

**Məcnun BABAYEV, Məcid MƏCIDOV,  
İdris ƏSGƏROV, Əli ƏLİYEV**

**MUTAGENEZ  
MUTASIYANIN  
ANALİZ ÜSULLARI**

**(dərs vəsaiti)**

*Yenidən işlənmiş nəşr*

Azərbaycan Respublikası Təhsil  
Nazirliyinin 14.07.2011 tarixli, 1386  
saylı əmri ilə dərs vəsaiti kimi təsdiq  
edilmişdir

**Bakı – 2011**

**Redaktor:** **Quliyev Rauf Ələkbər oğlu**, k/t. e.d., professor

**Rəyçilər:** **Axundova, E.M.**, b.e.d., professor  
**Aminov N.X.** b.e.d., professor  
**Əkbərova G.H.**, b.e.n., dosent

**Babayev M.Ş., Məcidov M.M., Əsgərov İ.T., Əliyev Ə.Ə.**  
**Mutagenez, mutasiyanın analiz üsulları.** Dərs vəsaiti. Bakı,  
“Təhsil” NPM, 2011, 252 s.

Vəsaitdə kimyəvi mutagenezdə hüceyrə tərkibi, mutasiyanın tipləri və onların təsnifikasi haqqında məlumat verilir. Xromosomların ilkin zədələnmələrinin sxematik quruluşu və hüceyrə tsiklinin müxtəlif fazalarında bu zədələnmələrin baş verməsi, mitotik tsikl, gen mutasiyaları, bacı xromatid mübadiləsi, spontan mutagenezdə xromosom dəyişilmələrinin müasir prinsipləri və metodları izah olunur.

M 0033297 – 2011  
700122

## ÖN SÖZ

Hazırda təhsil sistemi qarşısında duran əsas məsələlərdən biri tələbələrə elmin əsas nəzəri biliklərini aşılamaqla yanaşı onlarda tədqiqatçılıq bacarığı və vərdişlərinin inkişaf etdirməsidir.

Bu mürəkkəb və çətin məsələnin həllinə yalnız nəzəri kursların əsas qanuna uyğunluqlarını bilməklə və bunlara əsaslanaraq, metodik üsullardan düzgün və yerində istifadə etməklə nail olmaq mümkündür.

Bu isə tələbələrin elmi və yaradıcılıq dünyagörüşünü artırmaqla, qarşıya qoyulan mürəkkəb məsələlərin sərbəst həll edilməsində onlara köməklik edə bilər.

Genetika bir çox bioloji fənlər kimi özünün yarandığı ilk gündən bu günə kimi təcrübi elmlərdən biri olaraq qalır. Odur ki, genetika sahəsində hər hansı bir tədqiqatçının müvəffəqiyyəti, hər şeydən əvvəl qarşıya qoyulan məsələnin həlli üçün tədqiqat üsulunun düzgün seçilməsindən və onun elmi surətdə yerinə yetirilməsindən asılıdır. Məhz bunun nəticəsidir ki, insanları çoxdan bəri maraqlandıran irsiyyət və dəyişkənlik, mutagenez və s. məsələlər haqqında elmi kəşflər edilməklə, seleksiya, tibb və genetik mühəndislik sahəsində də bir çox müvəffəqiyyətlər əldə edilmişdir. Bundan başqa praktikada müasir sitogenetik analiz üsullarından istifadə etməklə, ətraf mühit amillərinin mutagen təsiri, onların nəticələri, antimutagen maddələrin axtarılması və s. kimi məsələlər müvəffəqiyyətlə öyrənilir.

Bu gün genetik tədqiqatlarda istifadə olunan metodlar haqqında ümmüniləşdirilmiş, tam ətraflı məlumat demək olar ki, kifayət qədər deyildir. Buna görə də sitogenetik analizin bu və ya digər metodları ilə tanış olmaq istəyən universitet tələbələri və gənc mütəxəssislər bəzi çətinliklərlə

qarşılışmalı olurlar. Çətinliklərdən biri ondan ibarətdir ki, istifadə edilən bu metodlar haqqında yazılmış məlumatları müxtəlif ədəbiyyatlarda tapmaq olur. Odur ki, hazırda nə tələbələr, nə müəllimlər, nə də elmi işçilər onlara lazım olan məlumatları bir mənbədən ala bilmirlər. Digər çətinlik-lərdən biri də ondan ibarətdir ki, dərc olunmuş bəzi məqalələrdə istifadə olunmuş metodlarda obyektin, reaktivlərin seçilməsi, təcrübənin temperatur rejimi, iş mərhələlərinin ardıcılılığı və s. dağınıq halda verilir, bəzi hallarda isə bu haqda fikirlər «laborator folkloru» kimi bir tədqiqatçıdan digər tədqiqatçıya verilir.

Neticədə yuxarı kurs tələbələri və eləcə də gənc tədqiqatçılar genetika kursu üzrə yüksək nəzəri biliyə malik olsalar da, onlar bilavasitə təcrübi işlərin aparılmasında müəyyən çətinliklərlə rastlaşırlar.

Yuxarıda qeyd etdiyimiz çətinlikləri nəzərə alaraq biz bu məsələni imkan daxilində həll etməyə çalışmışıq. Odur ki, bu dərslikdə biz hazırda sitogenetik analizlərdə ən çox istifadə olunan metodları ümumiləşdirmişik. Dərs vəsaitinin yazılmasında BDU-nun Genetika və təkamül təlimi kafedrasında genetikadan keçirilən nəzəri kursun və təcrübi işlərin aparılması təcrübəsindən istifadə edilmişdir.

Dərs vəsaitində qarşıya qoyulan məsələlərin nəzəri hissəsi çox qısa və tam bütövlüyü ilə verilmişdir. Məsələn, genetik materialların paylanması və öz-özünü törətməsini ardıcıl mərhələlərində baş verən müasir molekulyar proseslər, eyni zamanda mutasiya və onun təsnifatı haqqında da məlumatlar verilmişdir. Bundan əlavə hüceyrə tsiklinin müxtəlif mərhələlərində DNT-nin (dizoksiribonuklein turşusu) zədələnməsi ilə əlaqədar olaraq baş verən proseslər əyani olaraq göstərilmişdir.

Lakin qarşıya qoyulan məqsədlə əlaqədar olaraq bir

çox məsələlərə burada ətraflı baxılmamışdır.

Bu haqda məlumatlarla tələbələr genetikanın nəzəri kursu üzrə oxunan mühazirələrdə tanış ola bilərlər. Mütəxəssisləri maraqlandıran məsələlər haqda ətraflı məlumat almaq üçün onlar ədəbiyyat siyahısında verilmiş müəlliflərin işləri ilə tanış ola bilərlər.

Dərs vəsaitində sitogenetik analiz üçün preparatların hazırlanmasının ümumi prinsipi və müxtəlif bioloji sistemlərdə genetik zədələnmələrin qeyd olunması metodları verilmişdir. Eyni zamanda klassik metodlarla yanaşı, son onilliklərdə biofizika, biokimya və molekulyar biologiya sahəsində əldə edilmiş müvəffəqiyyətlərə əsaslanaraq gen mutasiyasının, xromosom dəyişilmələrinin, bacı xromatid mübadiləsinin analizindən istifadə olunan müasir metodlar da verilmişdir. Həmin bölümənin əlavələrində isə nüvə strukturunun analizi metodlarında istifadə edilən fiksatorlar və rəngləyicilər verilmişdir.

Dərs vəsaiti universitetlərin və tibb universitetinin, tələbələri və müəllimləri üçün yazılmışdır. Dərs vəsaiti eyni zamanda tibb məktəbləri şagirdləri və biologiya sahəsində tədqiqat işləri aparan aspirant və mütəxəssislər üçün metodik göstərici kimi faydalı ola bilər.

Azərbaycan dilində ilk dəfə tərtib olunmuş bu dərs vəsaitində şübhəsiz ki, müəyyən nöqsan və qüsurlar olacaqdır. Buna görə də əvvəlcədən vəsait haqqında tənqid fikirlərini və məsləhətlərini göndərən oxuculara öz minnətdarlığımızı bildiririk. Çünkü bunlar bizim sonrakı işlərimizə öz müsbət təsirini göstərə bilər.

*Müəlliflərdən*

## GİRİŞ

Biologiya sahəsində XIX əsrin başlıca nailiyyətlərindən biri hüceyrənin kəşfi olmuşdur. T.Şvan, R.Virxov tərəfindən hüceyrə nəzəriyyəsi yaradılmışdır. Bundan biologiyanın müxtəlif sahələrində çalışan alımlərin birləşmə səyi nəticəsində hüceyrə nəzəriyyəsi inkişaf etdirilmiş və müəyyən edilmişdir ki, hüceyrə canlıların elementar strukturu və genetik vahidi kimi təkamülün uzun sürən prosesi nəticəsində inkişaf etmişdir.

Mövcud olan bütün canlı orqanizmlər hüceyrələrin quruluş xüsusiyyətlərinə görə iki böyük qrupa bölündür: prokariotlar və eukariotlar. Prokariotlara bakteriyalar və göy-yaşıl yosunlar daxildir. Eukariotlara isə yerdə qalan bütün ibtidailər və çox hüceyrəli orqanizmlər daxildir.

Bu iki müxtəlif quruluşa malik hüceyrələr arasında bəzi xüsusi fərqlərə – onların ixtisaslaşmalarına, sitoplazmatik orqanoidlərin mürəkkəb quruluşlarına və s. malik olmalarına baxmayaraq, onlar arasında ümumi quruluşlarına və funksiyalarına görə müəyyən oxşarlıq vardır. Prokariot və eukariot hüceyrələr arasındaki əsas fərqlərdən biri genetik aparatın quruluşu ilə əlaqədardır. Prokariotlarda formalasılmış nüvə yoxdur, genetik aparat plazmatik membranla əlaqədar olan bir molekul DNT-dən ibarətdir. Prokariotlardan fərqli olaraq eukariotlarda isə xüsusi quruluşa malik olan nüvə vardır. Nüvə, nüvə pərdəsi ilə sitoplazmadan ayrılmışdır. İrsiyyət materialları isə nüvədə xromosomlarda yerləşmişdir.

Hüceyrəvi quruluşa malik canlı orqanizmlərdə müəyyən funksiyaların yerinə yetirilməsindən və ixtisaslaşmasından asılı olaraq hüceyrələr somatik – bədən və generativ –

cinsiyət hüceyrələrə ayrılmışdır.

Bir sıra ixtisaslaşmış somatik hüceyrələr bəzi funksiyalarını itirdikləri halda generativ hüceyrələr isə əksinə, təkamülün uzun sürən prosesi nəticəsində təkmilləşmiş və ixtisalaşmışlar. Yuxarıda qeyd olunan tipik xüsusiyyətləri və bəzi funksiya-struktur fərqləri ilə yanaşı canlı orqanizmlərin hüceyrələrini ümumi bir qanuna uyğunluq birləşdirir ki, bu da onların çoxalmasıdır. Bu prosesin mərkəzi hadisəsi, hüceyrələrin bölünməsi nəticəsində başlangıç hüceyrədə olan irsiyyət materiallarının iki qız hüceyrə arasında bərabər paylanmasıdır. Bölünmə prosesinin molekulyar mexanizmi ilə eukariotların hüceyrə tsiklində tanış olacaqıq.

Hüceyrələrin bölünməsində özünü göstərən ümumi qanuna uyğunluqlardan biri irsiyyət materiallarının hər bir bioloji növ üçün nəsildən-nəslə sabit ötürülməsidir.

Lakin irsiyyət materialları heç də həmişə sabit olaraq nəsildən-nəslə ötürülmür. Bəzi hallarda onlar genlərdə xromosom miqdarında və strukturunda baş verən kənarlanmalar nəticəsində dəyişilə bilir. Təkamül nəticəsində irsiyyət materiallarının sabitliyini təmin edən mexanizmlərin yaranmasına baxmayaraq (xüsusən genetik kod, DNT molekulu strukturasının pozulmasının qarşısını alan reparasiya, hüceyrələrin regenerasiyası anti-oksidant sistemi və s.), müşahidə olunan normadan kənarlanmalar, hüceyrənin funksional sisteminin pozulması (spontan) fiziki, kimyəvi və bioloji amillərin təsiri nəticəsində baş verir.

Gen, xromosom və genom səviyyəsində baş verən mutasiya və yaxud modifikasiya dəyişkənləyi onların miqdərindən və keyfiyyətindən asılı olaraq hüceyrələrə letal təsir göstərərkən müxtəlif pataloji vəziyyətlərin yaranmasına səbəb olur.

Bütün canlı orqanizmlerin funksional xarakteristikasını təşkil edən irsiyyət və dəyişkənlilik, genetikanın predmetini təşkil etməklə böyük nəzəri və praktiki əhəmiyyətə malikdir. Müxtəlif səbəblərdən asılı olaraq orqanizmdə baş verən dəyişiklik irsiyyətli (mutasiya) və qeyri irsiyyətli (modifikasiya) ola bilər. Modifikasiya dəyişkənliliyi orqanizmin inkişafı və həyat fəaliyyəti dövründə xarici mühit amillərinin təsiri nəticəsində baş verir. Modifikasiya dəyişkənliliyi uğunlaşma xarakteri daşımaqla irsən nəslə ötürülmür, lakin, bunlara baxmayaraq, hər bir modifikasiya dəyişkənliliyi təkamül prosesində qazanılmış genetik nəzarət altında olur.

Cinsiyət və somatik hüceyrələrin bütün həyatı dövründə baş verən mutasiya dəyişkənliliyi – yeni və müxtəlif canlıların daima yaranması prosesində zəmin olmaqla, təkamülün əsasını təşkil edir və növ üçün faydalı əlamətlərin seçiləməsi sayəsində baş vermişdir. Heyvanların, bitkilərin seleksiya praktikasında qarşıya çıxan məsələlərin həllində və eləcə də ziyanverici həşəratlara qarşı mübarizədə genetik üsulların hazırlanmasında istiqamətləndirilmiş mutasiyanın böyük əhəmiyyəti vardır.

Müxtəlif genlərdən istifadə etməklə orqanizmin irsiyyətinin dəyişdirilməsində, bioloji aktiv maddələrin sintezində (xüsusən insulin, interferon və s.) gen mühəndisliyinin böyük əhəmiyyəti vardır. Heç şübhə yoxdur ki, aparılan tibbi genetik işlər irsiyyətli xəstəliklərin müalicəsində və müxtəlif keçici xəstəliklərə qarşı ştamların və virusların yaradılmasında xüsusi rol oynayır.

Təkamülün müəyyən dövrlərində mutasiya bir sıra hallarda neytral xarakter daşıyaraq nə genotipik, nə də fenotipik cəhətdən nəzərə çarpmır. Lakin çox hallarda mutasiya hüceyrələrin elminasiyasını və yaxud patoloji hadisələr

nəticəsində baş vermeklə özünü fizioloji, morfoloji və biokimyəvi səviyyədə göstərir. Deyilənlərdən aydın olur ki, eksperimental genetikanın qarşısında duran vəzifələr içərisində əsas yerlərdən birini faydalı mutasiyaları artırmaq və zərərli mutasiyaları isə minimum səviyyəyə endirmək durur.

Göstərilən məsələlərin həlli üçün müasir genetika müxtəlif elmlərlə əlaqədar olmaqla bir sıra tədqiqat metodlarına malikdir. Bu metodlara hibridoloji, ontogenetik genealoji, əkizlər, populyasiya, statistik, biokimyəvi, immunoloji və s. daxildir.

Yuxarıda qeyd olunan üsullardan əlavə spontan və induksiya mutasiyaların mexanizminin və sürətinin analizində istifadə edilən etibarlı üsullardan biri də sitogenetik üsuldur ki, müasir dövrdə ondan xromosom və gen mutasiyalarının analizində geniş istifadə edilir. Sitogenetik üsul, cinsiyət və somatik hüceyrələrdə spontan və induksiya mutasiyaların analizində praktiki olaraq eyni nəticəni verir. Bu onunla əlaqədardır ki, somatik və cinsiyət hüceyrələrində baş verən mutasiyaların mexanizmi bir-birinə oxşayır. Somatik hüceyrələrin analizində mitogenetik üsul bir sıra üstünlüklərə malikdir. Bunu qeyd etmək kifayətdir ki, bu üsuldan *in vitro* və *in vivo* – da aparılan təcrübələrdə geniş istifadə etmək olur. Əsas üstünlüklərdən bir də ondan ibarətdir ki, bu üsul üçün obyektin miqdarı məhdud deyil, üsul eyni zamanda çox sadə və iqtisadi cəhətdən əlverişlidir.

Buna görə də heç də təsadüfi deyil ki, müasir dövrdə həmin üsuldan ətraf mühit faktorlarının genetik təsirinin öyrənilməsində, xromosom xəstəliklərinin diaqnostikasında, tibbi-genetik məsləhətxanalarda, antimutagen maddələrin axtarılmasında, həmçinin nəzəri və tətbiqi genetikanın bir sıra məsələlərinin həllində geniş istifadə edilir.

## Fəsil 1

### MUTAGENEZ

#### 1.1. Bitkilərdə spontan mutagenez

Canlı orqanizmlərdə başlıca xüsusiyyatlardan biri dəyişkənliyə və mutasiyaya uğramaq qabiliyyətidir ki, bu da təkamül və üzvi aləm üçün qiymətli material verir. XX əsrin əvvəllərində Qudo de Friz tərəfindən irəli sürülmüş mutasiya nəzəriyyəsi canlı təbiətin böyük müxtəliflik formalarına malik olmasını izah etmişdir. Enetera Lamarkina bitkisində gözlənilmədən meydana çıxmış irsiyyətli dəyişkənliyi De Friz mutasiya adlandırmaqla onun sıçrayışla meydana çıxan irsiyyətli dəyişkənlik hesab etmişdir (1909). Buna oxşar dəyişkənliyi S. Korjinski də müşahidə etmiş və onları irsiyyətli variasiya adlandırmışdır (1899). De Frizin nəzəriyyəsi Darvinin təkamül nəzəriyyəsinə əsaslanmışdır, belə ki, yeni formalar təsadüfən meydana çıxır. Bu isə dəyişkənliyin faydalı, yaxud zərərli olmasından asılı olmayaraq onun orqanizm üçün heç bir əhəmiyyəti yoxdur.

Təbii mutasiyaya səbəb olan amillərdən genetik, fiziki, kimyəvi, biokimyəvi, fizioloji və başqalarını göstərmək olar.

Spontan mutasiya hər şeydən əvvəl xromosomların reduplikasiyası zamanı baş verən səhvlərin səbəbinə yaranabilər (Koltsov, 1936; Rapoport, 1948, Q. de Friz, 1964).

Müəyyən edilmiş hər hansı bir genin, başqa genlərin təsiri ilə mutasiyaya uğraması asılılığı qarğıdalı bitkisində Con Stadler tərəfindən əldə edilmişdir. O, müxtəlif genotipik şəraitlərdə R genini öyrənərək belə qərara gəlmişdir ki, bəzi populyasiyalarda bu gen qətiyyən mutasiyaya uğramır, eyni zamanda başqa populyasiyalarda onun mutasiyaya

uğrama tezliyi 0,2%, orta tezliyi zamanı isə 0, 05% təşkil etmişdir (Stadler, 1948).

Bundan başqa mutasiyalar, orqanizmin öz genetik təbiətinə səbəb olan spontan mutasiyalar hüceyrə tərəfindən sintez olunan müxtəlif amillərin yaxud ətraf mühitdə olan amillərin təsiri ilə baş verə bilər. Belə amillərə, məsələn: peroksidlər (əsasların analoqu) azot turşusu və başqaları misal ola bilər. Onlardan bəziləri replikasiya zamanı DNT-yə təsir edir, başqaları isə sakitlik vəziyyətində olan DNT-də dəyişkənlik əmələ gətirir. Əgər nuklein turşusu uzun müddət sakitlik vəziyyətindədirse, o zaman axırıncı amillər yüksək tezliyə malik mutasiya əmələ gətirə bilər.

1933-cü ildə Navaşın müşahidə etmişdir ki, Krepis kapillaris bitkisinin toxumlarının qocalması ilə müşayiət olunan fizioloji dəyişkənlik mutasiyanın əmələ gəlməsinə səbəb olur. Toxumların qocalması ilə əlaqədar olaraq mutasiyaya tutulma tempinin yüksəlməsi həmçinin Şkvarnikov tərəfindən 1937-ci ildə buğdada, Stubbe tərəfindən antirrinumda, Sarıçev tərəfindən 1967-ci ildə tütündə və s. bitkilərdə müəyyən edilmişdir.

Bitkilərdə, külli miqdarda mutagen maddələrin bolluğu uzun illər ərzində öz əksini tapmışdır. Belə ki, tütünün köhnə toxumlarından olan yağıla təzə toxumlara təsir etdiyində mutasiya əmələ gələ bilər (Dubinin, 1958). Xardal, yer findığı və s.-nin yağıının geniş mutagen təsiri məlumdur (1959, Swaminathan; Dubinin, Şerbakov, 1964). Bir çox aminlər, amidlər, amin turşuları, sidik cövhəri, piqmentlər və alkaloidlər də mutagen aktivliyə malikdir.

N.Dubinin tərəfindən 1958-ci ildə 15°C-dən yuxarı temperaturun mutasiya prosesinə təsiri göstərilmişdir. Şkvarnikov və Navaşın 1935-ci ildə göstərmişlər ki, temperatur

şokları da yüksək mutagen təsirə malikdir.

Spontan mutasiyaların əmələgəlmə prosesinə səbəb olan amillərdən biri də təbii radioaktiv fonun təsirinin nəticəsidir ki, bu da kosmik, yerin radasiyası və radioaktiv izotopların təsiri ilə baş verir. Kosmik şüaların mutagen təsiri müəyyən dərəcədə arpa bitkisində baş verdiyi göstərilmişdir (Eugster, Simons, 1959).

Bitkilərdə əksər mutasiyalar yetişməmiş toxumların səpilməsi nəticəsində meydana çıxır. Yetişməmiş toxumların səpilməsi nəticəsində mutasiyanın meydana çıxmazı qarğıdalı və payızlıq buğdada baş verdiyi (Knyazyuk, Puşkarev, 1967; Dyaçenko, 1961) qeyd edilmişdir.

Müasir dövrdə bitkilərdə mutasiya prosesinin yüksəlməsi stimulyatorlar, insektofunsidlərin və başqa zəhərli kimyəvi maddələrin işlədilməsi nəticəsində baş verdiyi ehtimal olunur (Gregg, Allan, 1965). Həmçinin qaramal peyininin və kompostun da mutagen təsiri əldə edilmişdir.

## 1.2. Bitkilərdə süni mutagenezin tarixi

Bitkilərdə eksperimental mutagezin tarixi 70 ildən bir az da artıq tarixə malikdir.

