir (1). Bir diğer araştırmada, gebelere DES verilmiş doğum sürelerinin uzadığı, kilo alımının azaldığı ve doğan yavrularda düşük doğum ağırlığı ve gelişim geriliği belirtilmiştir (23, 24). Araştırmamızda da benzer sonuçlara ulaşılmıştır. Eğer, gebelere DES gebeliğin 14. gününden önce uygulanırsa yavruların belirgin biçimde küçük olduğu ve gebelik sürelerinin kontrole göre en az iki gün daha uzun olduğu izlendi.

RE ile yapılan araştırmalarda Ava II, Alu I RE fikse kromozomlarda C bant yapısı, Eco RI, Bst NI, Msp I, Hpa II nin G bant yapısı oluşturduğu bildirilmiştir ve kimi ilaçlar ile bant yapılarında ayrımlaşma olabileceği belirtilmiştir (25, 26). DES ile yaptığımız bu çalışmada DES'in metilasyona etkili olabileceği ve metilli bölgelerin

MspI RE ile kontrollere göre ayrı bant alanları verebileceği düşünöldü. Ancak DES'le etkilenenlerde kontrollerin bant yapılarında her hangi bir değişiklik görölmüdi. Her iki kümede de G bant benzeri yapı izlendi. Metafaz alanlarını daha çok büyütme imkanı olmaması nedeni ile küçük değişimler izlenememiş olabilir. Mikroçekirdek oranında artış ise 3-3' DES ile yapılan bir çalışma sonuçları ile uyumludur. Bu araştırma sırasında kromozom ve kromatin hareketleri izlenmiş DES'in kinetokor hareketlerini bozup mikroçekirdek oluşumuna neden olabileceği bildirilmiştir (27). Araştırmamızı mikroçekirdek saptamak için gereken işlemlere göre kurmamıza karşın ilaçla doğrudan etkilenen kümede mikroçekirdek sayısında belirgin artış saptandı. Ayrıca, gene ilaçla doğrudan etkilenenlerde anafaz köprüsünün, her preparatta görölmüdi rastlantı olmadığı ve DES'in bu bölünme anomalisine neden olabileceği düşünöldü. Mikroçekirdek, anafaz köprüsü bulguları fetal dönemde DES'e maruz kalan yavrularda gözlenmedi. Ancak annelerde de, yavrularda da gen düzeyindeki ayrımlaşmalar izlenemedi.

ADA enziminin kalıtsal eksikliği nukleosit metabolizmasında değişimlere yol açar (28). 1, 2 ve 3 aylık sürelerle DES verilen farelerde yapılan bir araştırmada bir ay DES verilenlerin dışında 2 ve 3 aylık periyotlarda ADA aktivitesinde periyodik artış izlenmiştir (29). Araştırmamızda ise gebeliğinde ilaç uygulanan kümede ADA aktivitesinde kontrole göre anlamlı artış izlenirken, yavrularda önemli bir ayırım görölmüdi. Bu bilgilere göre DES'in, DNA yıkımına bağlı olarak ADA sentezi ve aktivitesini ayrımlaştırdığı söylenebilir.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre, DES ile gebelik döneminde etkilenen anne farelerde, kromozom anomalileri, mikroçekirdek ve anafaz köprüsü bulguları, ADA aktivitesinde anlamlı değişim saptanmıştır. Fetal dönemde DES alan yavrularda ise bu değişimler izlenmemiştir. Bu bulgulara karşın, mikroskopik yöntemlerle kromozomlarda her hangi bir anomali görölmüdi olması gen düzeyinde bir mutasyon olmadığı anlamına gelmez. Onkogenler, tümör süpressör genler ya da gözesel döngüde etken olan bir gende mutasyon olabilir. Söz konusu olan genlerdeki mutasyon ise, canlının sonraki dönemlerinde malignite gelişimine neden olabilir. Yapılan birçok araştırmada, DES'in birinci jenerasyonda değil, bunların yavrularında adenokarsinom ve anomali

görüldüğü yolunda bilgiler vermektedir (7, 19). Normal yaşamları boyunca tüm insanlar fetal dönemde karşılaştıkları DES gibi mutagen ve karsinojen maddelerle soldukları hava, içtikleri su ve yedikleri et ve et ürünleri yoluyla yaşamları boyunca da etkilenmektedir. Mutajenlerle etkileşim süresi uzadıkça, mutasyon riskinin de büyüdüğü, bilinen bir gerçektir. Araştırmamızda, genom düzeyinde inceleme yapılamamış olmasına karşın, DES'in metillenme bölgelerinde yapabileceği değişimleri izlemek için RE's ile gen düzeyinde araştırmaya gerek vardır.