Qudo De Friz tərəfindən mutasiya nəzəriyyəsi formalasdıqdan və eksperimental yolla mutasiya əldə etməyin mümkünluğu fikri söyləniləndikdən sonra canlı orqanizmlərdə eksperimental yolla süni irsiyyətli dəyişkənlik əmələ gətirə bilən maddələrin intensiv axtarışlarına başlanmışdır. Bu nöqteyi-nəzərdən ilk tədqiqatçılar Kornike və Qaqueri göstərmək olar. Onlar bitkilərdə rentgen və radium şüalarının təsiri ilə mitozun pozulması hallarını müşahidə etmişlər [(1905, 1908), (Cager, Blaksler, 1927)]. T.Morqan (1911)

radium şüaları ilə drozofildə mutasiya baş verdiyini kəşf etmişdir; Baur və Vesterqard (1928) bitkilərdə kimyəvi amillərin təsiri ilə, Şiman (1912) ağır metalların, duzların təsiri ilə *Aspergillus higer*-də sünə mutasiya əldə etmiş; Pirovano bitkilərdə ultrabənövşəyi şüalarını (UBŞ), radium şüalarını tətbiq etməklə sünə mutasiya əldə etmiş (1922); Littl və Beq 1924-cü ildə siçanları rentgen şüaları ilə şüalandırmaqla mutasiya əldə etmişdir.

Bitkilərin seleksiyasında bu metod birinci növbədə Rusiya alimləri tərəfindən qiymətləndirilmişdir. 1928-ci ildə keçmiş SSRİ-də ionlaşdırıcı şüaların köməyi ilə təsərrüfatda sünə mutasiya yolu ilə qiymətli mutant formaların alınması işlərinə əvvəlcə dənli bitkilərdə, sonra isə başqa bitkilərdə başlanılmışdır. Bu problemlə L.N. Delone (1928, 1930, 1932, 1936, 1938); L.A. Sapeqin (1935, 1936); V.İ. Didus (1938); A.N. Lyutkov (1937); C.Ya. Kraevoy (1936, 1940); M.F. Ternnovski, M.T. Missjura (1936); A.K. Efeykin, B.N. Vasiliyev (1935) məşğul olmuşlar.

Lakin praktiki nəticələrə, xüsusilə eksperimental mutagenez yolu ilə sort əldə edilməsi gərgin əməyin və intensiv tədqiqat işlərinin köməyi ilə İsvəçrədə nail olmuşlar. 1950-ci ildə bu ölkədə şüalanmanın təsiri ilə bir çox kənd təsərrüfatı sortları əldə edilmişdir. Yalnız bu müvəffəqiyyətdən sonra bir çox ölkələrdə radiasiyanın köməyi ilə onlarla yeni sortun əldə edilməsi işlərinə ciddi yanaşılmış və hazırda dünyadan bir çox, demək olar ki, bütün ölkələrində bu sahədə intensiv tədqiqat işləri aparılır.

Seleksiyada kimyəvi mutagenlərin işlədilməsinə bir qədər gec başlanmışdır; XX əsrin 40-cı illərinə qədər kifayət dərəcədə güclü mutagenlər məlum deyildi.

Kimyəvi mutagenlərin axtarılmasına həsr edilmiş

tədqiqatlar 1905-1909-cu illərə aid edilməlidir (Koernike, 1905; Gaqer, 1909). Sonralar isə onların müvəffəqiyyətli axtarışları rus alımları V.V. Saxarov, K.V. Maqrjikovski, V.P. Ponomaryov (1932, 1933, 1935, 1936; Maqrjikovski 1936, 1940, Ponomaryov 1938) tərəfindən aparılmışdır. Onlar drozafila milçeyinə yod məhlulu, CuSO<sub>4</sub>, KMnO<sub>4</sub>, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ilə təsir etməklə süni mutasiya tezliyi spontan mutasiya ilə müqayisədə qanuna uyğun sürətdə yüksəldiyini göstərmişlər.

Yüksək effektivli kimyəvi mutagenlərin: xardal qazının törəmələrinin (Auerbax, Vedson, 1946), fenollar (Nadorn, Niggli, 1946) və bir sıra güclü mutagenlərin – etileneminin, etilen oksidinin, dietil sulfatın, qlitsidolun, diazometanın, formalinin, aldehidlərin, rus genetiki İ.A. Raponortun kəşfi ilə kimyəvi mutagenezdə yeni era XX əsrin 40-ci illərindən etibarən başlamışdır (1946, 1947, 1948). Xüsusilə İ.A. Raponort tərəfindən kəşf edilmiş mutagenlər yaxud onların törəmələri sonralar bütün mutagen amillərdən güclü effektə malik olmaları göstərilmiş və praktikada tətbiq edilmişdir. İ.A. Raponortun mutagenlərindən birinin payına, yəni etileneminin payına böyük müvəffəqiyyət düşmüştür. Bu mutagen kimyəvi mutagenezdə çevriliş törətmışdır.

Bu mutagen 1957-ci ildə, daha doğrusu onun kəşfindən 10 il sonra İsveç alımları tərəfindən arpa bitkisində sınaqdan keçirilmiş və qeyri-adi yüksək aktivliyə malik olması göstərilmişdir, hətta ionlaşdırıcı şüaların aktivliyindən bir neçə dəfə yüksək olmuşdur (Ehrenberq et. al. 1958, 1959, 1961; Gustafsson, 1960). Bu vaxta kimi İsveç tədqiqatçıları tərəfindən bitkilərdə bir çox kimyəvi birləşmələr; o cümlədən: etilen oksidi, formaldehid, iprit törəmələri, kofein, nebuların, yüksək təzyiq zamanı oksigen və başqaları

sınaqdan keçirilmişdir. Lakin bunların hamısı etilenelindən zəif effektə malik olmuş və 30% mutasiya törətmək imkanı ilə fərqlənmişdir. Etilen oksidi bu təcrübələrdə şüalanmaya oxşar aktivliyə malik olmuşdur (Gusyasson, Mac key, 1948; Ehrenberq, 1956). Bir qədər əvvəl eteleinin və başqa mutagenlər (İ.A. Raponort tərəfindən kəşf edilmiş) keçmiş SSRİ-də kənd təsərrüfatı bitkilərində P.K. Şkvarnikov və E.I. Volotov tərəfindən sınaqdan keçirilmişdir, belə ki, bunların tədqiqatı 1948-ci ildə dayandırılmışdır (Ran, 1964). 1948-ci ildən sonra radiasion və kimyəvi mutagenezə aid tədqiqat işləri 1957-ci ildə əvvəlcə keçmiş SSRİ EA-nın Sibir bölməsində sitologiya və genetika institutunda və keçmiş SSRİ EA-nın kimyəvi fizika institutunda, sonralar isə bir sıra akademiyalarda, kənd təsərrüfatı və elmi müəssisələrdə yenidən fəaliyyətə başlamışdır.

Kənd təsərrüfatı obyektlərində şüalanma ilə yanaşı kimyəvi maddələrin də təsiri öyrənilirdi. Onların arasında əvvəlki illərdə olduğu kimi sonrakı işlərdə aparıcı yeri etilenimin tuturdu. Bu maddə buğdada (Zoz, 1960, 1961, 1962, 1965), pomidorada (Xvostova, Turkov, ..., 1962), noxudda (Zoz, Kolotenkov, 1964, 1965), qarğıdalıda (Blyandur, 1965...), arpada (Lisikov..., 1967), kartofda (Tarasenko, 1963, 1964), çövdarda (Şarov, 1966) və s. sınaqdan keçirilmişdir.

Xarici ölkə alımlarının noxud üzərində apardıqları təcrübələrində etileneminin yüksək mutagen aktivliyə malik olması (Blixt, 1960), arpada (Heslot, 1961), slatda (Heslot, 1962), bərk buğdada (Scarascia, 1966), pomidorada (Hildering, 1963), çəltikdə (Kawoy, Sato, 1965, 1966), paxlalarda (Magri, Zannone, 1963) və başqa obyektlərdə göstərilmişdir.

Öz genetik təsiri ilə diqqəti cəlb edən sonrakı mutagen

1958-ci ildə Fransada kəşf edilmiş etilmətansulfanatdır (Heslot, Ferray, 1958, Heslot, Perrary, Zevy, Monard, 1959; Heslot, 1960, 1961). Bu alimlərin işlərində həmin mutagenin mutasiya tezliyi arpada və başqa obyektlərdə 50% təşkil etmişdir. Bu vaxtdan etibarən etilmətansulfanat bitkilərdə geniş sürətdə sınaqdan keçirilir və daha yüksək effektə malik mutagenlərdən biri hesab edilir. Onun yüksək aktivliyi arpada (Custafsson, 1963, Proese-Gertzen, Konzak, Nilan, Heiner, 1964, Şkvarnikov, Kulik, Černiy, 1967), noxudda (Enken, Sidorova, 1966), pomidorda (Tarsenko, 1963), qarğıdalıda (Amano, Smith, 1965), paxlada (Margi, Zannone, 1963) göstərilmişdir. Bu obyektlərdə etilmətansulfanat ionlaşdırıcı şüalara nisbətən 3-5 dəfə yüksək mutagen aktivliyinə malik olmuşdur.

Kimyəvi mutagenlər arasında ən çox effektə malik olan mutagenlərdən biri də 1947-ci ildə İ.A. Rapanort tərəfindən kəşf edilmiş dietilsulfat hesab edilir. İlk dəfə olaraq bu mutagenin yüksək effektə malik olması bitkilərdə Amerika alimləri tərəfindən göstərilmişdir (Heiner, Konzak, Nilan, Zegault, 1960). Onlar bu mutagenlə arpa toxumlarına təsir etməklə 66% mutasiya əldə etmişlər. Bu müəlliflər dietilsulfatın köməyi ilə yüksək məhsuldar arpa sortu əldə etmişlər (Sigurbjornsson, 1968). Dietilsulfat başqa tədqiqatçıların təcrübədə istifadə etdikləri obyektlərdə də yüksək mutasiya tezliyi yaratmışdır, belə ki, arpada (Heslot, 1961, 1962), bərk buğdada (D'Lmato, 1962), noxudda (Monti... 1966), salatda (Heslot, 1960) və başqa bitkilərdə analoji nəticələr alınmışdır. Yuxarıda qeyd olunmuş bütün işlərdə əvvəllər məlum olan mutagenlərdən etileneminin və etilmətan-sulfanatın da mutagen effekti göstərilmişdir.

Bitkilərdə köhnə, yəni əvvəllər istifadə edilmiş

mutagenlərin sınaqdan keçirilməsi ilə bir vaxtda yeni mutagen maddələrin də axtarışı davam etdirilir. Daha güclü mutagenlər, bu vaxta qədər məlum olan bütün mutagenlərdən effektli olan və kənd təsərrüfatı bitkilərində yüksək xeyirli mutasiya tezliyi əmələ gətirən – 1,4-bis-diazoa-s-etylbutan, N-nitrozometilsidikcövhəri və başqları keçmiş SSRİ EA-nın Kimyəvi Fizika İnstitutunda tapılmışdır (Zoz, 1961, 1966; Zoz, Markarova, Kolotenkov, Salnikova, Kotanova, Triqorova, 1965; Zoz..., 1964).

Bu maddələrin mutagen aktivliyi Rapoport tərəfindən drozofila milçəyində müəyyən edilmiş və onların köməyi ilə 100% dəyişkənlilik əldə etmək mümkün olduğu üçün onları supermutagen adlandırmışdır. Yumşaq buğdada bu mutagenləri sınaqdan keçirən zaman məlum olmuşdur ki, etileneminin aktivliyindən 2-3 dəfə artıq, yəni 80% mutasiya əmələ gəlir (Zoz, 1961; Zoz, Makarova, 1965).

1,4-bis-diazoasetibutan, N-nitrozoalkilsidikcövhərinin, etileneminin bir sıra törəmələri, dimetilsulfat və başqa mutagenlər buğdada öyrənildikdən sonra genetik və seleksiyaçılar tərəfindən onlar kənd təsərrüfatı bitkilərində kimyəvi fizika institutu ilə birlikdə, hətta sərbəst olaraq geniş şəkildə sınaqdan keçirilir. Onların yüksək mutagen aktivliyi buğdada (Lişenko, 1968, Prosira, 1968, Siminel, 1968; Joqin, 1968; Priylin, 1968; Qazizov, 1967; Qazizov, Zoz, Naboymikov, 1968; Naboymikov, Qazizov, İonov, Faizov, Zazulina, 1968, Evdakimova, Pivovarova, 1968), arpada (Zosimoviç, Androşyuk, 1967, 1968; Şevtsov, 1968; Nikiforova, 1968, Usikova, 1968), qarğıdalıda (Stepanov, 1968; Orinşteyn, 1968), noxudda (Sobolev, 1965, Parasenkov, Dolqix, 1968; Ponova, 1968; Jarikova, 1968), tərəvəz bitkilərində (Videnin, Rodinov, Korovin, Vanifatov, 1968,

Qulyaeva, Abaşkina, 1968; Daqix, Parasenkov, 1968), kartofda (Xrabrov, 1968; Yaşina, Perşutina, 1968; Petruşina, Yaşina, 1968), tütündə (Sarıçev, 1967; Todua, 1968). . . və s. bitkilərdə göstərilmişdir.

Bu istiqamətdə tədqiqat işləri həmçinin meyvəli və dekorativ obyektlərlə də aparılır (Ryadnova, Eremin, Pşonova, 1968; ...). Qeyd edilmiş işlərin əksəriyyətində N-nitrozoetilsidik cövhəri və NSC yüksək effektə malik mutagen kimi qeyd edilir. Ən çox mutasiya, daha doğrusu seleksiya üçün perspektivli mutasiyalar axırıncı mutagenlərin təsirilə noxud bitkisində B. Şarmoy tərəfindən əldə edilmişdir (1965, 1966).

Başqa mutagenlərin sırasında keçmiş SSRİ EA-nın KFİ tərəfindən sintez edilmiş etileniminin törəmələri daha çox diqqəti cəlb etmişdir (Salnikova, 1968). Təzə mutagenlər arasında (başqa müəssisələr tərəfindən kəşf edilmiş) bir neçə mutagen qrupunu birləşdirən kompleks birləşmələr qüvvətli mutagen hesab edilir.

Atsenaftenin mutagen aktivliyi qara qarağatda Çuvaşın tərəfindən 1968-ci ildə, gibberlin turşusu buğdada (Qutov, 1964), 2,4-D buğdada (Fşinpenko 1958) göstərilmişsə də onların effektliyi yüksək olmamışdır.

Xarici tədqiqatçıların təcrübələrində başqa mutagenlər içərisində yüksək effektə malik olan maddələrdən, xüsusilə etileneminə yaxın olan mutagenlərdən- metilmetsulfanatı, propilmetsulfanatı, butilmetsulfanatı və başqa alkan-sulfan efiri göstərmək olar. Bu mutagenləri arpada sinaq- dan keçirən zaman məlum olmuşdur ki, butilmetsulfonat daha güclü mutagendir, belə ki, mutasiya tezliyi etilmetsulfanatinkinə oxşar olmuşdur. Qalan mutagenlər isə bir qədər zəif olmuşlarsa da, hər halda ionlaşdırıcı şüaların

effektindən geri qalmamışdır.

Bitkilər üçün diepoksibutan, etiluretan və qlikol, yüksək təzyiqdə oksigen də qüvvətli mutagendir. Gənəgərçək və yerfindişi yağıının da yüksək aktivliyi göstərilmişdir. Son illərdə bitkilərdə sınaqdan keçirilmiş mutagenlər arasında ən yüksək yer nitrozoetil və nitrozometiluretana məxsusdur. Bu nöqtəyi-nəzərdən 1-metil-3-nitro-1-nitrozoquanidini də qeyd etmək lazımdır. Uretanların mutagen effektivliyi ilk dəfə 1948-ci ildə İ.A. Rapoport tərəfindən göstərilmişdir. Külli miqdarda mutagenlərin olmasına baxmayaraq yüksək genetik təsirə malik mutagenlərin axtarılması davam etdirilir.

### **1.3. Kimyəvi mutagenlərin təbiəti və onların təsir mexanizmi**

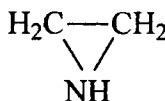
Hazırda yüzlərlə orta aktivliyə malik və onlarla güclü mutagen məlumdur. Yuxarıda qeyd edildiyi kimi bu kimyəvi mutagenlərin çoxu, o cümlədən mutagen qrupları keçmiş Sovet ittifaqında kəşf edilmişdir. Kimyəvi birləşmələrin xüsusiyyətinə və sakit vəziyyətində, həmçinin replikasiya olunan DNT ilə reaksiyasına görə Friz mutagenlərin aşağıdakı formada təsnifatını təklif edir (Friz, 1964). DNT-nin replikasiyası zamanı onunla qarşılıqlı təsirdə olan amillər: nuklein turşularının sələfi olan ingibitorlar (5-bromurasil, 5-xlorurasil, 5-iodurasil və s.), DNT ilə spesifik idarə olunan kristallar (proflarin, mavi akrizin, göy metilen, göy toluidin və s.).

Nuklein turşularını sakitlik vəziyyətində dəyişən mutagenlər: oksidləşdiricilər (azot turşusu, peroksidlər və s.) mono-, bi-, -polifunksional alkilli birləşmələr, təsnifləşdirilmiş birləşmələr, təsir mexanizmi hələ müəyyənləşdirilməmiş

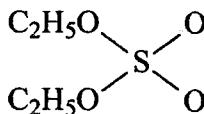
(xlorlu marqanes, alkoloidlər, ağır metallar və s.) birləşmələr.

Ən çox alkilli qruplardan, elektrofil təbiətli qruplardan ibarət olan birləşmələr, karbonlu turşuları asanlıqla alkilləşdirən, ionlaşdırıcı vəziyyətində olan və aminlərdə qarşılıqlı təsirdə ionlaşdırıcı vəziyyətində olmayan qruplardan ən çox alkilli birləşmələrdir.

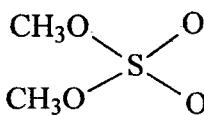
İonlardan ən geniş yayılmış və bitkilərdə yaxşı öyrənilmiş mutagenlərdən aşağıdakıları göstərmək olar:



etilenimin



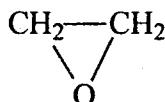
dietilsulfat



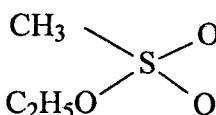
dimetilsulfat



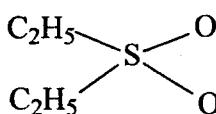
diazometan



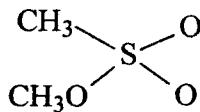
etilen oksidi



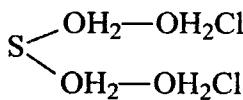
etilmətansulfanat



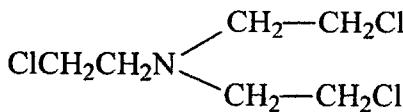
etilmətansulfanat



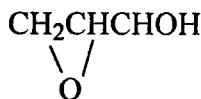
metilmetansulfanat



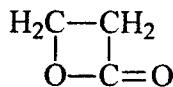
iprit



iprin azotlu analogu



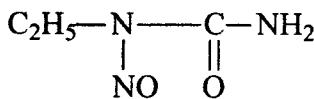
qlisidol



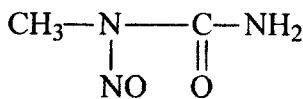
$\beta$ -propilakton



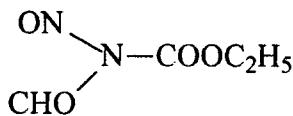
formaldehid



N-nitrozaetilsidikcövhəri

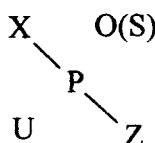


N-nitrozametilsidikcövhəri



N-nitrozo-N-metiluretan

Fosforlu birləşmələr də yüksək mutagen aktivliyinə malikdir:



(metilfosfin turşusunun  
ftoranhidrid izopropilen  
efiri)

Son illərdə bir çox mutagen qruplarından ibarət olan küllü miqdarda kompleks mutagenlər sintez olunmuşdur. Alkilli amillər üzvi turşular, fosfor turşusu, oksi- yaxud fenol- birləşmələri, sulfhidrid qrupları, aminlər, tioefirlər, sulfhidrilli birləşmələrlə asanlıqla qarşılıqlı təsirdə olur. Bir çox mutagenlərin təsir xarakteri onların zülal molekulları elektron rabitəsi ilə qarşılıqlı təsirdə olmalarını düşünməyə məcbur edir. Bir çox mutagenlərin DNT ilə bir başa təsiri göstərilmişdir.

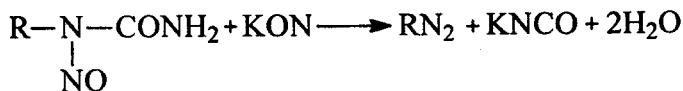
İrsi informasiyalar molekulyar səviyyədə nuklein turşuları əsaslarının ardıcıl düzülüşü ilə şərtləşir. Bu ardıcılığın dəyişdirilməsi, əlavə olunma, itirilmə yaxud nukleotidlərin əvəz olunması mutasiyaya səbəb olur.

Xromosomların törəməsinə DNT-nin replikasiyası və zülalların sintezi qoşulur (həmçinin, ehtimal ki, RNT-in sintezi də). Zülalların dəyişilməsi də, həmçinin mutasiyaya səbəb olur, əks təqdirdə xromosomların qırılmasına gətirib çıxarır. Mutagenlərin genetik təsir mexanizmi bir çox ədəbiyyatlarda (işlərdə) şərh edilmişdir (Rapoport, 1965; Heslot, 1966; Frees, 1959).

Keçmiş SSRI-də müəyyən məqsədlər üçün geniş işlədilən, hazırda öyrənilən mutagenlər arasında N-nitrozoalkilsidikcövhəri və etilenimin əsas yer tutur. Odur ki, onların təsir mexanizminin öyrənilməsi daha vacibdir.

N-nitrozometilekarbamid N-nitrozötörəmələri birləşmələrinin tipik nümayəndəsidir, diazometanın çıxması ilə

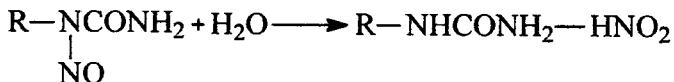
ayrılır və məlumdur ki, drozofil milçeyində mutasiya əmələ gətirir (Rapoport, 1948). Bununla əlaqədar olaraq təsəvvür edilir ki, N-nitrozoalkilamidlərin mutagen xüsusiyyəti canlı orqanizmə təsir edilən zaman, yaxud sonralar orqanizm daxilində diazoalkanların (çixması) ilə əlaqədardır. Belə ki, bunun ardınca bioloji təsirlərdə onların molekullarının başqa xüsusiyyətlərinin qəbul edilməsini məcbur edən məlumatlar meydana çıxır. Alkin sırasında N-nitrozoalkilsidikcövhəri və N-nitrozo quanidin törəmələrinin mutasiya tezliyinin radikaldan ashlığı mutagen reaksiyalarında alkilləşmənin mühüm rolunu sübut edir. Buna görə alkilləşdirmə qələvi mühitdə qeyri bərabər N-nitrozo törəmələrinindən əmələ gəlmiş diazoalkinləri təyin etməlidir.



Belə mexanizmin ehtimallılığı kimyəvi qruplarına görə oxşar mutagen aktivliyi olmayan birləşmələrin olmaması ilə sübut edilir, amma nitrozo qrupundan məhrum olanlar (Serebryanıy, Vasilyeva, 1968) N-nitroza birləşmələrinin qələvi mühitdə təsiri ilə mutasiya tezliyinin artması (dezoalkanların çıxması ilə) bir çox alımların fikrinə görə yuxarıda göstərilən mexanizm təsdiq edilir.

Belə ki, bir neçə hadisə zamanı isbat edilmişdir ki, aşağı pH zamanı effektli işləmə (Muller, Gichner, 1964) diazoalkanlardan alkilləşmə yeganə bir imkan kimi bu birləşmələrin təsir mexanizmini inkar edir.

Neytral və zəif turş mühit N-nitrozobirlləşmələrini azot turşusunun çıxması ilə onun hidrolizini yaradır.



NMSC-nın DNT-yə süni şəraitdə (*in vitro*) təsirinin öyrənilməsi zamanı dezaminlaşmə və alkilleşmə məhsullarının əmələ gəlməsi müşahidə edilmişdir (Bednyak, 1968). Belə ki, azot turşusunun mutagen aktivliyini öyrənən zaman onun zəif effektliyi göstərilmişdir (Guglielminetti, Bonatti, Zogrieno, 1966). Ehtimala görə qəbul etmək olar ki, mutagenin aktivliyi tam molekul kompleksi ilə onun kimyəvi və fiziki xüsusiyyətindən asılıdır və yuxarıda göstərilən mexanizmlərdən hər birinin müəyyən şəraitdə həyata keçirilməsi mümkündür.

Eyni zamanda klassik alkilədici mutagenlər genetik aktivlik birinci iki üzvdən artıq yayılmışdır (Gichner, Veleminsky, 1967), N-nitrozoalkilsidikcövhəri sırasının bütün homoloqları C<sub>5</sub> və C<sub>6</sub>-ya qədər mutagen aktivliyə malikdir (Qumanov, Norenko, 1966).

Etilenimin – heterotsiklik birləşmələrlə doymuşdur. Ən çox mutagen təsirinə aparan reaksiya azot atomunun bilavasitə etilləşdirilməsi hesab edir.

Etileniminin alkil qrupu hüceyrənin bir çox komponentləri: zülal, RNT və DNT ilə reaksiyaya girməyə qadirdir.

#### **1.4. Ali bitkilərdə mutagenlərin təsirinin analizi**

Ali bitkilərdə tətbiq olunan eksperimental mutagenez metodları, mutagenlərin ilk təsir mexanizmi haqqında və mutasiya əmələ gətirən sonrakı proseslər haqqında məlumat

verir. DNT səviyyəsindəki dəyişkənlilik faq və viruslarda edilmiş kəşflərlə oxşardır, görünür ki, bitkilərdə də mutasiyalar baş verir, lakin bitkilərin genetik cəhətdən mürəkkəbliyi onların analizini çətinləşdirir. Mutasiyanın analizini, mutasiyaya uğramış lokusu təyin etməklə kifayətlənilərlər. Belə ki, bu analiz də çox az qisim tədqiqatçılar tərəfindən aparılır. Nəticədə ali bitkilərdə mutasiyanın təbiəti haqqında bilik olduqca zəif nəzərə çarpir.

Bütün mutagenlər bu və ya digər mutasiya tezliyi zamanı bitkilərdə xromosom aberrasiyaları əmələ gətirir. Qəbul edilmişdir ki, mutagenlərin təsiri ilə gen mutasiyalarının tezliyi və xromosom dəyişmələri korrelyasiya təşkil etmir və müxtəlif hadisələrlə şərtləşir. Sitoloji üsulla bitkilərdə xromosom dəyişmələrini mitozun metafaza yaxud anafaza mərhələlərində müşahidə etmək olar (fragməntlər, körpülər, translokasiyalar və s.), meyozda (translokasiya halqları və zəncir, inversiyalar və s.). Genetik üsulla duplikasiyaları və çatışmazlıqları əldə etmək olar. Onu da demək lazımdır ki, xromosom dəyişmələrinin əmələ gəlməsi mexanizmi axıra qədər tam aydınlaşdırılmamışdır. Eksperimental məlumatlar göstərir ki, meyoz və mitozun müxtəlif fazalarında onların əmələ gəlməsini təmin edən bir neçə mexanizm məlumdur.

Müasir dövrdə xromosom dəyişilmələrinin əmələ gəlməsini izah edən iki hipotez mövcuddur: Saksin «klassik nəzəriyyəsi»nə görə ilk və sonrakı xromosom yaxud xromatid tellərinin qırılması baş verir; Rivelin «mübadilə nəzəriyyəsi»nə görə əvvəlcə xromosomlar arasında yaxud bir xromosomun daxilində temas baş verir, sonra əgər qırılma yerində xromosomların fiziki-kimyəvi xüsusi vəziyyəti olursa o zaman mübadilə baş verir.

Faqlarda gen (yaxud nöqtəvi) mutasiyalar üçün göstərilmişdir ki, onların çox hissəsi nuklein turşularında bir əsasın yaxud cüt əsasın dəyişilməsi hesabına baş verir və onların əmələgəlmə tezliyi dozadan xətti asılıdır (Friz, 1964). Xromosom aberrasiyaları tək qırılmalar nəticəsində (fragməntlər) əmələ gəldiyi zaman onların tezliyi dozadan xətti asılı vəziyyətdə olur, amma qırılmalar nəticəsində və sonrakı perekombinasiyalar (mübadilə) zamanı onların tezlik asılılığı kvadrata yaxındır (Sax, 1941; Teylor, 1964).

Xromosom aberrasiyalarının tezliyi və spektri, görünən mutasiya tezliyi və spektrində olduğu eyni amillərlə modifikasiyalasıdır. Vaxtdan asılı olaraq aberrasiyaların əmələ gəlməsi xromosom yaxud xromatid tipli ola bilər. İlkin interfaza mərhələsində aberrasiya yaradılması (süni) xromosom tipli dəyişilmələrin əmələ gəlməsinə səbəb olur, hansı ki, bu iki (cüt) xromotidin əmələ gəlməsinə qədər baş verir. İnterfazanın sonrakı (son) mərhələlərində ayrıca xromatidlərin qırılması baş verə bilər və (nəticədə) xromatid tipli dəyişilmə əmələ gələ bilər. Yarımxromotid mübadilələri meyoz yaxud mitozunancaq müəyyən mərhələlərində baş verir. (mitozun profazasında, meyozda paxinemadan sonra).

Mutagenlərin bitkilərlə təsiri yalnız görünən mutasiya və xromosom dəyişilmələrinin əmələ gəlməsini eks etdirmir, o həmçinin başqa effektlər də əmələ gətirir ki, bunlardan da ali bitkilərdə baş verən stimullaşma və steriliyi göstərmək olar. Mutagenlərin stimuləedicili təsiri bir çox amillər tərəfindən göstərilmişdir. Stimuləedicilik ən maraqlı məsələlərdən biri hesab edilir və onun mutagen təsirlə əmələ gəlməsi olduqca az öyrənilmişdir. Stimuləediciliyi izah edən genetik hipotez olduğu kimi eləcə də fizioloji hipotez də

mövcuddur. İ.A. Rapoportun nəzəriyyəsinə əsasən (1965), stimuləedicilik hətorizis nümunəli hetereziqotluğun mexanizminin yüksəlməsi ilə (belə bir konsepsiyani başqa alımların, o cümlədən Andreyevin də işlərində tapmaq olar 1963), həmçinin hüceyrənin ferment aparatına onların təsiri ilə şərtləşərək mutagenlərin modifikasiyalasdırıcı təsirilə əmələ gəlir. Modifikasiyon stimuləedici müəyyən enzimatik reaksiyaların gecikdirilməsi ilə əlaqədar olaraq aralıq məhsulların külli miqdardan toplanması ilə əmələ gələ bilər. Başqa tədqiqatçılar stimuləediciliyi mutagenin təsiri nəticəsində hüceyrədə əmələ gələn fizioloji aktiv maddə ilə izah edirlər. Şüalanmanın stimuləedici təsirini paxla, soğan, turp və buğdada öyrənən zaman alımlar belə nəticəyə gəlmişlər ki, radiostimuləedicilik ümumi radiasion zədələnmənin xüsusi hadisəsi hesab edilir və canlı orqanizmin qeyri bərabər dərəcə funksiya və sisteminin yoluxması nəticəsində əmələ gəlir ki, bu da təbii balansın pozulmasına, bitkilərdə bir çox kəmiyyət və keyfiyyət əlamətlərinin müsbət kənarlaşmalarına gətirib çıxarır: şüalanmanın ümumi effekti müsbət və mənfi dəyişkənliliklərin nisbəti ilə müəyyən edilir; nisbətən kiçik dozalar zamanı müəyyən şəraitdə bir sıra göstəricilərə görə müsbət dəyişkliklərə malik olur ki, bu da stimuləediciliyi təmin edir (Kavata, 1966).

Stimuləediciliyin ən yüksək effekti kimi qüvvətli kimyəvi mutagenləri göstərmək olar (dietilsulfat, etilenimin, nitrozoetilsidikcövhəri və s.).

Mutagenlərin stimuləedici təsiri müəyyən dərəcədə təcrübənin aparıldığı şəraitdə asılıdır. Görünür ki, özünün əmələ gəlməsi üçün bir sıra hadisələrin cəmini tələb edən stimuləedicilik effekti çətin hadisədir.

Bitkilərdə müxtəlif fiziki və kimyəvi mutagenlərin təsiri

ilə əmələ gələn sterillik də onların mutagen, eləcədə, fizioloji təsiri ilə şərtlənir və qeyri-ırsiyətli olduğu kimi həm də irsiyyətli xarakter daşıyır. Bir çox tədqiqatlar göstərir ki, irsiyyətli sterillik bir qayda olaraq xromosom aberrasiyaları əsasən translokasiyalarla şərtlənir.

Mutagenlərin canlı orqanizmlərə təsiri zamanı həmçinin hüceyrənin metabolik prosesinə güclü təsir göstərir ki, bu da bitkilərdə  $M_1$ -də sərti formada özünü göstərir. Kimyəvi mutagenlərin təsiri zamanı tənəffüsün tipi və intensivliyi müəyyənləşdirilmişdir.

### **1.5. Ali bitkilərdə kimyəvi mutagenlərin effekti**

Bitkilərdə mutagen amillərin effekti bir qayda olaraq  $M_2$ -də meydana çıxan mutasiyaya görə təyin edirlər, hansı ki, əksər hallarda mutant bitkilər ailələrin faizi ilə ifadə olunur ( $M_2$ -də materialın ailə ilə əkilməsi zamanı), yaxud yaşamış (yəni, məhsul yiğimina qədər qalmış) bitkilər içərisindən mutant bitkilərin faizinə görə (bütövlükdə, variantlar üzrə səpilən zaman) təyin edirlər. Kimyəvi mutagenlərin effekti bir qayda olaraq  $M_2$ -də əmələ gələn maksimum mutasiyalarla müqayisə edilir.

Aşağıdakı cədvəldə müxtəlif obyektlərdə ən çox effektli və yaxşı məlum olan mutagenlərin sınıqdan keçirilməsi ilə əlaqədar maksimum mutasiya tezliyi verilmişdir. Cədvəldə verilmiş mutagenlərdən bəziləri bitkilərdə ilk dəfə öyrənilmişdir (cədvəl 1.1).

## **1.6. Bitkilərdə süni mutasiyanın təbiəti**

İki tip irsiyyət-nüvə və sitoplazmatik irsiyyət məlumdur. Odur ki, xromosomların irsi materialının dəyişilməsi nəticəsində və eyni zamanda sitoplazmatik komponentlərin – plastidlərin, mitokondrilərin, (hansı ki, son vaxtlarda DNT kəşf edilmişdir) dəyişkənliyə uğraması nəticəsində mutasiya əmələ gələ bilər.

Xromosomdankənar irsiyyət hadisəsi ilk dəfə K.Korreks və E.Bau tərəfindən təsvir edilmişdir. Sitoplazmatik mutasiya süni mutagenez yolu ilə antirrinum, epilobium, likorersikop, nepeta, nikotin, oenotera, arabidopsis və başqa bitkilərdə əldə edilmişdir.

Nüvənin irsi strukturuna gəldikdə isə onların dəyişkənlilikləri xromosom sayının dəyişməsi ilə əlaqədar olaraq baş verə bilər. (poliploidiya, haploidiya, aneuplediya). Xromosom dəyişilmələri ilə (çatışmazlıq, duplikasiya, translokasiya, inversiya) və gen mutasiyası ilə əlaqədardır. Çatışmazlıq və duplikasiya ilə baş verən mutasiyaların çox hissəsi buğdada, qarğıdalıda əldə edilmişdir. Şüalanma ilə buğda bitkisində əmələ gəlmış mutantları analiz edən zaman qəbul edilmişdir ki, onlar çatışmazlıqların hesabına – 5A xromosomundakı Q lokosunun duplikasiyası hesabına əmələ gəlir. Yumşaq buğdada speltoïd (çatışmazlıq hesabına əmələ gələn) və kompaktoidlərin (duplikasiya hesabına əmələ gələn) əmələ gəlməsinə aparan çatışmazlıq – duplikasiya mexanizmi ilk dəfə Mak Kem tərəfindən 1954-1956-ci illərdə əldə edilmişdir (şəkil 1.1).



*Şəkil 1.1. Yumşaq buğdada speltoid*

Translokasiya nəticəsində mutasiya arpada və başqa obyektlərdə müşahidə edilmişdir (Qustafson, 1966). Qarğıdalıda məlum olan R və A lokusları üçün süni yaradılan xromatiddaxili və qeyri bərabər krossinqover nəticəsində də mutasiyanın əmələ gəlməsi həmçinin mümkündür (Stadler, 1954).

Haylenə görə müəyyən allelin, mutasiya əmələ gələndən sonra başqa allelin yatırılmasının təsiri hesabına əmələ gələn paramutasiya (qarğıdalıda, pomidorda) məlumdur. Gen və nöqtəvi mutasiyalar süni mutagenezdə xüsusi geniş sinif əks etdirir və eyni zamanda onların bitkilərdə aberراسiyasız təbiəti haqqında dəqiq sübutlar böyük çətinliklər əmələ getirir.

Poliploidiyanın müxtəlif növləri təbiətdə geniş yayılmışdır. Eksperimental yolla əldə edilmiş poliploidlər, haploidlər, aneuploidlər bitkilərin seleksiyasında geniş istifadə

edilir. Poliploidiya spesifik mutagen amillərin təsiri ilə əmələ gələn mutasiyanın müəyyən tipi hesab edilir (kolxitein, ansenortan, qaimeksan, xloralhidrat, azotun aşağı oksidləri, veratrin və s.). Az spesifik təsir edən ionlaşdırıcı şüalar, kimyəvi mutagenlər və boy stimuləediciləri poliploidiya əmələ gətirə bilər. Kolxitsin poliploidiya əmələ gətirməklə bir vaxtda başqa mutasiyalar da törədə bilər, hansı ki, poliploidiya əmələgelmə anında əmələ gəlib, tetraploiddə dörd xromosomdan ikisini saxlayır və somatik reduksiya ressesiv mutasiya ilə homoziqot forma əmələ gətirir (Dubinin və Şerbakova görə, 1964-1965).

Mutantların əmələ gəlməsi mutagen amilin təsirindən sonra translokasiya nəticəsində xromosom sayının artması hesabına mümkündür. Krepis toxumlarına etileniminin təsirilə iki qeyri-homoloji xromosomlar arasındaki qarşılıqlı translokasiya hesabına əmələ gələn xromosom sayı, bir xromosom sayı artmış hüceyrəyə malik sektorial ximer əldə edilmişdir.

Yumşaq buğdada sünbüllərin dəyişilməsi ilə mutantların öyrənilməsi zamanı müəyyən edilmişdir ki, bir çox kompaktoidlər və subkompaktoidlər nulli-, mono-, yaxud tetrasomik idilər, seyrək (boş) sünbüllülük formaları nulisomik imiş, başqa çoxlu mutantlar da həmçinin müəyyən xromosom pozulmalarına malik olmuşdur: bir heteromorf bivalentin mövcud olması, xromosomlardan birinin ciyinin olmaması və başqaları (şəkil 1.2).



*Şəkil 1.2. Yumşaq buğdada sünbüllerin dəyişilməsi*

Əksər hallarda mutasiyalar eksperiment aparan zaman və təbiətdə ressesiv formalarda olur. Dominant mutasiyalar diploidlərə nisbətən poliploidlərdə daha çox əmələ gəlir. Tədqiqat yolu ilə (eksperimentdə) dominant və yarımdominant mutasiyalar bərk və yumşaq buğdada, arpada, qurdağızı bitkisində əldə edilmişdir. İlk dəfə olaraq  $M_1$ -də əmələ gələn yüksək tezlikli dominant mutasiyalar super mutagenlərin köməkliyi ilə yumşaq buğdada və noxudda əldə edilmişdir.

Toxunulmuş əlamətlərin xarakterinə görə makro- və

mikromutasiyaları ayırd edirlər, belə ki, makromutasiyalar adı gözlə asan seçilə bilən  $M_1$  və  $M_2$ -də iki böyük fenotipik dəyişkənliliklərdir, mikromutasiyalara isə çoxlu əlamətlərin dəyişilməsi aiddir ki, bunlar da  $M_3$  və sonrakı nəsillərdə əmələ gəlir. Son vaxtlara qədər eksperimental mutagenezdə başlıca olaraq makromutasiyalara diqqət yetirildilər. Mikromutasiyaları öyrənmək üçün xüsusi analiz üsulları tələb olunduğu üçün buraxılırdı. Eyni zamanda göstərilmişdir ki, onlar morfoloji və fizioloji əlamətlərə toxunur, makromutasiya tezliyindən heç də az meydana gəlmir və seleksiya üçün az əhəmiyyət daşıdır. İlk dəfə olaraq onlar yer findığında, sonra çəltikdə, arpa, vələmir, qarğıdalı, buğda və başqa obyektlərdə əldə edilmişdir.

Arpada makromutasiyaların tezliyini analiz edərək Qaaul belə nəticəyə gəlmişdir ki, onların tezliyi xlorofil mutasiyaların tezliyinə yaxındır və eyni zamanda makromutasiyalar kimi xlorofil mutasiyalarının 1/10 hissəsini təşkil edir.

**Mutant kompaktum** (qısa sünbüll). *T.aestivum* kompaktumdan *C* geni ilə fərqlənir; birincidə bu gen passiv formadadır, amma ikincidə dominantdır. *C* geni və *Q* faktoru özlərinin təsirinə görə fərqliidlər, lakin hər ikisi buğdada eyni mutasiya törətmək qabiliyyətinə malikdirlər. Mak Kenin tədqiqatının göstərdiyi kimi, kompaktum-mutanti 5A xromosomunun uzun çıynında distal tərəfindəki lokusda yerləşən *Q* faktorunun duplikasiyası hesabına əmələ gəlir. Bir sıra tədqiqatlarda kompaktum N-nitrozaalkilsidikcövhəri və etileniminin təsiri ilə əmələ gəlmişdir (şəkil 1.3).



*Şəkil 1.3. Mutant kompaktum (yumşaq buğdada)*

Makromutasiyalara toxumların, yarpaqların ölçüsü, gövdənin uzunluq və hündürlüyü, sünbülün uzunluğu, bugumlararası məsafənin uzunluğu və sayı, yağı tutumu, toxumlarda zülal və başqa maddələr, toxum çıxımı və başqları aiddir.

Əksər makromutasiyalar pleiotrop effektə malikdirlər ki, ona görə də onların seleksiyada tətbiqi çətinlik törədir. Onlardan çoxu aşağı məhsuldarlığa malik olur, bəzi hallarda onların bir qismi məhsuldarlığa görə başlanğıc sorta yaxın, yaxud üstün olur və yeni sorta başlanğıc verir. Pleiotrop effektdən (qayıtmaq üçün) azad olmaq üçün mutant əlaməti yeni genotipə köçürmək lazımdır.

Bir çox süni mutantların çatışmazlıqları ondan ibarətdir ki, onlarda eyni vaxtda mutagenin təsiri nəticəsində bir çox mutasiyaya uğramış əlamətlər mövcud olur. Mutantlar çoxluğu noxud və başqa obyektlərdə qeyd edilmişdir. Etibarınla noxud bitkisinə təsir edən zaman başlanğıc formadan 8 genotipik forma ilə fərqlənən mutant əldə edilmişdir.

Süni mutagenez yolu ilə əldə edilmiş eksperimental

materialı analiz edən zaman inanmaq olar ki, bütün əlamətlər morfoloji, eləcə də fizioloji və biokimyəvi əlamətlər dəyişilə bilər.

Mutantlar ya sistematika üçün əhəmiyyəti olmayan əlamətlərə malik olur, ya da mutant əlamətlər təsnifat nöqtəyi-nəzərdən əhəmiyyətli olur. Bu zaman mutant başqa növə aid edilir. Belə mutantlar arpa, buğda, soya və başqa obyektlərdə əldə edilmişdir.

C.Stadlerin fikrinə görə eksperimental mutasiya spontan mutasiyadan fərqlənməlidir, lakin praktikada onların qeyri-adi oxşarlığını göstərirlər. Bir sıra hallarda spontan mutagenezdə məlum olmayan mutasiyalar əldə etmək mümkündür. Stubbe belə mutasiyaya qurdağızı bitkisində əldə edilmiş mutasiyanı misal göstərir. Corruqat mutantı onlar tərəfindən eksperimental mutagenezdə əldə edilmiş və o bu bitkinin spontan mutantlar kolleksiyasında tapılmamışdır. Süni mutagenez seleksiya üçün çoxlu material verir, külli miqdarda və müxtəlif, artıq məlum olan amillər əldə etməyə imkan verir və seleksiyanın bir çox xüsusi məsələlərini həll etməyə imkan verir.

### **1.7. Kimyəvi mutagenlərin bitkilərdə spesifikasiq təsiri haqqında**

Mutagen amillərin spesifikliyi onların müəyyən orqanizmlərdə təsirilə müəyyən mutasiya əmələ gəlməsini ifadə edir, müxtəlif mutagenlər genetik materiala təsir xarakteri ilə seçilir, onların təsiri müxtəlif orqanizmlərdə, müxtəlif cinslərdə yaxud müxtəlif vəziyyətli hüceyrələrdə fərqlidir. Süni mutagenezdə spesifikliyin yüksəlməsi vəzifəsi arzu olunan istiqamətdə mutasiya spektrinin dəyişməsidir və

müəyyən lokuslarda dəyişkənliyin əldə edilməsidir (Ayerbak, 1966).