Kaynaklar

- Şener S. Hayvansal ürünlerde kalıntı. TÜBİTAK Veteriner ve hayvancılık grubu özel ihtisas komisyonu raporu. Ankara, 1994.
- Bozkurt M. Hayvan ürünlerinde anabolik (hormon) rezütleri ve ulusal yasal düzenlemeler. T Hij Den Biyol Derg 1988; 45 (2); 260-87.
- Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Ankara: Ulucan Matbaası. 1990; 2662.
- Anonim. American survey ashort of hormon. Economist (January 29) 1988; 30.
- Ersoy E, Aghte O, Ergun ŞH, İresin T. Etlik piliçlerde DES yönünden ön çalışmalar. Al Vet Fak Derg 1988; 36(2-3): 1-20.
- IARC monograph on the carcinogenic risk of chemical to humans: Sex hormon (II) 1979; 21
- Worstman J, Hamidina A, Winters S.S. Hypogonadizm long-term treatment with DES. Am J Med Sci 1989; 297 (6): 365-68
- Ersoy E, Aghte O, Ergun H, Sel T, Güldür T. The determination of DES in the feaces and tissues of chicens treated with DES in the feaces and tissue sample of calves, lamps and chicens collected from various areas of Turkey. A Vet Fak Derg 1992; 35 (2-3): 215-231
- Cedar H. DNA methylation and gene activity. Cell 1988; 53: 3-4.
- Levin B. Genes 4. Oxford: Oxford Universty Press. 1990; 88.
- Torre J, Mitchell AR, Sumner AT. Restriction endonuclease/nick translation of fixed mouse chromosome. Chromosoma 1991; 100: 203-11.
- Arda M. Biyoteknoloji, Kükem Derneği Bilimsel Yayınları No:1, Ankara, 1990; 35.
- Newsholme EA, Leech AR. Biochemistry for the Medical Sciences. London: John Wiley and Sons. 1994; 315, 483.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principles of biochemistry. 2nd Ed, New York: Worth Pub. 1992; 516, 727.
- Boehringer, Manheim. Biochemia Information, West Germany, -Boehringer, Manheim GmbH. 1973; 24
- Sümbüloğlu K, Sümbüloğlu V. Biyoistatistik, Ankara: Özdemir Yayıncılık, 1993; 145-48.
- Ekmekci A, Menevşe S, Menevşe A. Fare kemik iliği hücrelerinde difenilhidantoinin indüklediği sayısal ve yapısal kromozom anomalileri ve bunların üzerine PGM I azaltıcı etkisi. TÜBİTAK Doğa (T J Med Sci) 1990; 14: 177-84.
- Sakakibara Y, Saito I, Ichinoseki K, Oda T, Kaneko M. Effect of DES and its methyl ethers on aneuploidy induction and microtubule distribution in Chine hamster V79 cells. Mutat Res 1991; 263: 269-76.
- Ozawara N, Oshimura M, Mc Lachan JA, Burret C. Non random karyotypic change immortal and tumorigenic Syrian hamster cells induced by DES. Cancer Genet Cytogen 1989; 38(2):271-82.
- De Sario, Vagnarelli P, De Carli L. Aneuploidy assay on DES by means of in situ hybridization of radioactive and biotinlated DNA probes on interphase nuclei, Mutat Res 1990; 243: 127-31
- Tsutsui T, Suzuki N, Maizumi H, Barrett JC. Aneuploidy induction in human fibroblasts: Comparison with results in Syrian hamster fibroblast. Mutat Res 1990; 240: 241-49.
- Marsellos M, Tomatis L. DES II. pharmacology, toxicology and carcinogenety in experimental animals, Eur J Cancer 1992; 29 A (1): 149-55.
- Zimmerman SA, Clevenger WR, Brimhall BB, Bradshaw WS. DES induced perinatal lethality in the rat II: perturbation of parturition. Biol of Reprod 1991; 44: 583-89 .
- Clevenger WR, Cornwall GA, Carter MW, Bradshaw WS. DES induced perinatal lethality in the rat. I. relationship to reduced maternal weight gain. Biol of Reprod 1991; 44: 575-82.
- Kaelbing M, Miller AD, Miller JO. Restriction enzyme banding of mouse metaphase chromosomes. Chromos 1984; 90: 128-32.
- Peretti D, Mezzatone R, Sumner AT. Unfixed and fixed human chromosomes so different staining patterns after restriction endonuclease digestion. Hered 1980; 92: 267-73.
- Vian L, Bichet N, Gouy D. The in viro micronucleus test on isolated human lymphocytes. Mutat Res 1993; 291 (1): 93-102.
- Nagae G, Miyamoto M, Miyamoto H. Effect of estrogen on liver plazma membrane in rats, Toxicol Sci 1992; 17(4): 185-95.
- Göze İ, Yelkovan I, Bakır S. Dietilstilbestrol'ün adenozin deaminaz aktivitesine etkisi. TÜBİTAK Doğa (Biyoloji), 20: 1996; 179-82.

Teşekkür

Bu araştırmada kullanılan DES ve MSP I maddelerin sağlanmasında yardımcı olan Federal Almanya Cumhuriyeti Heidelberg Üniversitesi Patoloji Enstitüsü'nden Herrn Prof. Dr. Med. R. WALDHERR'e çok teşekkür ederiz.

Danksagung

Wir danken Herrn Prof. Dr. med. R. WALDHERR, O.A., Pathologisches Institut der Univ. Heidelberg/BRD, für seine sehr kollegiale Hilfe, die Chemikalien, bei dieser Arbeit in Anspruch genommen wurden, uns gekriegt hat.