Mutagen amillərin spesifik təsir xarakteri eksperimental mutagenezin inkişafının ilkin mərhələlərində R.Qoldşmit və B.B.Saxarov tərəfindən əldə edilmişdir və drozofildə müəyyən tip mutasiyalar müəyyən amillərin təsiri nəticəsində meydana gəlməsini göstərmışlar.

Müasir dövrdə müxtəlif mutagen amillərin müxtəlif irsiyyətli dəyişkənliliklər əmələ gətirməsi haqqında kifayət qədər təsdiqədici faktiki material vardır. Bu işlərdə istiqamətlənmiş mutasiya probleminin həllinə ilkin giriş meydana çıxmışdır. Belə ki, mutagenlərin molekulyar səviyyədə, həmçinin hüceyrə və orqanizm səviyyəsində spesifik təsir mexanizmini aydınlaşdırıran tədqiqatlar aparılır.

Molekulyar səviyyədə bu problemin həll edilməsi müəyyən tip iki azot əsasının əvəz edilməsinə nəzarət yolu ilə ola bilər. Mikroorqanizmlərdə buna oxşar tədqiqat bir qism müzakirələr üstünlükklə tranzitasiya (DNT molekulunda bir purinin başqası ilə əvəz edilməsi, yaxud bir primidinin başqa primidin ilə əvəz edilməsi), başqları – transversiyalar – (bir purinin primidinlə əvəz edilməsi yaxud, əksinə primidinin purinlə əvəz edilməsi) əmələ gətirir.

Birinci mutagenlərə misal azot turşusu və 5-bromurasil, ikincilərə misal – sulfanatlar aiddir. Belə ki, ilkin səviyyədə müxtəlif mutagenlər irsiyyətin materialında spesifik dəyişkənlik əmələ gətirir.

Molekulyar səviyyədə aparılan tədqiqatlar müəyyən genlərin qanunauyğun mutasiyaya uğramasını öyrənməyə imkan verir. Eyni zamanda ali çox hüceyrəli orqanizmlərdə irsiyyətli dəyişkənlilikləri gen səviyyəsində öyrənən zaman qarşıya bir çox metodik çətinliklər çıxır. Onun əvəzinə

bitkilərdə mutasiya prosesinin spesifik xüsusiyyətlərini hüceyrənin irsi strukturu səviyyəsində olduğu kimi – xromosomlarla, eləcə də orqanizm səviyyəsində də öyrənmək mümkündür. Bir sıra hadisələr zamanı ayrıca genlərdə mutasiya əmələ gəlməsi qanuna uyğunluğu haqqında mühakimə yürütmək mümkündür.

Əksər mutagenlərin canlı orqanizmlərə təsiri zamanı xromosom dəyişkənlilikləri əmələ gətirdiyi kimi gen mutasiyası da əmələ gətirir və hər bir mutagenin müəyyən obyektdə təsir xüsusiyyəti görünən mutasiya tezliyinin xromosom dəyişilmələri tezliyinə nisbətini xarakterizə edir. Xromosom dəyişilmələrinin analizini kökcüklərdə ilk mitozda yaxud mutagenlə təsir edilmiş toxumlardan əmələ gəlmiş cücer-tilərin uc hissələrində, həmçinin bitkilərdə meyozun ilk metafazasında öyrənirlər.

Kimyəvi mutagenlərdən bir çoxu, məsələn, 8-etoksikofein xromosom qırılmaları əmələ gətirdiyi halda, görünən mutasiyalar əmələ gətirmir (Qustafsona görə, 1960), başqları cüzi xromosom dəyişilmələri tezliyi zamanı süni yaranmış görünən mutasiyaya nisbətən yüksək effektlidir, məsələn, mileran dietilsulfat, 1,4-bic-diazoatsetilbutan, di- $\beta,\beta^1$ -xloretilfosfor turşusu və nəhayət. Üçüncülər aralıq vəziyyət tutur – yüksək tezlikli mutasiya əmələ gətirir – xromosom dəyişilmələri əmələ gətirdiyi kimi (şüalanmaya nisbətən cüzi dərəcədə) görünən mutasiyalar da törədir, məsələn, etoksidlər, etilmətansulfanat, N-nitrozaalkil sidik cövhəri belə mutagenlərdəndir.

Kimyəvi mutagenlərin təsirinin xarakterini analiz edən zaman xromosom qırılmaları yerlərinin yapışmasının, yaxud perekombinasiyanın müxtəlif xüsusiyyətləri əhəmiyyət kəsb edir. Mileranın arpa və at paxlasına təsirini

öyrənən zaman körpüsüz fragməntlərin yüksək tezliyinin əmələ gəlməsi qeyd edilmişdir. Etieneminin buğda toxum-larına təsiri zamanı körpülərin sərbəst fragməntlərə nisbəti 3:6,8 təşkil edir, γ-şüaları ilə eyni şəraitdə şüalanan zaman nisbət analizi 1:1-nə bərabər olmuşdur. Kimyəvi təsir zamanı (etilenimin, etilmətansulfanat) körpülərə nisbətən fragməntlərin çoxu şüalanma ilə müqayisədə, həmçinin kartof yumrularına mutagenlə təsir etdikdən sonra ilk mitozda qeyd edilmişdir. Qarabaşaq bitkisində etilenimin, dietilsulfat və NEM-i sınaqdan keçirən zaman körpülərin fragməntlərə müxtəlif nisbəti əldə edilmişdir.

Sonra göstərilmişdir ki, şüalanma və bir çox kimyəvi maddələr (8-etoksikofein və başq.) hüceyrə tsiklinin bütün fazalarına təsir edir, eyni zamanda əksər kimyəvi mutagenlər, o cümlədən alkiləedici birləşmələr ancaq xromosom-ların autoreproduksiyası zamanı xromosom qırılmaları törədir ki, bunun da nəticəsində bu və ya digər mutagenlər müxtəlif tipli xromosom dəyişilmələri əmələ gətirirlər. Belə ki, sonralar qəbul edilmişdir ki, alkiləedici amillər hüceyrə tsiklinin bütün fazalarında xromosom qırılmaları törətməyə qadirdir, lakin onların presintetik dövründə təsiri zamanı başlıca olaraq onlar potensial dəyişilmələr növündə meydana çıxırlar.

Qırılmaların müxtəlif xromosom və hər bir xromosomun uzunluğu boyu paylanmasına gəldikdə isə son illərdəki işlərdə qəbul edilmişdir ki, həm şüalanma və həm də kimyəvi mutagenlər qırılmaların paylanmasında təsadüfü xarakter daşıdır, eyni zamanda kimyəvi mutagenlərin təsiri zamanı qırılmaların lokuslaşması çoxdur.

At paxlası şüalandırılan zaman qırılmaların say nisbəti, daha doğrusu böyük xromosomdakı qırılmaların sayının

kiçik xromosomdakı qırılmalara nisbəti 5:2-yə nisbətinə, amma ipritlə təsir edən zaman nisbət 50:2-yə bərabər olmuşdur. Müxtəlif mutagenlərlə krepisə təsir edən zaman alınan qırılmaların faizi, müəyyən xromosom ciyində müxtəlif şüalanmalar nəticəsində əmələ gələn qırılmaların faizi ilə uyğun yaxınlığa malik olduğu göstərilmişdir. Xromosomun ciyni boyu qırılmaların lokuslaşması həmçinin uyğundur: izoxromatid delesiyalar üçün maksimum qırılma tezliyi ciyinin ortasında, minimum qırılmalar – proksimal hissəsində qeyd edilmişdir. Etilenimin və hidraziz malein turşusu ilə təsir edən zaman yüksək qırılma tezliyi D-xromosomun uzun ciyinin proksimal sahəsində və A-xromosomun qısa ciyinin distal hissəsində müşahidə edilmişdir. 8-etoksikofein ilə təsir edən zaman qırılmaların lokuslaşması onların şüalanması zamanı alınmış lokuslaşma ilə uyğundur. Ali bitkilərdə mutagenlərin lokuslararası spesifik təsiri haqqında mühakimə yürüdən zaman başlıca olaraq fenotipik mutanatların əmələ gəlməsi ilə hesablaşırlar.

Bitkilərdə eksperiment yolla sünü mutagenez ilə əldə edilmiş mutasiya spektinin analizi göstərir ki, müəyyən tip mutasiyalar spontan yolla əmələ gəldiyi kimi, istənilən güclü mutagenlərin təsiri ilə də əmələ gələ bilər, lakin onların, yəni mutasiya tezliyinin əmələ gəlməsi müxtəlif mutagenlər üçün müxtəlifdir. Müasir dövrdə ionlaşdırıcı şüaların və kimyəvi mutagenlərin təsirindən sonra xlorofil və morfoloji mutasiya spektrlərini analiz edən zaman mutasiya prosesinin müxtəlif xarakterinin nisbəti haqqında geniş, inamlı məlumatlar əldə edilmişdir.

İonlaşdırıcı şüularla taxıl bitkilərinə təsir edən zaman (buğda, arpa) xlorofil mutasiyaları arasında ən çox albina mutasiyası, kimyəvi mutagenlərlə təsir edən zaman

(etilenimin, etilmetsulfat və başq.) ən çox xanta (ksanta), viridis və tigrina mutasiyaları əmələ gəlir.

Kimyəvi mutagenlərlə təsir edən zaman şüalanmaya nisbətən bir qayda olaraq az təsadüf edilən mutasiyalar əmələ gəlir. Bundan başqa əgər şüalanma zamanı əksər mutasiyaların tezliyi yüksək deyilsə və 700-800-ə 1, bəzən 1000-ə 1 mutasiya təşkil edirsə, onda kimyəvi mutagenlərlə təsir edən zaman həyata davamlı, o cümlədən xeyirli mutasiyalar çox əmələ gəlir.

İonlaşdırıcı şüuların və kimyəvi maddələrin noxud bitkisinə təsirindən sonra əmələ gəlmış mutasiya spektrini öyrənən zaman B.Şram tərəfindən göstərilmişdir ki, kimyəvi mutagenlər şüalanmaya nisbətən daha geniş mutasiya spektri əmələ gətirir. Az təsadüf olunan mutantlar kimyəvi mutagenlərin təsiri ilə daha çox yaranır. Kimyəvi mutagenezdə geniş mutasiya spektri arpada şüalanmaya nisbətən daha çox əldə edilməsi qeyd edilmişdir. Etilenimin ilə təsir edildikdən sonra tam xlorofil mutasiyası əldə edilmişdir, amma neytron ilə şüalanmadan sonra albina tipli mutasiya spektri 70% təşkil etmişdir.

Arpa bitkisində rentgen şüalarını, etilmetsulfanatı, dietilsulfat, etilenimin və başqa birləşmələri sınaqdan keçirən zaman, sulfanatın təsiri ilə alınmış mutasiya spektrinə yaxın spektr alınmışdır. Arpa bitkisinə müxtəlif kimyəvi birləşmələr sinfi: alkilədici amillərin (ipritin törəmələri, etilen oksidi, formaldehid), oksidləşdiricilərin (xlorun, yodun,  $\rho$ -dioksan), purin törəmələrinin (8-etoksikofein, nebularin), akridinlərin (akridin, akriflavin) təsiri zamanı maraqlı nəticələr əldə edilmişdir.

Yaxın vaxtlarda taxıl bitkilərində sınaqdan keçirilmiş mutagenlər arasında strukturunda bir neçə mutagen qrupu

olan kompleks mutagenlər diqqəti daha çox cəlb edir. Belə mutagenlərdən istifadə etməklə geniş miqyasda spesifik mutasiya spektri əldə etmək mümkündür.

Mutagen amillərin spesifik təsiri problemini həll edən zaman genin strukturu əsas əhəmiyyət kəsb etdiyi halda, fenotipin onlar tərəfindən nəzarət edilməsi heç bir əhəmiyyətə malik deyil. Bu daha aydın şəkildə bir və eyni fenotipi təmin edən arpanın müxtəlif lokuslarının mutasiyaya uğraması tezliyini analiz edən zaman göstərilmişdir. Xlorofillin əmələ gəlməsinə nəzarət edən arpanın müxtəlif lokusları rentgen və  $\gamma$ -şüaları ilə şüalanan zaman hər ikisi eyni tezliyə malik mutasiya əmələ gətirir, amma etilmətansulfanat ilə təsir edən zaman yalnız *albt* lokusu mutasiyaya uğramışdır.

Arpanın Bonus sortunu şüalandırıran zaman ən çox spektoidlik «c» lokusu mutasiyaya uğramış, kimyəvi mutagenlərlə təsir edən zaman isə (etilenimin, etilen oksidi, etilmətansulfanat) ən çox «a» lokusu, həmçinin «e» və «f» lokusları mutasiyaya uğramışdır.

Bununla əlaqədar olaraq qeyd etmək lazımdır ki, lokslararası spesifikasiq haqqında yalnız mutanatların münasib analizindən sonra mühakimə yürütülmək olar.

Yüksək tezlikli xromosom dəyişilmələri əmələ gətirən mutagenlər, bir qayda olaraq  $M_1$ -də bitkilərin məhsuldarlığının güclü dərəcədə azalmasına səbəb olur. Nebuların və başqa mutagenlərin effektiv dozaları ilə təsir edən zaman məhsuldarlıq  $M_1$ -də azaltmaq əvəzinə yüksəlir.

Etileminlə arpa toxumlarına təsir edən zaman şüalanmaya nisbətən 3-5 dəfə çox mutasiya əldə edilmişdir, eyni zamanda  $M_1$ -də məhsuldarlıq şüalanmaya nisbətən etileniminlə təsir edən zaman yüksək olmuşdur.

Bəzi hallarda kimyəvi mutagenlərin təsiri ilə sterillik

şüalanmaya nisbətən yüksək olur, bu da belə bir nəticəyə gətirib çıxarır ki, sterillik gen mutasiyası ilə əmələ gəldiyi kimi xromosom abberasiyaları yolu ilə də əmələ gələ bilər.

Radiasiyadan fərqli olaraq kimyəvi mutagenlər fertiliyin azalması, düzümlülük, boyun ləngiməsi, xromosom abberasiyası tezliyi və M<sub>2</sub>-də mutasiya tezlikləri arasında düzünə korrelyasiya alınmaya bilər.

İ.A.Rapoportun mikrogenetik konsepsiyasına əsasən gen moleküllərinin monomerləri – nukleotidlər, monopeptidlər müəyyən fiziki-kimyəvi konstantlarla xarakterizə olunur: dipolanla, entropiyanın böyüklüyü, diamaqnit qəbulediciliyi ilə və s; kimyəvi moleküllərin mutagen aktivliyi və spesifik təsiri onların fiziki-kimyəvi xüsusiyyətlərinin genomonomerlərlə yaxınlığını müəyyən edir.

Genetik materialın təbiəti müəyyən bir tipdə 100% mutasiya almağın imkanlarını kənar edir. Mutagen bir əsasla, yaxud DNT-nin ardıcıl bir neçə əsası ilə istənilən əsas, yaxud əsas qrupu genomda dəfələrlə təsadüf olunduğu halda spesifik tənzim oluna bilər.

Hüceyrənin başqa komponentlərinə və ikinci proseslərə, fenotipik spesifikasiyə gətirib çıxaran mutagenlərin təsiri görünür ki, seçicidir. DNT-də məlumatın dəyişilməsi bir neçə mərhələləri keçməklə mutant fenotipə gətirib çıxarı: ilkin dəyişilmələrin sabitliyi və replikasiyası, məlumat DNT-də transkripsiya, translaksiya və polipeptid zəncir, yeni mutanta başlanğıc verən mutant hüceyrənin yeni biokimyəvi ardıcılığının və bölünməsinin əmələ gəlməsi. İkinci mərhələlər, öz növbəsində mutagen təsirilə spesifik idarə olunur, bunun da nəticəsində mutasiya prosesi mutagenin təsir xarakterindən asılı olduğu kimi, organizmin cavab reaksiyasından da asılıdır.

## **1.8. Süni mutagenezdə genotipin rolü**

Görünür ki, mutagen amillərin spesifik təsir problemi, obyektin mutagenezdə spesifikliyi problemi ilə əlaqədar həll edilməlidir. Obyektin mutagen təsirə qarşı spesifik reaksiyası ilk dəfə olaraq L.D.Stadler tərəfindən 1929-cu ildə əldə edildikdən sonra bitkinin mutasiya tezliyinin onun məhsuldarlığından asılılığını öyrənmişdir.

Bitkilərdə eksperimental mutagenezə dair aparılmış külli miqdar tədqiqatlar müxtəlif fəsilə, növ, sortların mutagen təsirə müxtəlif reaksiyalarını təsdiq edir, hansı ki, başlıca olaraq həyatilik dərəcəsilə və mutagenlə işlədikdən sonra bitkinin zədələnməsi ilə (həssaslığı) və  $M_2$ -də mutasiya tezliyi (mutagenliyi) ilə mühakimə yürüdülür. Süni mutagenezə dair zəngin materialın olmasına baxmayaraq bitkilərin dəyişkənliliklərinin ümumi qanuna uyğunluqlarını sübut etmək çətindir, baxmayaraq ki, bir çox tədqiqat işləri bu məsələnin həllinə həsr edilmişdir. Bu sahədə aparılmış işlərin çoxunda bitkilərin həssaslığı, xromosomların sayı və uzunluğu, nüvənin orta həcmi, hibridliliyini və s. birləşdirməklə onların genetik təbiətindən, həmçinin toxumların ölçü, nəmlik və yetişmə dərəcəsindən, toxumlarda müdafiə rolunu oynayan maddələrdən, toxumların reproduksiyasından və s. asılılığı müəyyən edilmişdir.

Həssaslıq, həmçinin mutabillik dərəcəsi və dəyişkənlilik xarakteri cüzi dərəcədə məhsuldarlıqdan asılıdır ki, bu da bugda, arpa, qarabaşaq və başqa obyektlərdə göstərilmişdir.

Bir çox müəlliflər qeyd edir ki, yüksək məhsuldar formalar aşağı məhsuldar formalara nisbətən mutagenlərin təsirinə qarşı davamlıdır, gen, yaxud xromosomların

mutasiyası ilə onlarda əmələ gələn müdafiə effekti ilə izah olunur ki, bu da xırda çatmazlıqlar, yaxud müəyyən lokusların duplikasiyasını daşıyan orqanizmlerin yaşamasına imkan yaratır. Poliploid formaların ümumi mutabiliyi diploid formalara nisbətən zəifdir. Bu onunla izah edilir ki, poliploidlərdə mutasiya uyğun gələn lokusların dupli-kasiyaya uğramadığı zaman əmələ gəlir. Digər tərəfdən poliploidlərin çox yaşaması (həyatiliyi) onlarda yüksək mutasiya çıxımı əldə etməyə imkan verir. Ploidlikdən başqa mutasiya tezliyi orqanizmin başqa genetik xüsusiyyətlərindən də asılıdır.

Yumşaq bugdada yüksək mutabillik tez-tez mutasiyaya uğrayan **Q** lokusun miqdarı ilə izah olunur.

Məhsuldarlığın artması ilə xlorofil mutasiyasının tezliyi bir qayda olaraq azalır. Onlar əsasən iki və daha çox homoloji xromosomlarda yerləşən genlərin hesabına əmələ gəlir və onların əmələ gəlməsi üçün mutasiyanın bu genlərdə eyni vaxtda baş verməsi vacibdir.

Xromosom dəyişilmələri üçün göstərilmişdir ki, onların tezliyi məhsuldarlığın artması ilə yüksəlir.

Bir çox tədqiqatçılar belə nəticəyə gəlirlər ki, məhsuldarlıq başqa genetik xüsusiyyətlərə nisbətən o qədər də böyük rol oynamır. Xromosom dəyişilmələri üçün, onların tezliyinin məhsuldarlıqdan asılı olaraq çoxaldığı göstərilmişdir.

### **Monofunktional və bifunktional alkilli amillərin DNT və onun bioloji ardıcılığına təsiri**

Artıq xeyli vaxtdır ki, bir çox alimlərin diqqətini, kimyəvi reaksiyalar yolu ilə hüceyrənin mühüm funksional strukturu ilə güclü bioloji effekt göstərən birləşmələr cəlb

etmişdir. Bu tip birləşmələrin sintezini və təsirinin öyrənilməsi müxtəlif növ şışkinliklərə onların yüksək effektli təsiri imkan verir ki, bundan da klinikada geniş istifadə edilməsi tövsiyə edilir. Azot ipriti (embixin), lizin, eponat, TEM, tio TEF, dopan, novembixin, deqranol, sarkolizin və s. adlarını yada salmaqla xərcəngin ximoterapiyasında bu birləşmələrin rolunu qiymətləndirmək olar. Son illərdə müalicə üsullarının yenidən işlənilməsi və yaxşılaşdırılması, həmçinin ximoterapiyanın şüalanma ilə uyğunlaşması, cərrahiyənin işə qarışması və başqa vasitələrlə bir çox preparatların bir sıra şışkinlik növlərinə effektliyini yüksəltmək mümkün olmuşdur.

Lakin indiye qədər tətbiq olunan, mübahisəyə səbəb olmayan qəti bir birləşmə mövcud deyildir. Bu məsələ ilə Xeddou məşğul olaraq, xərcəngin müasir ximoterapiyası onlara qarşı mübarizədə lazımı yer tutmadığını qərara almışdır.

Alkilli radikalala malik  $R-(C_nH_{2n}+1)$  və başqa birləşmələrin hidrogen atomunu əvəz edən, yaxud özünə başqa radikal birləşdirən birləşmə *alkilədici maddələr* adlanır. Başqa sözlə, alkilli birləşmələr elektronla zəngin, yaxud nukleofil mərkəzlə zəngin olan mərkəzlə birləşmək qabiliyyətinə malik olan elektrofil reaktiv şəklində təsəvvür edilir. Onlar müxtəlif sinif birləşmələrlə əks etdirilir (cədvəl 1.2). Bu birləşmələrdə alkil qrupları sadə (məsələn:  $-CH_3$ ;  $-C_2H_5$ ) və mürəkkəb (məsələn:  $-CH_2OH$ ;  $-CH_2CH_2OH$ ;  $-CH_2CH_2NH_2$ ;  $-CH_2CH_2Cl$ ) ola bilər.

Cədvəl 1.2

Bir çox bioloji alkilli birləşmələr (Boscuya görə, 1954)

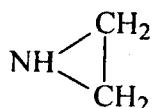
<i>Alkilli birləşmələrin tipləri</i>	<i>Nümayəndələr</i>
1	2
Halogen alkillər	$\text{CH}_3\text{J}$
Eufokislot efiri	$\text{CH}_3-\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{S}}}-\text{CH}_3$
Sulfat turşusu efiri	$\text{CH}_3-\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{S}}}-\text{O}=\text{O}$
Fosfor turşusu efiri	$\text{CH}_3-\text{O}-\overset{\text{P}=\text{O}}{\text{O}}-\text{O}-\text{CH}_3$
Xlormetil efiri	$\text{CH}_3-\text{O}-\text{CH}_2\text{Cl}$
2-xlormetilsulfidlər	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{S} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl} \end{array}$
2-xloretilaminlər	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{H}_3\text{C}-\text{N} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl} \end{array}$
Epoksidlər	$\begin{array}{ccccc} \text{CH}_2 & - & \text{CH} & - & \text{CH} & - & \text{CH}_2 \\ & \diagup & & & \diagdown & & \\ & \text{O} & & & \text{O} & & \end{array}$
Etileniminlər	$\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{NH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_2 \end{array}$

d-Laktonlar	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}_2 \\   \\ \text{O}-\text{C}=\text{O} \end{array}$
Diazoalkanlar	$\text{N}=\text{N}-\text{CH}_3$
Aktivləşdirici etilenli birləşmə	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{S} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C} \end{array}$

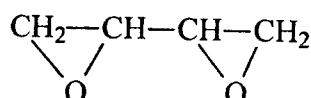
Sayından və alkil qruplarının təsirindən asılı olaraq onlar mono-, bi-, və polifunktional birləşmələrə bölünür və bir, iki və çoxlu bioloji aktiv qruplara malik olur. Məsələn:



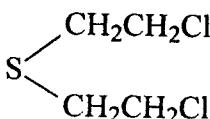
Yodlu metil



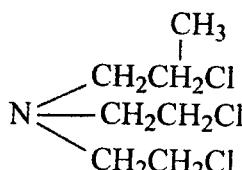
Etilimin



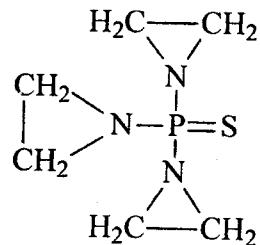
Diepoksibutan



İprit



Novembixin



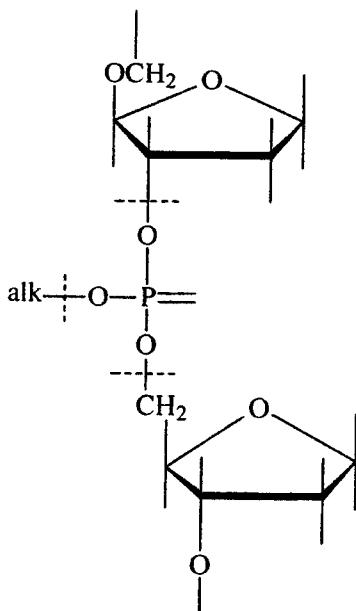
Tio TEF

Öz dövründə Koller maddə və hüceyrəyə təsir edən zaman münasib bir termin irəli sürmüdüdür: «nukleotik təsir» (indi ən çox «sitogenetik təsir» işlənir) və «sitotoksiki təsir». Birinci, maddənin hüceyrədə nüvə strukturuna təsirini göstərmək üçün - xromosomlara, ikinci isə – sitoplazmaya

təsirini göstərmək üçün tətbiq edilir. Amöbün nüvə və sitoplazmasının ipritə qarşı nisbətli həssaslığına həsr edilmiş təcrübə göstərmişdir: sitoplazmaya təsir zamanı orqanizmi öldürmək üçün 0,0015% azotlu iprit lazımlı gəlmiş, lakin nüvəyə təsir zamanı – ancaq 0,00015%, yəni 10 dəfə az tələb olunmuşdur. Rentgen şüalarına isə nüvənin həssaslığı sitoplazmaya nisbətən iki dəfə çox olmuşdur. Belə ki, əksər hallarda aşağı dozada maddə sitogenetik, lakin yüksək doza zamanı sitotoksiki təsir göstərir.

Ayerbax və Robson drozofil milçəyi üzərində müşahidə aparan zaman, iprit sitoplazmaya yeridilərkən təcrübə xromosomlarında letal mutasiyaların miqdarının artmadığını və nüvənin sitoplazmadan asılı olmadan zədələndiyini görmüşlər. Bu bir çox mutagen birləşmələrin xromosomlara birbaşa təsirini göstərir, belə ki, alkilli preparatları xərçəng ximoterapiyasında tətbiq edən zaman sitogenetik effektin başlıca rol oynadığını təsəvvür etmək olar. Yüksək səviyyəyə çatmış xromosom balansının pozulması zamanı (dominant tipli hüceyrə letalları) şışkinliklərin böyüməsini əhatəyə alır (qarşısını alır) (Ayerbax, 1961; Dubinin, Sanrikina, 1964).

Uotson və Krikin modelinə əsasən dezoksirubonuklein turşusunun molekulu növbələşən dezoksiribonukleotid-lər-dən təşkil olunmuş ikitelli zəncir şəklində təsəvvür edilir. Dezoksiribonukleotidlərdən hər biri pentoza şəkəri-dezoksi-riboza, azot əsası və fosfor qalığından təşkil olunmuşdur. Belə ki, biz DNT-nin bu komponentlərindən üçünü – alkilli reaksiyaların bir çox mümkün olan variantını aydınlaşdırıraq. Desokriboza ilə alkilləşmə baş vermir. Alkilləşdirici madələrlə ancaq fosfor turşusunun qalığı və azot əsası təsirdə ola bilər (şəkil 1.4).

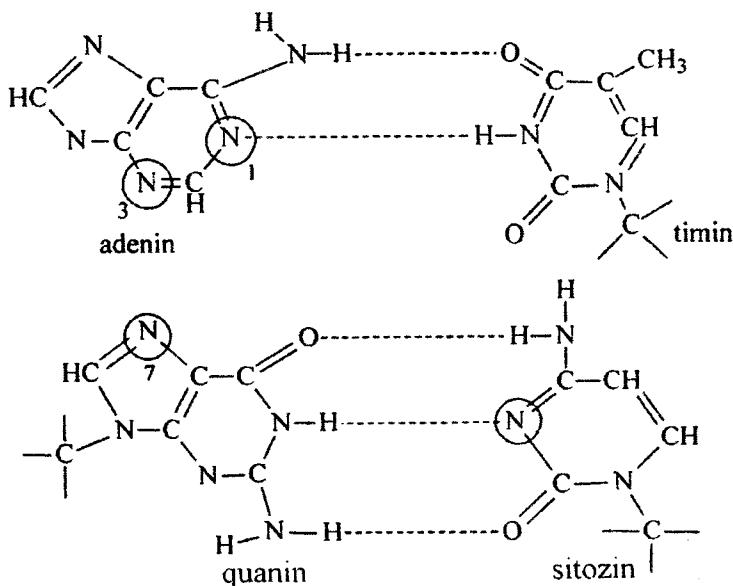


*Şəkil 1.4. Fosfat qalığı ilə alkilləşən zaman (nöqtələrlə) mümkün qırılma*

Alkilləşdirici maddələrin fosfat qrupları ilə qarşılıqlı təsiri intensiv surətdə keçir. Fosfor qalığına birləşmiş alkil qrupu davamsız üçlü fosfat efiri əmələ gətirir. Hidrolitik ayrılma zamanı bu reaksiya alkil qrupunu azad etməklə dönen reaksiya xarakteri daşıya bilər və trasalkilləşmə hipotezinə əsasən alkil radikalı purinə birləşir. Alkil qrupunun fosfor qalığından ayrıldığı vaxt fosfor qalığı və dezoksi-riboza arasındakı əlaqə pozula bilər. Belə qırılma, görünür ki, nəhəng xromosom birləşmələri əmələ gətirə bilər, amma nöqtəvi mutasiya yarada bilməz (Friz, 1964).

Əgər DNT ikiləşən zaman müəyyən miqdarda alkilləşdirici qrup fosfat qalığı ilə əlaqəli qalırsa, o zaman ikiləşmə yatırıla bilər (Friz, 1964).

Tədqiqatçılar üçün ən çox alkilləşdirici amillərin azot əsasaları ilə reaksiyası maraq doğurur. Yanq və Kempbell məlumat vermişlər ki, iprit  $25^{\circ}\text{C}$ -də və  $\text{pH}=7$ -də adenini və quanini alkilləşdirir, amma sitozin ilə reaksiyaya girmir.



sərbəst cütlər



və ya



DNT-ni dimetilsulfatla işləyən zaman alkilləşdirici mad-dənin çox hissəsi purin və primidinlə reaksiyaya girməsi əldə edilmişdir. Quaninlə DNT-nin absorbasiyasını

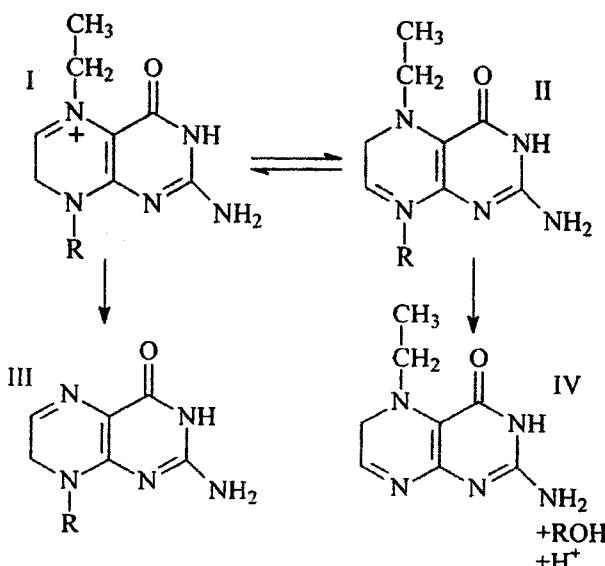
ultrabənövşəyiliyə dəyişdirməklə reaksiyada olur. Sonralar göstərilmişdir ki, alkilləşdirici maddələrin təsiri zamanı başlıca olaraq azotun 7-ci vəziyyətində quaninin alkil-ləşməsi baş verir. Həmçinin müəyyən edilmişdir ki, quaninin alkilləşməsi onun DNT molekulu tərkibinə daxil olduğu zaman baş verir. Quanizin, yaxud quanil turşusunun tərkibində olan zaman 7-ci quaninin alkilləşməsindən başqa növbəti məhsullar əldə edilmişdir: 1-alkiladenin, 3-alkila-denin, 1,3-alkiladenin və 1-alkilsitozin. DNT-də timin isə alkilləşmir.

Quaninlə olduğu kimi, eləcə də başqa əsaslar da əldə edilmişdir ki, onlar DNT-yə və azad nukleotidlərə daxil olan zaman alkilləşmələrində fərq olur. Belə ki, həm adenin N-1 vəziyyətində və həm də sitozin N-1 vəziyyətində azad nukleotidlərdə daha reaktivdir, nəinki DNTstrukturunda. Bunu onunla izah etmək olar ki, Uotson və Krikin modelinə əsasən bu vəziyyət DNT-də əhatəyə alınır. DNT-nin denaturasiyası zamanı onların reaktiv xüsusiyyəti yenidən meydana gəlir. Adeninin N-3 vəziyyəti, əksinə, azad nukleotidlərdə az reaktivdir və iki spirallı DNT-də alkil-ləşmə reaksiyasını bir neçə dəfə gücləndirir. DNT-də alkil qrupu ilə reaktivliyin artmasını müəlliflər, adeninin DNT-nin mikromolekuluna daxil olduqda adenin halqası daxilində elektron paylanmasıın dəyişilməsi ilə izah edirlər.

DNT-də quaninin N-Z-in yüksək reaksiya vəziyyəti nukleozidlərdə və nukleotidlərdə olanlarla müqayisədə Ross bu atomun fosfor efiri qalığına nisbətən yaxın yerləşməsi ilə izah edir. Nakamma və Pulma güman etmişlər ki, azot 7-ci vəziyyətində, DNT strukturunda hidrogen rabitəsi əmələ gətirmədən ən çox nukleofil mərkəz olur.

Azot quaninin 7-ci atomunun alkilləşməsi zamanı

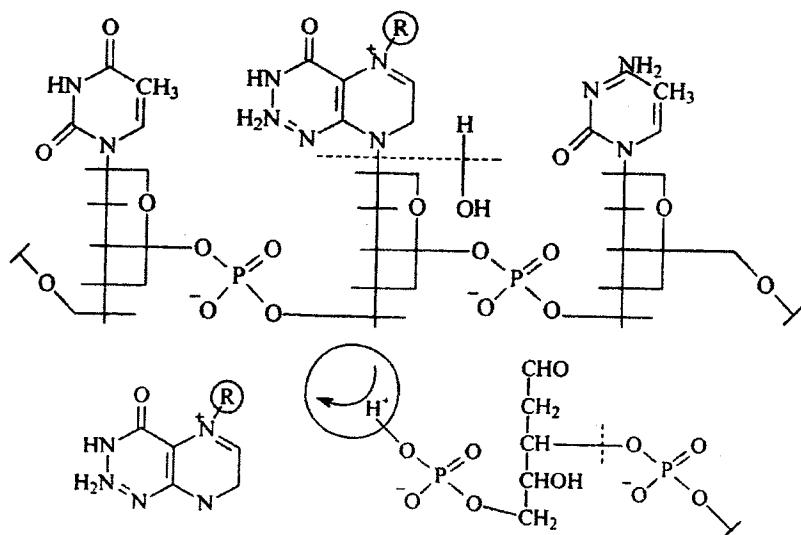
güman edilən purinsizləşmə mexanizmi:



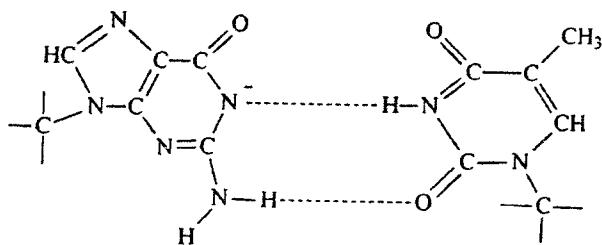
Quaninin N-7 vəziyyəti və adeninin N-3 vəziyyətinin alkilləşməsi davamsız dördlü azotun əmələ gəlməsinə gətirib çıxarır. Nəticədə əsas DNT-nin şəkər-fosfor karkasından ayrılır, daha doğrusu «purinsizləşmə» baş verir. Bu zaman 3-alkiladeninin itirlməsi sürəti 7-alkilquaninə nisbətən yüksək olacaq. Elə bu müəlliflər alkilpurinin ayrılması zamanı şəkər-fosfor rabitəsinin qırılmasını unudurlar (la Lauley, brookes, 1963).

Quaninin N-7 vəziyyətinin alkilləşməsi zamanı və DNT zəncirində onun saxlanılması zamanı bu azotun elektronu alkilləşmə reaksiyasına təkan verir və N-7 atomu müsbət yüklenir. Bununla da N-1 vəziyyətində pirimidin halqasında atomun oksidləşməsi yüksəlir. Nəticədə DNT-nin sonrakı reduplikasiyası zamanı bu ionlaşma əsasların qeyri-normal birləşməsinə (cütləşməsinə) gətirib çıxarır, belə ki, ionlaşmış

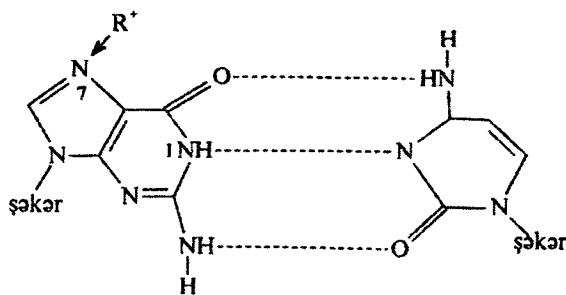
alkilquanin timinlə, normal sitozin cütünün əvəzinə birləşə bilər (Şəkil 1.5).



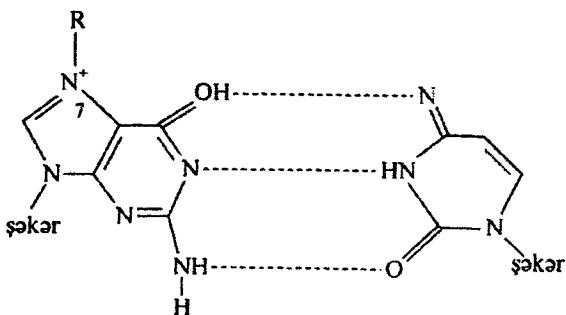
*Şəkil 1.5. DNT-də azotun quaninin 7-ci vəziyyətində alkilləşməsi zamanı DNT strukturu ardıcılığının pozulması*



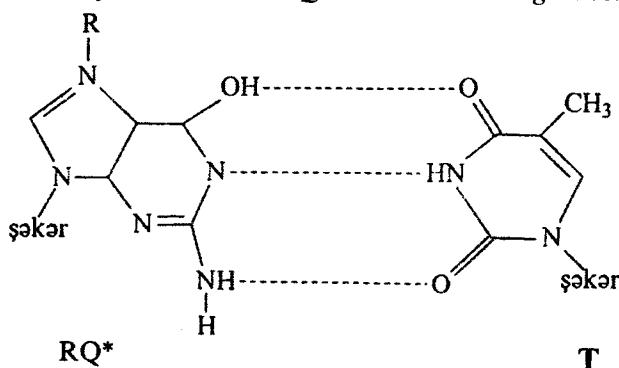
*Şəkil 1.6. Q-T-nin cütləşməsi səhvi*

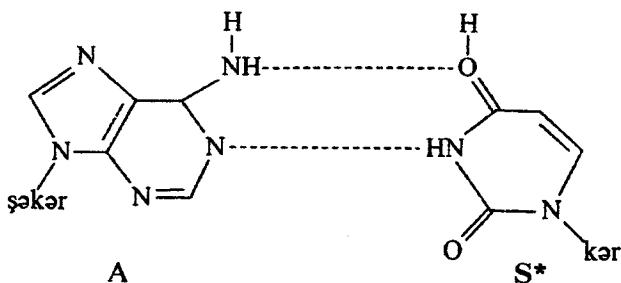


*Şəkil 1.7. DNT-də alkilləşməyə qədər Q-S cütləri*



*Şəkil 1.8. Quanin azotu atomunun 7-ci vəziyyətinin alkilləşməsindən sonra Q-S cütünün əmələ gəlməsi*





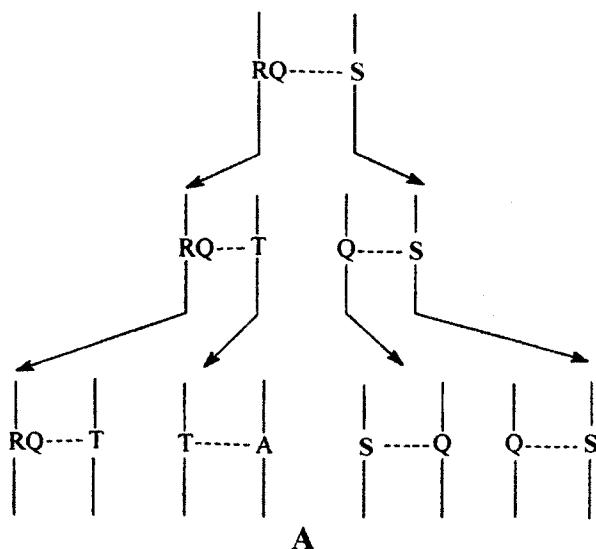
*Şəkil 1.9. Haramer və başqalarının hipotezinə əsasən Q-T və S-A-nın cütləşməsinin səhvi*

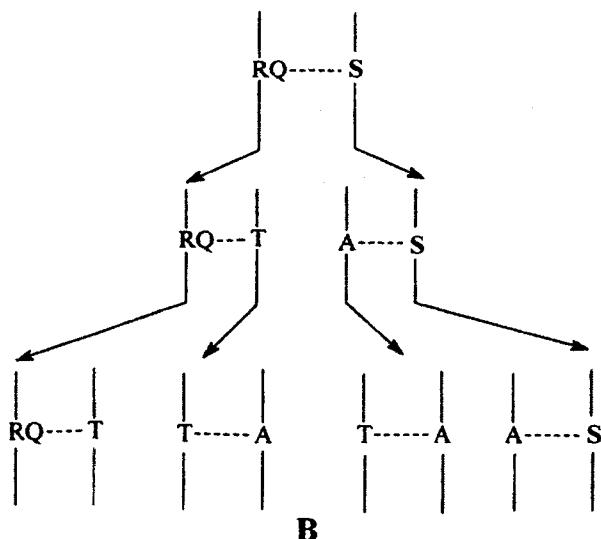
Sonrakı reduplikasiya zamanı belə cütləşmə, sonrakı iki replikasiya zamanı alınmış dörd DNT molekulundan birləşdə QS-i TA cütlərinin dəyişilməsinə getirib çıxarır. Müəlliflər Naqatoy və başqaları tərəfindən irəli sürülmüş mexaniki nəzəriyyəni ifadə edirlər (Naqata, Yamamura, Saito, Tukui, 1963). Bu hipotezə əsasən, N-1 vəziyyətindən proton alkilləşmiş N-7 quanin vəziyyətinə. protonun sitozinin amin qruppasından quaninin oksigen atomuna köçürüldüyü eyni vaxtda, xüsusən onunla cütləşmiş sitozinə köçürülür. Nəqant və başqalarının sxemini Pauli və Bruksun hipotezindən fərqi ondan ibarətdir ki, burada əsasi cütlərindən biri alkilləşən zaman qeyri-normal taytomer formaya hər iki əsas (quanin və sitozin) çevrilir və replikasiya zamanı hər iki tel səhv verir. Bu mexanizmlər o vaxta qədər təsir edə bilərlər ki, nə qədər ki, hələlik alkilləşmiş əsas DNT molekuluna birləşmiş şəkildə qalır (şəkil 1.10).

Bir neçə hüceyrə bölünməsindən sonra alkilləşmiş quanindən alkil qrupu və əsas ayrıla bilər, DNT-də qalmaqla, yenə də normal quanin funksiyalaşdırıa bilər. Nəzəri mümkündür ki, alkilləşmiş quaninin ayrıılması zamanı DNT-nin komplementar tempdə istənilən başqa əsas əmələ gələ bilər,

lakin əvvəllər deyildiyi kimi qırılma şəkər-fosfat karkasında da baş verə bilər.

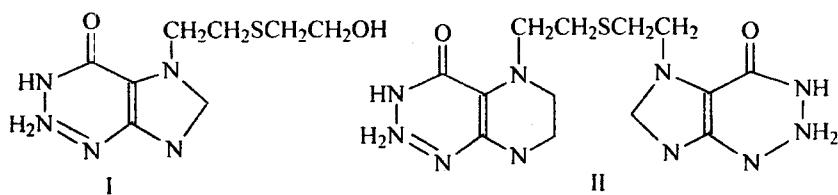
İpritin yüksək kimyəvi mutagenliyini əldə etdikdən sonra müəyyənləşmişdir ki. Xromosomlar və DNT yenicə reduplicasiya olunan zaman hüceyrə ipritə daha çox həssas olur. İpritin alkil qrupunun DNT-də bir reaktiv mərkəzi alkilləşdirməsi, amma başqasının, beləliklə çarpaz əlaqə-cross links əmələ gətirməsi haqqında hipotez irəli sürülmüşdür. Sonralar belə bir təsəvvür irəli sürülmüşdür ki, çarpaz əlaqələrin xromatid telləri arasındaki əlaqələrə nisbətən möhkəm olduğu üçün çarpaz əlaqənin gərginliyindən xromosomların fragmentləşməsinin əmələ gəlməsi haqqında təsəvvür irəli sürülmüşdür. DNT molekulunda çarpaz əlaqələr necə sərbəstdirsə, eləcə də bu cür əlaqəni xloretilaminlərin təsiri zamanı zülalla əlaqə göstərilmişdir.





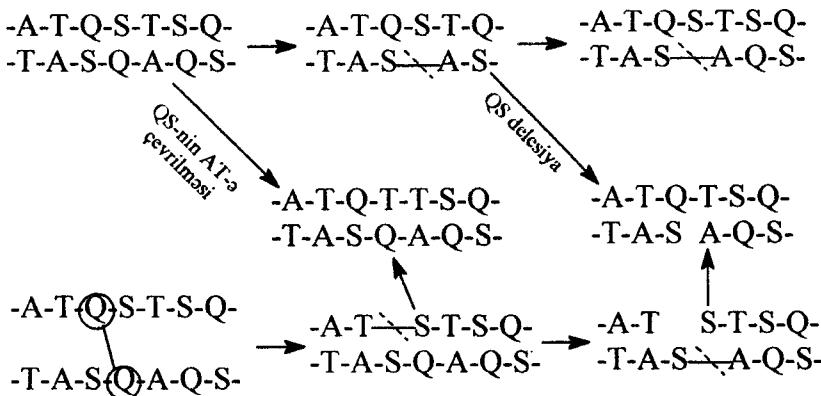
**Səkil 1.10.** Bruks-Lauli (A) və Harami (B) hipotezinə əsasən quaninin alkilləşməsi zamanı cütləşmə sxemini dəyişməsi.

Yüksək radioaktiv ipridən  $[S^{35}]$  və  $[S^{35}]$  ipritin yarısı, (2-xloretil-2 hidroksiletil- $[S^{35}]$ ) sulfid bifunksional və monofunksional xüsusiyyətli maddə kimi, *in vivo*, eləcə də *in vitro*-da DNT-yə təsir zamanı iprit «yarım ipridən» fərqli olaraq di (quanin-7) törəmə əmələ gətirir (şəkil 1.11, 1.12).



**Səkil 1.11.** Quaninin biofunksional və disfunktsional alkilləşmə məhsulu.

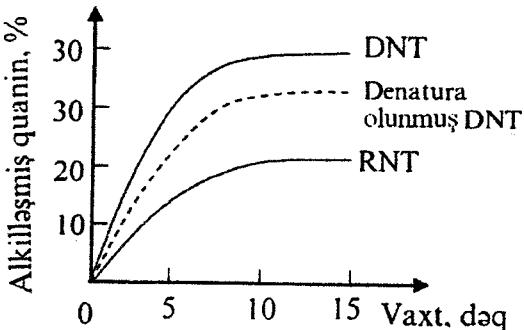
Monofunksional maddə ilə təsir edən zaman quanin-7 törəməsini tapmışlar. Müəlliflər təsəvvür edirlər ki, bu «tikişlər» və tullantı quanindən əks DNT telində baş verə bilər (şəkil 1.12), lakin DNT-nin bir telində quaninlər arasında əlaqə və imkanı ləğv etmir.



*Şəkil 1.12. DNT-də mono və bifunksional alkilləşdirici amillərin təsiri zamanı mutasiya sxeminiñ əmələ gəlməsi*

Məlum olmuşdur ki, alkilləşmiş quaninin 25%-i çarpez rabbitəlidir. Kağızda avtoradioqrafiya ilə xromatoqrafiyanın tətbiqi ilə və DNT-ni nişanlanmış iprit atomu ilə işləyən zaman ultrabənövşəyi işığa adsorbsiyani ölçən zaman Q-S və S-S arasında çarpez əlaqə məhsulları, lakin çox az miqdarda Q-Q tapılmışdır.

DNT-nin iki komplementar zənciri arasında çarpez bifunksional rabbitənin olmasını göstərən məlumatları irəli sürürər. Belə ki, nişanlanmış ( $S^{25}$ ) ipritlə işləyən zaman denaturasiya olunmuş DNT və RNT-də alkilləşmiş quaninin faizi, nativ DNT ilə işləməyə nisbətən bir qədər aşağı olmuşdur (şəkil 1.12).



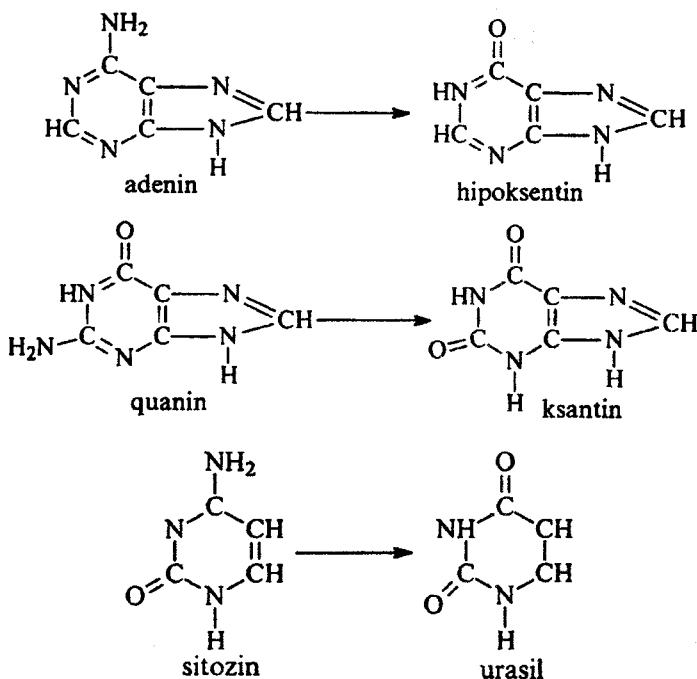
*Şəkil 1.13. Nuklein turşuları alkillaşən zaman alkillaşmış quaninin əmələ gəlmə dinamikası (Lawley, Brookes, 1983)*

### DNT və RNT-nin sakitlik vəziyyətinə mutagenlərin təsiri.

Kimyəvi birləşmələrin təsirilə canlı orqanizmlərdə mutasiya əmələ gəlmə prosesi 1932-ci ildə V.V.Saxarovun təcrübələrində sübut edilmişdir. N.K. Koltsovun təklifi ilə V.V.Saxarov 1931-ci ildə drozofila milçeyinin sürfələrinə yod və yodlu kalium ilə təsir etmişdir. Bununla mutasiya tezliyinin yüksəlməsinə nail olmuşdur.

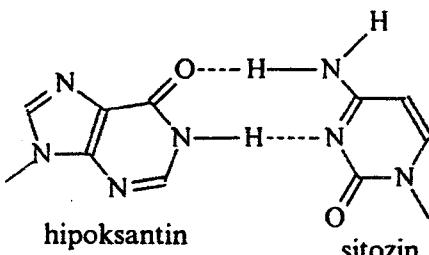
O vaxtdan etibarən DNT-ni dəyişdirmək qabiliyyətinə malik olan mutagenlərin tətbiqi genişlənmişdir. Qeyd etmək lazımdır ki, sünə yolla viruslardan tutmuş bitki və heyvan orqanizmlərində mutasiya əmələ gətirmək olar.

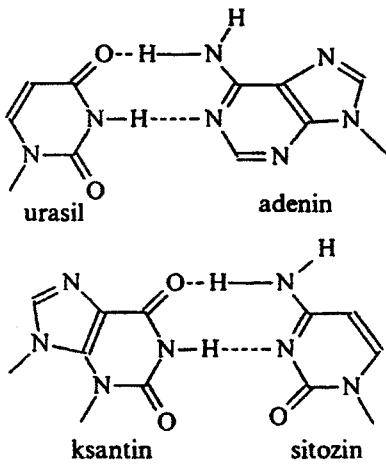
**Azot turşusu. Əsasın aminsizləşdirilməsi.** Azot turşusu başlıca olaraq DNT-də əsası aminsizləşdirir və mutasiya əmələ gətirir. DNT-də əsasən NH<sub>2</sub> (amin qrupu) olan üç nukleotid aminsizləşə bilər. Aminsizləşmənin qanuna uyğunluqları Şuster və onun əməkdaşları tərəfindən əldə edilmişdir. Onlar göstərmişlər ki, DNT və RNT-də olan əsaslar sərbəst əsaslar kimi reaksiya verirlər. Bu zaman adenin-hipoksantinə, quanin-ksantinə, sitozin-urasilə çevrilir.



Ksantin sitozinlə cütləşmə xüsusiyyətini saxlayır, buna görə də quaninin aminsizləşməsi mutasiya əmələ gətirmir, lakin yüksək reaksiyaya girmə effekti yaradır.

Hipoksantin və urasil müvafiq surətdə sitozin və adeninlə cütləşir, nəticədə tranzitsiya tripli mutasiyalar əmələ gətirir.





DNT əsasının aminsizləşməsinin sürəti aşağıdakı qaydada baş verir: quanin, sitozin, adenin; RNT-nin əsası isə pH-4,2-də təxminən DNT əsası kimi aminsizləşir. pH-in 5,0-dan 4,2-yə qədər dəyişməsi sitozin və adeninin aminsizləşməsi 90 dəfə, quaninin isə 30 dəfə yüksəlir. Mutasiya tezliyi bu zaman 80 dəfə artır, lakin letal təsiri isə yalnız 30 dəfə artır. Buradan da sübut olunur ki, quaninin aminsizləşdirilməsi letal mutasiya effektini sürətləndirir.

Onu da qeyd etməliyik ki, bəzi hallarda quaninin aminsizləşdirilməsi mutasiya ilə də nəticələnə bilər. 1966-cı ildə Xerriot qeyd etmişdir ki, ksantin bəzi hallarda timin ilə cütləşə bilər, bu isə mutasiya əmələ gəlməsi ilə nəticələnə bilər. Bundan başqa quanin ksantinlə aminsizləşməsi vacib olmaya da bilər. Shapiro 1966-cı ildə göstərmışdır ki, azot turşusu quanin halqasının azotu ilə reaksiyaya girə bilər və onu 2-nitroinozinə çevirə bilər.

Azot turşusunun təsiri ilə sitozinin urasilə aminsizləşməsi nəqliyyat RNT-si təcrübələrində sübut edilmişdir. Qlütsidin n-RNT-sinin eks kodunu USS üçlüyüne malikdir.

## Fəsil 2

### EUKARIOT ORQANİZMLƏRİN HÜCEYRƏ TSİKLİ

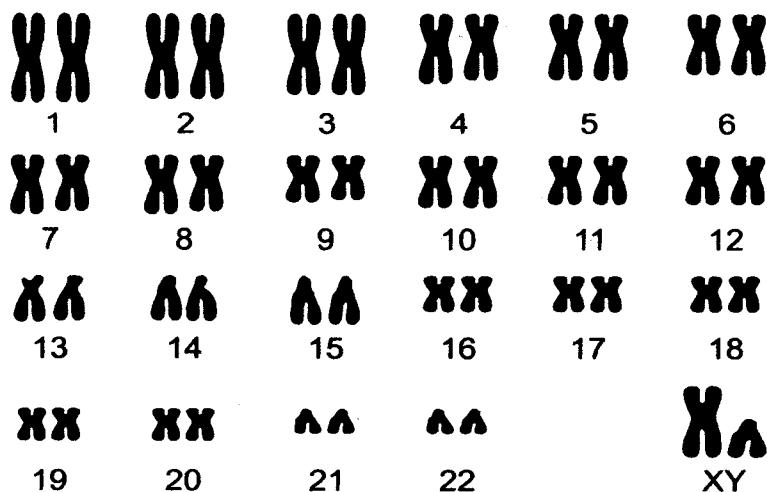
Məlumdur ki, genetik aparatda əmələ gələn pozulmların öyrənilmə metodu, bölünən hüceyrələrdə baş verən proseslərin tədqiq edilməsinə əsaslanır.

Hüceyrələrin bölünmə prosesi və onların molekulyar mexanizmi ətraflı olaraq bir sıra dərsliklərdə, monoqrafiyalarda, icmallarda, praktiki məşğələlərə dair təlimatlarda geniş işıqlandırılmışdır (Atabəyova, Ustinova, 1967; Veselovski 1969; Altşuler, Polyakov 1969; Troşin və b., 1970; Pauşeva, 1970, 1980; Slyusarev 1970; *Padulla et all* 1974; *Reinert Holtzez*, 1975; Karuzina 1976; *Baserga* 1076; *Prescott* 1976; *Gost, Gifford*, 1976; Vatti, Tixomirova, 1979; Darlington, Lakur, 1980; Stent, Kelindar, 1981 və b.; Babayev, Məcidov, 2006). Dərs vəsaitinin bu bölməsində əsas məqsəd, qısa da olsa, somatik hüceyrələrin mitotik tsiklinin ardıcıl mərhələlərində və müxtəlisif dövrlərində baş verən proseslərin molekulyar mexanizmini tədqiq etmək üçün istifadə edilən sitogenetik metodlarla tanış olmaqdan ibarətdir.

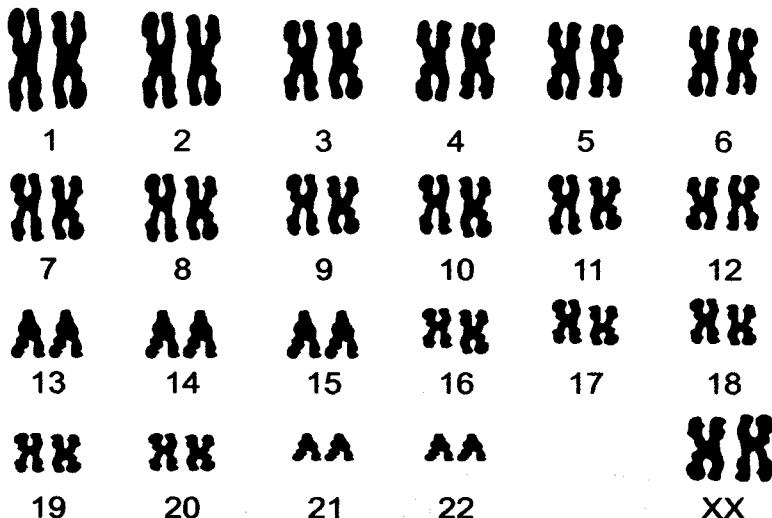
Hər bir orqanizmin daxil olduğu növün somatik hüceyrəsinin nisbi sabit xromosom sayı vardır. Xromosomların sayı, forması, daxili quruluşları və s. hər bir növ üçün sabittir. Hər bir sistematik qrupa daxil olan heyvan və bitki növlərinin somatik hüceyrələrindəki xromosom sayına kariotip deyilir (şəkil 2.1).

Canlı orqanizmin elementar, quruluş və funksiya vahidi olan hüceyrələr, öz mövcudluğunu fasiləsiz olaraq, bölünmə yolu ilə ana hüceyrələrin quruluş və funksiyasına uyğun olan iki qız hüceyrənin əmələ gəlməsi ilə saxlayır. Mitozun

Kişinin normal kariotipi



Qadının normal kariotipi



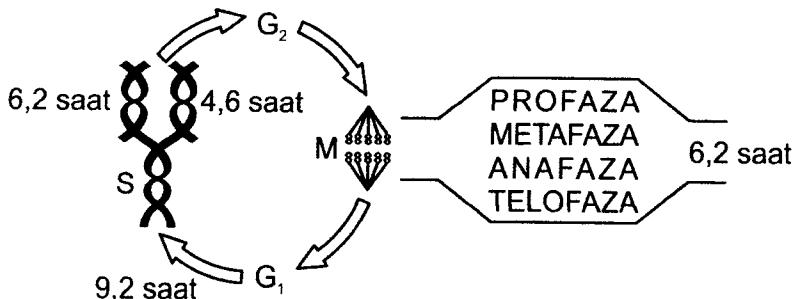
Şekil 1.1. İnsanın kariotipi

mürəkkəb və qanuna uyğun mexanizmi, xromosomlarda genetik materialın (DNT) müəyyən və bərabər miqdarda paylanması, uzun müddətli bioloji təkamül prosesi nəticəsində qazanılmışdır. Mitozun baş verməsi üçün yalnız iki-ləşmə qabiliyyətinə malik olan xüsusi quruluş vahidi – xromosomun mövcud olması kifayət olmayıb, eyni zamanda xromosomların qütblərə çəkilməsini təmin edən mitotik aparatın da olması vacibdir.

Hüceyrənin bir bölünməsindən növbəti bölünməsinə qədər və iki qız hüceyrənin əmələ gəlməsi ilə qurtaran proseslərin cəminə *mitotik tsikl* deyilir. Mitotik tsikl haqqında təlim, Horvard və Pelk (Horvard, Pelk, 1953) tərəfindən radioavtoqrafiya metodu ilə  $P^{32}$  izotopunun at paxlasının kökcüyünün meristem hüceyrələrindəki DNT-yə qoşulmasını tədqiq edən zaman meydana gəlmişdir. Onlar ilk dəfə olaraq göstərmişlər ki, interfazada DNT-nin sintezi müəyyən dövrü əhatə edir. Hüceyrə nüvəsi mitoz zamanı ardıcıl olaraq 5 faza – interfaza, profaza, metaphaza, anafaza və telofaza dövrü keçirir. Bu fazalarda bir-biri ilə əlaqədar olan və hüceyrələri bölünməyə hazırlayan proseslər (DNT-nin və xromosom materialının ikiləşməsi, xromosomların fiziki vəziyyətinin dəyişməsi, kimyəvi tərkibinin qurulması və s.) ardıcıl olaraq molekulyar səviyyədə gedir. Bunlar isə öz növbəsində hüceyrələrin bölünməsi zamanı bacı xromatidlərin qütblərə çəkilməsi, sitoplazmanın bölünməsi və bütövlükdə iki yeni hüceyrədə iki nüvənin əmələ gəlməsi ilə nəticələnir (Meziya, 1963; Sanyev, Markov, 1964; Yepisanova, 1967).

İnterfaza – telofazada nüvə membranı əmələ gəldiyi dövrdən başlayaraq, növbəti profaza mərhələsinə qədər nüvə xarici quruluşuna görə sakitlik vəziyyəti alır ki, buna *interfaza dövrü* deyilir. Bu dövr, onda baş verən metabolik

proseslərdən asılı olaraq 3 dövrə: sintezdən əvvəl ( $G_1$ ), sintez ( $S$ ), sintezdən sonra ( $G_2$ ) bölünür (şəkil 2.2).

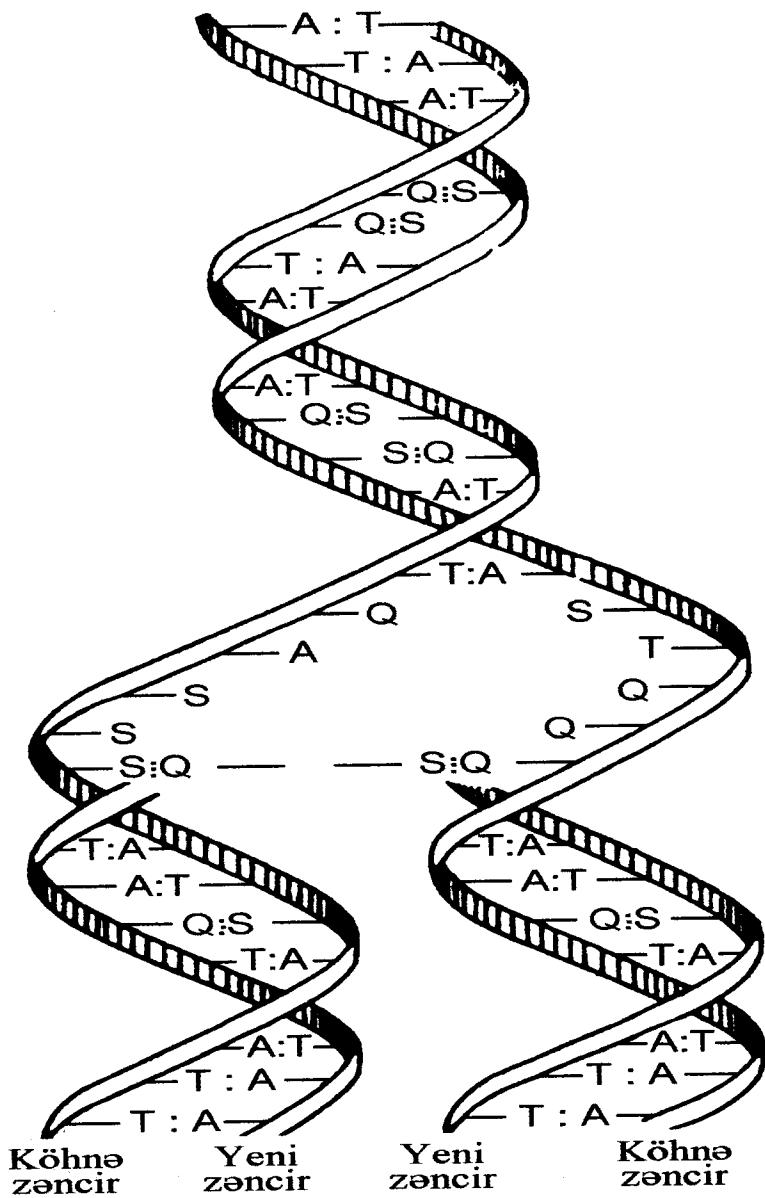


**Şəkil 2.2. Mitotik tsiklin sxemi (Fazanın Tsikli Hela-nun xərçəng xəstəliyinə tutulmuş bölünən hüceyrələri üçün göstərilib)**

İnterfazanın sintezdən əvvəlki dövrü uzun müddətli olur ki, burada hüceyrənin böyüməsi, sitoplazmanın bütün makromolekulyar komponentlərinin ikiləşməsi, DNT-nin sintezi üçün biokimyəvi hazırlıq prosesi və s. baş verir. Bu dövrdə geniş fəaliyyəti nəticəsində xromatinin matris aktivliyi yüksəlir, nukleotidlərin, amin turşularının, fermentlərin, enerji mənbəyi olan maddələrin, m-RNT-nin və s. sintezi və toplanması artır. Mitoxondrilərdə hüceyrələrin bölünməsi üçün enerji toplanır. Sitoplazmada RNT və DNT-nin tərkibinə daxil olan 4 tip nukleotid DNT-molekulunu parçalayan dezoksiribonukleaza fermenti və s. əmələ gəlir.

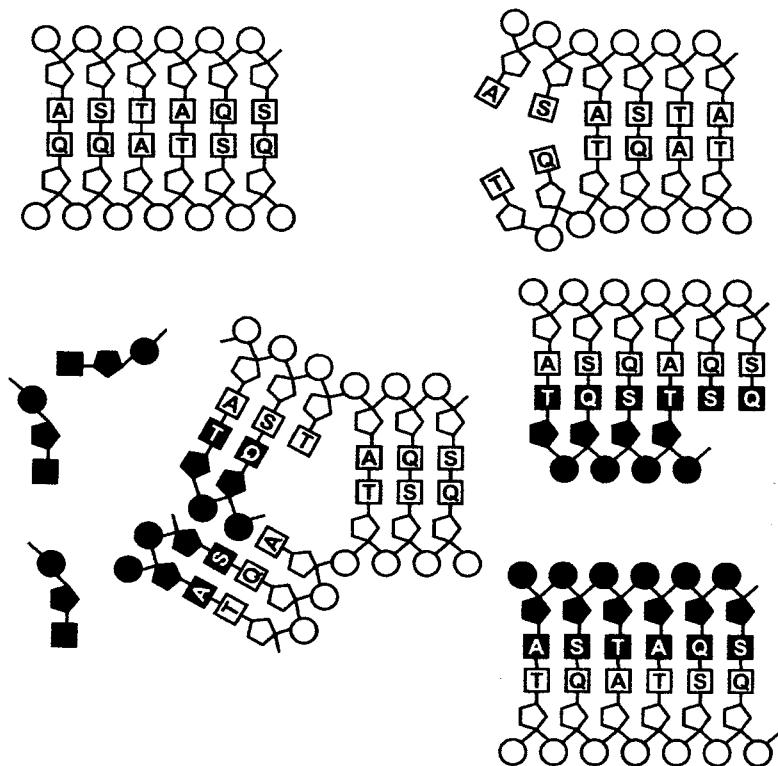
Hüceyrə bu dövrdə ətraf mühitin dəyişən şəraitinə çox həssas olur ki, bu dəyişkənliliklər yuxarıda göstərilən fermentlərin və DNT-sintezinin pozulmasına səbəb ola bilər.

Mitotik Tsiklin  $S$  – mərhələsində adından göründüyü kimi ( $S$ -sitesis) DNT-miqdarının ikiləşməsi baş verir ki, bu da DNT-nin replikasiyası, yəni komplementarlıq prinsipinə əsasən, hər bir zəncirin öz surətini yaratmasıdır (şəkil 2.3).



*Şəkil 2.3. DNT molekulunun replikasiyası*

Dezoksiribonukleaza fermentinin təsiri ilə qoşa zəncirlər bir-birindən ayrıldıqdan sonra, polikonservativ və ya matrits üsulla replikasiya baş verir, hər bir purin və pirimidin əsasları özlərinə komplementar olan sərbəst nukleotid əsaslarını yaxınlaşdırır və onları hidrogen rabitələri vasitəsi ilə saxlayır (şəkil 2.4). Sərbəst nukleotidlər ana matrits zəncirinə daxil olaraq, DNT polimeraza fermentinin iştirakı ilə qonşu

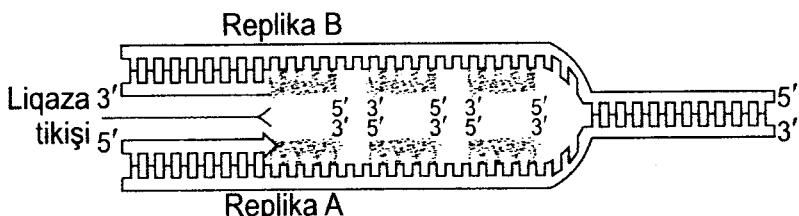


*Şəkil 2.4. DNT molekulunun sintezolunma sxemi:*

1. DNT molekulu; 2. Nukleotidlər arasında hidrogen rabitələrinin qırılması; 3. Komplementarlıq prinsipinə uyğun olaraq DNT-nin hər iki zəncirinə nukleotidlərin birləşməsi; 4. İkiləşmiş DNT molekulu bir-birinə identikdir

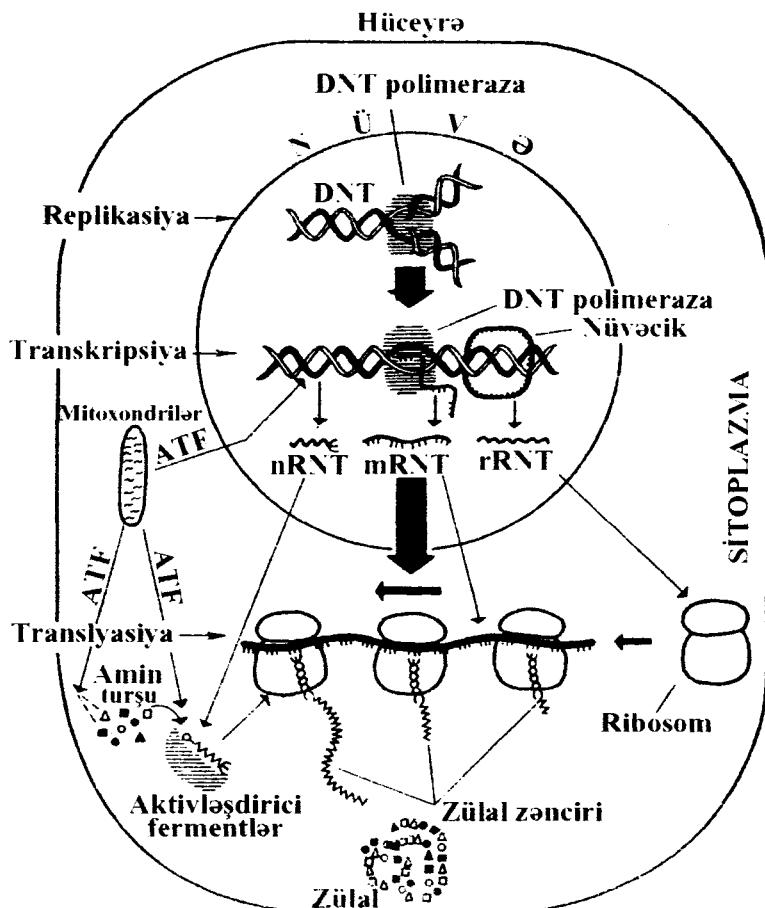
dezoksiriboza qaliqları arasında fosfodiefir rabitələri ilə tikilərək əsasların müəyyən ardıcılıqla düzülməsi nəticəsində yeni polinukleotid molekulunu əmələ gətirir. Hər iki valideyn polinukleotid zənciri boyunca komplementar zəncir sintez olunur və iki molekul DNT əmələ gəlir ki, bunların da quruluşu tamamilə iki zəncirli valideyn DNT-yə uyğun olur.

Genomun xromosom replikasiyası eyni vaxtda baş vermir, belə ki, bəziləri tez, digərləri isə gec replikasiya olunur. Xromosomun replikasiyasındaki müxtəlif vaxtlılıq xromosomun daxilində də müşahidə olunur. Xromosomun bir sahəsi artıq ikiləşmiş olduğu halda, digər sahəsi isə ikiləşməmiş olur ki, bu da «replikon» termininin meydana gəlməsinə səbəb olmuşdur. 15-60 mkm ölçüdə dəyişən və sərbəst ikiləşən xromosom sahəsinə «replikon» deyilir. Uotson və Krik modelinin molekulyar mexanizminin öyrənilməsi göstərdi ki, DNT-nin replikasiyası, qısa polinukleotid (1000-2000 nukleotid) fragmənlərinin (müəllifin familiyası ilə «Okazaki» fragməti adlanır) əmələ gəlməsi ilə baş verir ki, bu reaksiyalar DNT polimeraza fermenti ilə kataliz edilərək 5'-sonundan başlayan DNT polinukleotid zənciri 3'-in sonuna doğru istiqamətdə gedir (şəkil 2.5).



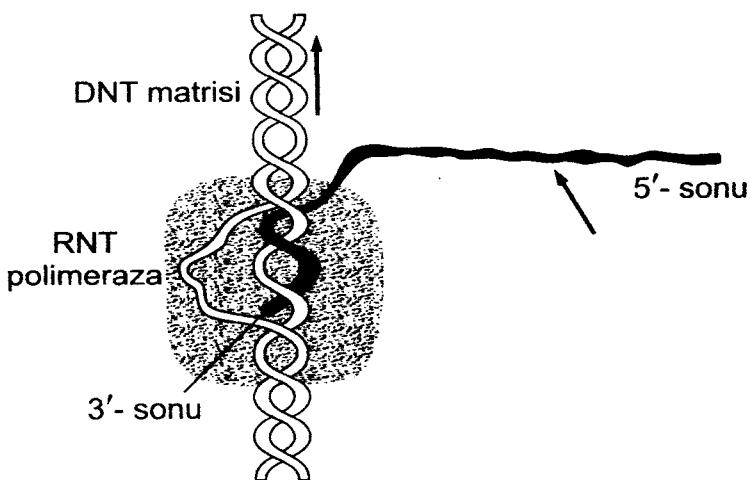
*Şəkil 2.5. DNT-nin hissə-hissə replikasiyası hipotezinin təsəvvür edilən sxemi (Okazaki et al Stend və Kelindara görə, 1981)*

DNT-nin replikasiyasının S-dövründə, nüvə və sitoplazmanın orqanoidlərinin iştirakı ilə genetik kodla proqramlaşmış RNT və zülal sintez olunur ki, onlar nüvədə yerləşən DNT molekulundan gələn məlumatlardan asılıdır. Şəkil 2.5-də DNT-nin surətinə uyğun olaraq zülalın biosintezinin sxemi və amin turşularının səhvsiz ardıcıl olaraq yiğilması göstərilmişdir.



Şəkil 2.6. Zülalların biosintези

İrsiyyətin matris nəzəriyyəsinə uyğun olaraq, zülalın sintezində baş verən proseslərin məcmusu aşağıdakı kimi təsvir olunur: DNT (transkripsiya) RNT (translyasiya) zülal (replikasiya), başqa sözlə DNT→RNT→zülal (şəkil 2.7)



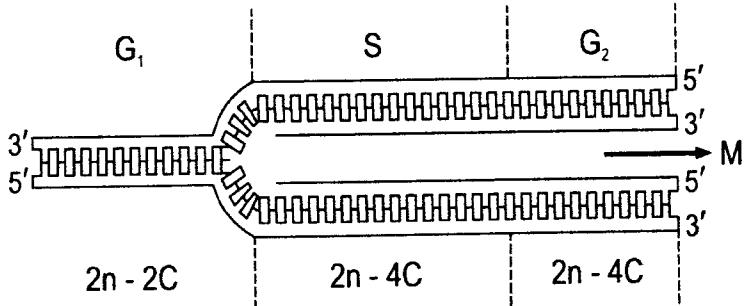
*Şəkil 2.7. DNT-nin RNT polimeraza vasitəsilə transkripsiyası. Ox işarəsi polimeraza molekulundan DNT-matrisinin keçməsi istiqamətini göstərir.*

Zülalların biosintezi haqqında «Genetika» dərsliyində (Quliyev, Əliyeva, 1981) və «Genetikadan praktikum» dərs vəsaitində (Babayev, Məcidov, 2006) ətraflı məlumat verildiyi üçün bu məsələ üzərində müfəssəl dayanmırıq.

DNT-nin replikativ sintezindən sonra, tetraploid vəziyyətində olan hüceyrə sintezdən sonrakı ( $G_2$ ) mərhələyə keçir. Bu mərhələdə hüceyrədə yenidən intensiv olaraq RNT, zülal, enerji və s. sintez olunur ki, onlardan da iy telləri qurulur. Xromosomlar artıq öz surəti olan iki xromatiddən ibarət olur ki, bunlardan hər biri DNT molekulu daşıyır.

Xromosomlar spirallaşır.

İnterfaza dövründə DNT molekulunda baş verən prosesləri sxematik olaraq 2.8-ci şəkildəki kimi təsəvvür etmək olar. Əgər növbəti bölünmədən sonra somatik hüceyrədə xromosom miqdarı diploid ( $2n$ ), DNT 2s olarsa, sintezdən əvvəlki dövrdə ( $G_1$ ), DNT-nin miqdarı sabit qalır və yalnız S dövründə DNT-nin miqdarı ikiqat artır. Hüceyrə, sintezdən sonrakı dövrə keçdikdə DNT tetraploid ( $2p$ ,  $4s$  DNT) vəziyyətdə olur.



*Şəkil 2.8. İnterfaza dövründə DNT-molekulunda baş verən dəyişilmələr (izahat mətnində verilmişdir).*

Sintezdən sonrakı mərhələdə və mitozun profaza, metafaza və anafaza dövrlərində xromosom sayı diploid ( $2n$ ) və DNT miqdarı tetraploid ( $4s$ ) sabit qalır. Nəticədə mitoz bölünmə vaxtı telofazada hər bir qız hüceyrədə xromosom sayı  $2n$  və DNT miqdarı isə  $2s$  olur.

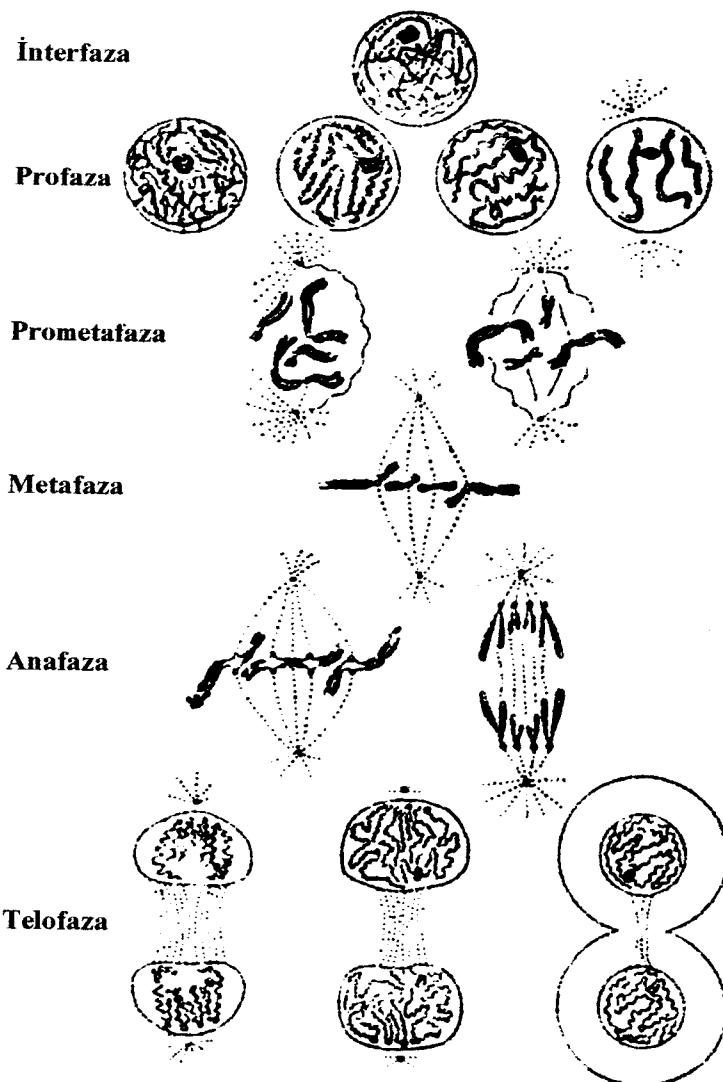
Yuxarıda qısaca da olsa təsvir olunan və interfazanın müxtəlif dövrlərində baş verən molekulyar proseslər, interfazanın müxtəlif dövrlərində ilk təsirdən yaranan xromosom aberrasiyasının mexanizmini öyrənmək üçün faydalı ola bilər.

**Mitoz.** Mitotik tsiklin bu fazasının bioloji mənası genetik materialların və bütün hüceyrə komponentlərinin qız hüceyrələri arasında bərabər miqdarda paylanmasından

işarətdir. Mitoz öz aralarında keyfiyyətcə bir-birindən fərqlənən bir neçə mərhələdən və yaxud fazalardan işarətdir. Hər bir fazada növbəti faza üçün hazırlıq işləri görülür və bu fazaların ardıcıl getməsi, xarici mühitin müəyyən şəraitində mümkündür. Mitoz aşağıdakı fazalardan işarətdir: profaza, metafaza, anafaza və telofaza.

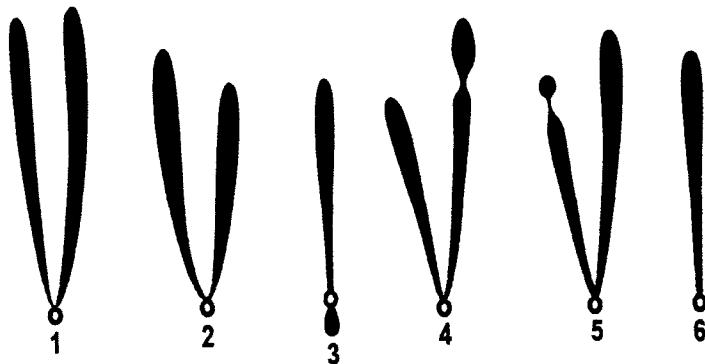
**Profaza.** Bu faza, nüvə membranının itması, mitotik aparatin formalaşması və nüvənin yenidən qurulması ilə başa çatır (şəkil 2.9), sentriollar əks qütblərə çəkilir və onların arasında iy telləri əmələ gəlir. Sentriolların qütblərə çəkilməsi erkən profaza mərhələsində baş verir və bu prosesin sonunda mitotik aparatin formalaşması başa çatır. Erkən profaza mərhələsində xromosomlar uzun və nazik sap şəklində bütün nüvə boyunca yayılmış və zəif spirallaşmış vəziyyətdə olur. Gecikmiş profazada, xromonemlərin spirallaşması nəticəsində xromosom qalınlaşır, qısalır və profazanın sonunda prometafaza mərhələsində (bəzi ədəbiyyatlarda profzanın sonu, metafazanın əvvəli prometafaza – faza kimi qeyd edilir) açıq aydın görünür. Bu dövrə nüvə qılıfı əriyir, yüksək kondensasiya etmiş xromosomlar hüceyrənin mərkəzinə toplanaraq şari xatırladır və onun daxilində mitotik aparatin formalaşması başa çatır. İy telləri bu dövrə tam formalaşmış olur və onun 2 növünü müəyyən etmək mümkündür: birincisi, bütün hüceyrə boyunca uzanaraq hər iki hüceyrə mərkəzini birləşdirir, ikincisi isə (onların sayı xromosomların sayına uyğun gəlir) bir ucu ilə sentrosoma, digər ucu ilə xromosomun sentromerinə ilişmiş olur. Artıq, maksimum spirallaşmış və kondensasiya olunmuş xromosomlar ekvatora çəkilir, bir müstəvi üzərində yerləşərək metafaza lövhəsinə əmələ gətirir. Bu mərhələdə hüceyrələrin xromosom miqdarını, strukturunu, ölçülərini uyğun olaraq təsvir və təyin etməklə yanaşı,

onların strukturunda baş veren dəyişkənlilikləri metafaza metoduna əsaslanaraq analiz etmək olar.



*Şəkil 2.9. Mitoz*

Sentromerin xromosomda yerləşmə vəziyyətinə görə xromosomların forması müəyyən edilir (şəkil 2.10) və bununla əlaqədar olaraq xromosomların aşağıdakı formalarına rast gəlinir: metasentrik – bərabər ciyinli (şəkil 2.10(1)); submetasentrik – qeyri-bərabər ciyinli (şəkil 2.10(2)); akrosentrik – ciyinlərdən biri olduqca qısa (şəkil 2.10(3)); telosentrik – ikinci ciyini görünmür və ya çox çətin müşahidə edilir (şəkil 2.10(6)). Bunlardan əlavə xromosumlarda birinci və ikinci dartılma da ola bilər ki, bu da nüvəciklərin əmələ gəlməsi ilə əlaqədardır (şəkil 2.10(4)). Buna görə də bəzi xromosomların sahələri nazik tellə əsas xromosomun sahəsindən ayrılmış olur. Bu cür ayrılmış sahə *peyk* adlanır. Peyki olan xromosom isə *peykli xromosom* adlanır (şəkil 2.10(5)).



*Şəkil 2.10. Xromosomların tipləri:*

- 1 – metasentrik; 2 – submetasentrik; 3 – akrosentrik; 4 – ikinci dartılma ilə submetasentrik; 5 – peykli; 6 – telosentrik

**Metafaza** – bacı xromatidlərin ayrılmاسının başlanması ilə tamamlanır. Xromosom daxilində əvvəlcədən ikişmiş sentromerlər ayrılır, onlardan biri iy teli ilə bir qütbə, o biri isə əks qütbə çəkilir. Bu proseslərin nəticəsində əvvəlcədən iki xromatiddən ibarət olan xromosom iki qız xromosoma

çevrilir.

**Anafaza** – bu faza qız xromosomlarının əmələ gəlməsi və qütblərə çəkilməsi ilə başa çatır (şəkil 2.9). Birinci növbədə sentromerlər aralanır, sonra isə sentromerlər və onunla birlikdə xromosomlar qütblərə çəkilir. Yeni əmələ gəlmiş xromosomların müxtəlif qütblərə çəkilmə prosesi özünün sinxronluğu və qısa müddətliliyi ilə fərqlənir. Anafazanın sonunda qütblərə çəkilən xromosomların miqdarı profazada olan xromosomların miqdarı qədər olur. Bu mərhələdə anafaza metodu ilə xromosom aberrasiyalarının analizini (xromosom və xromatid tellərini, tək və cüt fragmənləri, qütblər arasında qalan xromosomları və s.) aparmaq mümkündür.

Anafazanın sonunda qütblərə çəkilmiş xromatid sapları və xromosomların despiralizasiyası başlayır və onlar bu vaxt yaxşı görünümürlər.

**Telofaza** – mitozun bu fazası qız nüvənin yenidən qurulması, mitotik aparatın dağıılması və hüceyrənin iki yerə ayrılması ilə başa çatır (şəkil 2.9). Xromosomların morfologiyası elə dəyişir ki, yalnız çox kiçik xromatin topası görünür. Nüvə və nüvəciyin qılıfı formalaşır, qız hüceyrələrini bir-birindən ayıran membran əmələ gəlir və sitoplazmanın organoidləri təzə hüceyrələr arasında paylanır.

Beləliklə, mitozda baş verən bütün proseslər qız hüceyrənin genetik aparatının ana hüceyrənin genetik aparatına uyğun olmasını təmin etməyə yönəlmüşdir. Mitozun mexanizmi, orqanizmin milyon illər ərzində davam edən təkamülü nəticəsində yaranmış və təkmilləşmişdir. Bioloji sistemlərin hüceyrələrinin öz-özünə törəmə, tənzimetmə kimi xüsusiyyətləri mitoz prosesində öz təzahürünü tapır.

## **2.1. Spontan və induksiya mutasiyaları**

Somatik hüceyrələrin sitogenetik analizində, müxtəlif təbiətli faktorların təsiri ilə genetik aparatda spontan və ya induksion yolla əmələ gəlmış mutasiyalar tədqiq edilir.

**Mutasiya** – genetik materialın miqdarının artması və ya azalması, nukleotidlərin, onların ardıcılığının dəyişməsi ilə nəticələnən irsiyyətli dəyişkənlikdir.

Bu cür dəyişkənliyə uğramış orqanizm mutanit orqanizm adlanır. Mutant formaları müqayisə etmək üçün, təbiətdə mövcud olan yabanı tiplər klassik standart kimi qəbul edilir. Şübhəsiz ki, bu təyinat nisbi xarakter daşıyır, çünki təbiətdə mövcud olan orqanizmlər və onların genetik materialı da dəyişkəndir. Əgər təbiətdə hər hansı bir forma yabanı tip kimi qəbul olunubsa, onunla müqayisədə nəzərə çarpan istənilən irsiyyətli kənarlanmalar mutant formalar sayılır.

İnduksiya və spontan mutasiyalar arasında kəskin sərhəd qoymaq mümkün deyil. Laboratoriya şəraitində aldığımız mutasiyaların yaranmasına səbəb olan fiziki, kimyəvi amillər ətraf mühitdə mövcud olmaqla yanaşı, onlardan bəziləri orqanizmdə maddələr mübadiləsi nəticəsində də əmələ gəlir.

Buna görə də sitogenetik analizdə spontan mutasiya – fiziki, kimyəvi, bioloji amillərin təsiri olmadan genetik aparatın təsadüfi dəyişməsi kimi xarakterizə olunur.

Spontan mutasiyalar təbiətdə həmişə müəyyən tezliklə, nisbətən yaxın olan canlı orqanizmlərin müxtəlif növlərində baş verir. Spontan mutasiyaların ayrı-ayrı əlamətlərə görə meydana çıxması 10000 – qametdən 10 mln-a qədər olan qametlərdən birində baş verə bilər.

Lakin, hər bir fərddə çoxlu miqdarda gen olduğuna görə, mövcud olan bütün qametlərin (10-25%) bu və ya başqa mutasiyasını daşıyır. Qeyd etmək lazımdır ki, yeni

əmələ gələn mutasiyaların çoxu adətən ressesiv olub, orqanizmdə yalnız gizli, potensial dəyişkənliyi artırır. İrsiyət potensialı, dəyişkənlik yaşayış şəraitinin dəyişməsi nəticəsində məsələn, təbii seçmə zamanı və yaxud da resessiv mutasiya daşıyan gen homoziqot vəziyyətə düşdükdə üzə çıxa bilər.

1925-ci ildə Nadson və Filippov bakteriyalar üzərində, sonralar isə 1927-ci ildə Müller drozofil üzərində süni mutasiya almağın mümkün olduğunu göstərdikdən sonra induksion mutasiyanı inkişaf etdirilməsinin əsası qoyulmuşdur. Bu işlərin əsasında genotipdə bu və ya digər dəyişkənlik əmələ gətirən müxtəlif təbiətli mutagen maddələrin axtarışlarına başlanılmışdır. Bu günə qədər genetik aparatda dəyişkənlik əmələ gətirən çoxlu miqdarda fiziki, kimyəvi və bioloji amillər aşkar edilmişdir.

Fiziki amillərə rentgen şüalarını, ionizasiyanı, radionuklidləri, ultrabənövşəyi şüalarını, işıq fotonlarını, temperaturu, maqnit və elektrik sahəsini və s. misal göstərmək olar, kimyəvi amillərə: hidrogen peroksidi, aldehid və ketonları, azot turşularını və onun törəmələrini, müxtəlif metabolitlərin məhsullarını, ağır metal duzlarını, müxtəlif rəngləyici maddələri, aromatik birləşmələri, insektisidləri, herbisidləri, nikotini, bir sıra dərman preparatlarını, kosmetikada, yeyintidə, məişətdə istifadə olunan kimyəvi birləşmələri və s. bioloji amillərə virusları, vaksin virusunu, faqları, bakteriyaları, mikroorqanizmləri və s. misal göstərmək olar.

## 2.2. Mutasiyaların təsnifikasi

Mutasiya fərdin davranışını, fizioloji xüsusiyyətlərini və quruluşunu dəyişə bilər. Öyrənilmiş mutasiyaların çox hissəsi özünü, morfoloji quruluşun dəyişilməsində göstərir.

Hər hansı bir fermentin dəyişilməsi nəticəsində baş verən biokimyəvi mutasiyalar da mövcuddur.

Mutasiyalar dominant və ressesiv formada təzahür edə bilər. Dominant mutasiya heteroziqot halda, ressesiv mutasiya isə mutasiyaya uğramış gen homoziqot vəziyyətə keçdikdə üzə çıxır.

Fərdin həyatılık qabiliyyətinə təsirinə görə mutasiyalar: letal, yarımletal və subletal olmaqla, orqanizmin həyatılık qabiliyyətini az və yaxud çox dərəcədə aşağı sala bilər.

Mutasiya nəticəsində əmələ gəlmiş dəyişilmələr mövcud şəraitdə faydalı, neytral və orqanizm üçün zərərli ola bilər. Belə halda təbiətdə normadan kənarlanmalar təbii seçmənin nəzarəti altına düşür, uyğunlaşmayan fəndlər çıxdaş edilir və nəticədə arealda müəyyən mühit şəraitinə uyğunlaşmış orqanizmlər qalır.

Mutasiya çox hüceyrəli orqanizmlərin toxumalarının istənilən hüceyrələrində və onun müxtəlif inkişaf mərhələlərində baş verə bilər. Cinsiyyət hüceyrələrində baş verən mutasiya generativ mutasiya, somatik hüceyrələrdə baş verən mutasiya isə somatik mutasiya adlanır. Somatik və cinsiyyət hüceyrələri öz təbiətlərinə görə bir-birindən fərqlinmədiklərinə görə cinsiyyət hüceyrələrində əmələ gələn mutasiyalar somatik hüceyrələrdə də baş verir. Cinsiyyətli çoxalma vaxtı somatik hüceyrədə əmələ gələn dəyişkənliklər nəslə ötürülmür. Lakin, qeyri-cinsiyyətli çoxalan və mədəniləşdirilmiş orqanizmlərin somatik hüceyrələrində baş verən mutasiyalar nəsildə mutant əlamətlərin üzə çıxmásında və hətta onun möhkəmlənməsində böyük rol oynayır.

Xromosom mutasiyaları əmələgelmə tiplərindən asılı olaraq aşağıdakı qruplara bölünür (cədvəl 2.1):

1. *Genom mutasiyası* – bütövlükdə (poliploidiya) və yaxud ayrılıqda (heteroploidiya) xromosom sayılarının

dəyişməsidir.

2. *Xromosom aberrasiyası* – Xromosom daxili və xromosomarası dəyişkənliklər də daxil olmaqla, ayrılıqda xromosomun quruluşunda baş verən dəyişkənlikdir.

3. *Gen mutasiyası* – (nöqtəvi mutasiya) xromosomun bir nöqtəsində və yaxud lokusunda baş verən dəyişkənlikdir.

Mutagen amillər xromosomlara təsir etməklə yanaşı, həmçinin hüceyrənin sitoplazmasındaki organoидlərə, hüceyrənin funksional vəziyyətinə təsir edir ki, bu da mitotik tsiklin dəyişilməsində və hüceyrələrin bölünməsinin pozulmasında özünü göstərir.

Müəyyən mutagenin təsiri nəticəsində hüceyrədə baş verən mutasiyaların cəmi mutasiyanın spektri adlanır.

## Genom mutasiyaları

Genom mutasiyalarının təsnifatı 2.1 sayılı cədvəldə bitki obyektləri üzərində göstərilmişdir.

Xromosom sayılarının bir neçə dəfə artması – poliploidiya, təbii populyasiyalarda, xüsusən bitkilərdə geniş yayılmışdır ki, bu da təkamülün mexanizmlərindən biridir. Orqanizmdə xromosom sayının (dəstəsinin) bir və ya bir neçə dəfə artmasına poliploidiya deyilir. Bütün poliploid sıranın başlangıç xromosom sayını homoloji xromosomlardan biri təşkil edir ki, buna haploid sayı ( $n$ ) deyilir.

Ali orqanizmlərin hüceyrələrinin xromosom dəsti cüt olub diploid ( $2n$ ) adlanır ki, bunlar da ziqota hər iki valideynin qametləri ilə gətirilir. Nüvənin bölünməsinə təsir etməyən, hüceyrənin bölünməsini ləngidən maddə ilə təsir etdikdə triploid ( $3n$ ), tetraploid ( $4n$ ) və s. xromosom yiğinindən ibarət poliploidiya baş verir.

**Mutasiyaların əsas tiplərinin təsnifikasi**

Xromosom sayıının dəyişməsi (Genomda dəyişiklik)	Xromosom strukturunun dəyişməsi (Xromosom aberrasiyaları)	Gen strukturunun dəyişməsi
Poliploidiya	Anauploidiya	Nukleotidlərin itməsi Nukleotidlərin ikiləşməsi Nukleotidlərin əlavə olunması Nukleotid ardıcılılığı düzülüşünün dəyişməsi Qeyri-homoloji iki xromosom arasında sahələrin mübarizəsi
Poliplidiya	Çatışmazlıq	Xromosomun hər hansı bir sahəsinin homoloji olmayan xromosomda yeni bir nöqtəyə keçməsi
Poliplidiya	Ploidiya	Inversiya
Poliplidiya	Translokasiya	Xromosomun hər hansı bir sahəsinin 180° çevrilməsi
Poliplidiya	Duplikasiya	Xromosomun hər hansı bir sahəsinin ikiləşməsi
Poliplidiya		Xromosomun hər hansı bir sahəsinin itməsi
		Diploid xromosom dəstinin iki dəfə azalması
		Bir və yaxud bir neçə xromosomun itməsi və əlavə olunması
		Əsas xromosom sayıının (haploid) dəfələrlə artmasıdır

**Bitki poliploidlərinin təsnifikasi və onların əmələ gəlməsi mexanizmi (Qulyayevə görə, 1971).**

Poliploidiya						
Avtopoliploidlər		Allopoliploidlər		Aneuploidlər		
Əsas xromosom sayının (haploid) dəfələrlə artması nəticəsində əmələ gəlir.		Hibridlə hdiirme nəticəsində müxtəlif xromosom dəstinin birləşməsindən əmələ gəlir			Aynı-ayn xromosomların itməsi və əlavə olunması nəticəsində baş verir.	
Tetraheksaploidlər və s.	Tripental-ploidlər və s.	Amfidiploidlər	Allotri-ploidlər	Mono-somik	Nulli-somik	Trisomik
Əsas xromosom miqdərinin cüt sayla artmasıdır.	Əsas xromosom miqdərinin tek sayla artmasıdır	Iki növün cinsinin tam xromosom dəstинə malik olur.	Müxtəlif növün (cinsin) və yaxud formanın xromosom dəstинə malik olur.	Xromosom dəstində bir xromosom çatmır.	Xromosom dəstində cüt homoloji xromosomlar çatmır.	Xromosom dəstində bir xromosom artıq olur.

Əgər poliploid hüceyrələr, xromosom sayılarının bir neçə dəfə artması nəticəsində baş verərsə bu avtotetraploid, bununla yanaşı xromosomların poliploidliyi müxtəlif tip hüceyrələrin hibridləşməsi nəticəsində baş verərsə buna – *allotetraploid* və yaxud *amfidiploid* deyilir. Amfidiploid hər iki tip hüceyrənin bütün xromosom dəstinə malik olur.

Poliploidiyanın baş verməsinin 3 tipi ayırd edilir: *mitotik*, *meyotik* və *ziqotik*. Mitotik poliplodiya – somatik hüceyrələrdə baş verən pozulmalarla, meyotik poliploidiya isə meyozun pozulması nəticəsində xromosomların qütbərə qeyri-normal çəkilməsi ilə əlaqədardır. Birinci halda ikiqat xromosom dəstinə malik olan somatik hüceyrələr, ikinci halda isə diploid reduksiya olunmamış qametlər birləşib mayalandıqda xromosom sayı artıq olan orqanizmlərə başlanğıc verir.

Məlumdur ki, normal mayalanma sayesində əmələ gəlmiş ziqot əvvəlcə iki blastomerə sonra 4, 8 və i.a. blastomerə bölünür. Bu qayda ilə inkişaf prosesində orqanizmin bütün

hüceyrələri diploid sayda xromosoma malik olur. Bəzən ilk ziqot mitoz yolu ilə iki blastomerə bölünərək hüceyrələrdən birində xromosomların hamısı qalır, o biri hüceyrə isə xromosomsuz olur. Xromosomların hamısına malik olan tetraploid orqanizmlər meydana gəlir. Bu cür poliploidiya ziqotik poliploidiya adlanır.

Poliploid hüceyrələrin əmələ gəlməsi və onların süni surətdə yaradılma yolları hazırda kifayət qədər öyrənilmişdir. Təcrübələrdə poliploidiya adətən kolxitsinin və onun törəmələrinin təsiri ilə alınır. Sitotoksiki xüsusiyyətə malik olan kolxitsinin sulu məhlulu intensiv bölünən somatik hüceyrələrin iy tellərinin funksiyasına təsir edir. Nəticədə metafaza xromosomunun ayrılmış xromatidi qütblərə çəkilə bilmir və buna görə də hüceyrədə xromosomların sayı ikiləşir. Bu hadisə isə kolxitsin mitozu (C-mitouzu) adını almışdır.

Maddələr yoxlanarkən əgər onlarda kolxitsin mitozuna uyğun xüsusiyyət aşkar edilərsə, deməli maddə mitodepresiv və sitotoksik xüsusiyyətə malikdir. Asenafsten, naftalin, hidroxlorid, etilenimin və başqa kimyəvi maddələr belə xüsusiyyətə malikdirlər.

*Heteroploidiya* – (aneuploidiya) o orqanizmlərə deyilir ki, onların hüceyrələrində xromosomlar tək sayda dəyişir və nəticədə bir və ya bir neçə xromosom azala və çoxala bilər. Hüceyrələrdə diploid dəstdə homoloji xromosomlardan biri çatmazsa buna *monosomik* ( $2n-1$ ), əgər iki homoloji xromosom çatmazsa – *nullisomik* ( $2n-2$ ) deyilir. Hüceyrədə ümumi xromosom sayından biri artıq olarsa trisomik ( $2n+1$ ), ikisi artıq olarsa tetrasomik ( $2n+2$ ) adlanır.

Xromosomların düzgün paylanmaması ilə əlaqədar olaraq aneuploid orqanizmlər mitozda və meyozda əmələ gələ bilər. Heteroploidiyanın əmələ gəlməsi adətən, cinsiyət

hüceyrələrinin bölünməsinə təsir edir ki, nəticədə bir qız hüceyrəyə hamısı, o biri hüceyrəyə isə heç bir xromosom düşmür. Belə hüceyrəyə malik qametlər normal xromosom dəsti olan hüceyrə ilə mayalandıqda birinci halda trisomik, ikinci halda isə monosomik əmələ gəlir.

Xromosom sayılarının çatışmazlığı və artıq olması, orqanizmin normal inkişafı və funksiyası üçün sintez olunan maddələrin nisbətinə təsir göstərir. Xromosom sayılarının çatışmazlığı və artıq olması inkişafda müəyyən əlamətlərin dəyişməsinə səbəb olur ki, bu da özünü fenotipdə göstərir.

Fərdləri müqayisə etməklə xromosom cütlərinin artıq olmasının və çatışmamasının genotipdə rolunu müəyyənləşdirmək olar.

Təcrubi işlərdə genom mutasiyalarının tez müəyyən edilməsi üsulunun böyük əhəmiyyəti vardır. Xromosom sayılarının analiz edilməsində tətbiq edilən sitogenetik üsul daha əlverişlidir. Tədqiqat işlərinin məqsədindən asılı olaraq, somatik və yaxud generativ üzvlərdən preparat hazırlanaraq kariotip analiz edilir.

### **2.3. Xromosom aberrasiyaları, onun mexanizmi və təsnifatı**

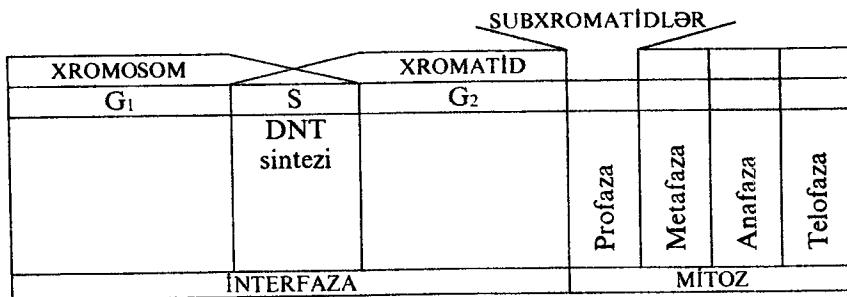
Mikroskopda görünən xromosom dəyişkənliliklərinə xromosom mutasiyası və yaxud aberrasiyaları deyilir və onlar quruluşlarının dəyişməsindən asılı olaraq bir neçə yarımgrupa bölünür.

Gözlə görünməyən, özünü fenotipdə göstərən xromosom strukturunda əmələ gələn mutasiyaya gen və yaxud nöqtəvi mutasiya deyilir.

Əgər gen mutasiyası bir gen daxilindən kənara çıxmayıb, DNT molekulunun kiçik bir sahəsinin dəyişilməsi kimi

əmələ gəlirsə, onu işıq mikroskopunda ayırd etmək mümkün olmadığı halda, xromosom strukturunda baş verən dəyişikliklər xromosomun böyük bir sahəsini əhatə edərək morfologiyasında müəyyən dəyişkənlik əmələ gətirir ki, onu da işıq mikroskopunun köməkliyi ilə analiz etmək olur.

Xromosom dəyişkənliklərinin əmələ gəlməsində baş verən molekulyar proseslər haqqındaki əsaslandırılmış fikirlərdən biri ondan ibarətdir ki, onların strukturunun əsasında bir ədəd dərtilmiş DNT molekulu durur. Mitotik tsikl mərhələsində xromosomlar bir və iki saplı fazanı keçir və nəticədə iki xromatiddən təşkil olunur. Xromosom strukturunun dəyişilməsinin əsasında duran, struktur dəyişkənliklərinin xarakteri və uyğun olaraq molekulyar mexanizmi bu və ya digər mutagen amillərinin təsiri zamanı xromosomların hansı vəziyyətdə olmalarından asılı olaraq bir-birindən fərqlənə bilərlər (şəkil 2.11).



*Şəkil 2.11. Xromomsomların vəziyyətindən asılı olaraq onlara təsir zamanı baş verən dəyişilmələr (Pisaryeva görə, 1968)*

Əgər ilk zədələnmə vaxtı xromosom mitoz mərhələsində bir sapdan ibarətdirsə, zədələnmiş lokusda bütün xromosomlar yenidən qurulur və nəticədə xromosom dəyişilmələri əmələ gəlir. Əgər ilk zədələnmə vaxtı iki sapdan ibarətdirsə

onda zədələnmə lokusunda hər bir xromatid ayrılıqda yenidən qurulur və nəticədə xromatid dəyişkənlilikləri əmələ gəlir. Hüceyrəyə müxtəlif təsirlər zamanı xromosomlar DNT-nin sintezi mərhələsindədirse, onda bir hüceyrədə xromosom və xromatid dəyişilmələri baş verə bilər. Bu onunla əlaqədardır ki, DNT-nin sintezi, hüceyrənin bütün xromosomlarında və onun bütün hissələrində eyni vaxtda getmir. Belə ki, xromosomun ayrı-ayrı fragmentləri bir və iki sap mərhələsində ola bilər. Ona görə də ikiləşmə mərhələsindən gecikən xromosomların lokusunda xromosom dəyişilmələri, ikiləşmişlərdə isə xromatid dəyişilmələri baş verir.

Xromosom tipli dəyişkənliliklər, xromosom iki effektli sap şəklində olan vaxtda əmələ gələ bilər. Təsir edən mutagen amilin gücü zəif olarsa, xromosom dəyişilmələrinin əmələgəlmə ehtimallığı az, əksinə təsir edən mutagen amilin gücü yüksək olarsa, bu vaxt xromosom dəyişilmələrinin əmələgəlmə ehtimallığı çox ola bilər. Komplementar saplardan birində bir zərbənin təsiri nəticəsində bir qırılma olarsa, bu zaman xromatid dəyişilmələri əmələ gəlir. İki sapda zədələnmə arasındaki məsafə 1000 nukleotid olarsa iki zərbəli təsirdən xromosom dəyişkənliliyinə uyğun olan izoxromatid dəyişkənlüyü baş verə bilər. Belə dəyişilmələrin xromosom dəyişilmələrindən xarakterik fərqi ondan ibarətdir ki, bir sıra hallarda xromatidlərin proksimal və distal uclarının birləşməsi müşahidə edilir.

Beləliklə, xromosomların morfoloji quruluşunu analiz edərək, mutasiyanın DNT-nin sintezinə qədər, DNT-nin sintezi dövründəmi, sintezdən sonrakı, xromatidlərin tək və cüt olduğu vaxtda baş verdiyini müəyyənləşdirmək olur. Xromosomda zədələnmə DNT-nin sintezinə qədər baş

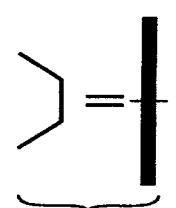
veribsə (reperasiya sistemi ilə bərpa olunmayıbsa) onda xromosom replikasiya vaxtı ikiləşcək və mutasiya hər iki xromatidin eyni lokusunda oxşar dəyişiklik əmələ gətirəcək. Xromatid tipli dəyişikliyin əmələ gəlməsi onu göstərir ki, mutasiya DNT-nin sintezi dövründə və yaxud ondan sonrakı dövrə xromosomun bir xromatidinə toxunmuş olur.

Hər iki xromosom və xromatid tipli dəyişiklik öz növbəsində, xromosomdaxili və xromosomarası dəyişilmələrə ayrılır. Xromosomdaxili dəyişkənlik (intramübadilə) bir xromosomda fragməntlərin qırılması, onun itməsi və yaxud xromosom sahələrinin ikiləşməsi, təkrar olunması və eyni zamanda genlərin xromosomlarda yerləşmə qaydasının pozulması nəticəsində meydana gəlir. Xromosomarası dəyişkənliklər (intramübadilə) isə qeyri-homoloji xromosomların hissələri arasındaki mübadilə nəticəsində ilişikli genlər qrupunun yerləşmə qaydasının dəyişməsindən əmələ gəlir.

Hüceyrələrdə bu və ya başqa sahələrin kombinasiyasiyının baş vermə prinsipi mahiyyət etibarı ilə xromosom və xromatid dəyişkənlikləri üçün eynidir. Xromosomdaxili və xromosomarası kombinasiyaların əmələ gəlmə mexanizmi xromosom dəyişkənliklərinin əmələ gəlməsi haqqındaki klassik hipotezə uyğun olaraq aşağıdakı kimidir. Hər hansı bir induksiyadıcı amilin təsirindən xromosom qırılır və qırılmış sahə bir neçə müddət «yapışqanlı» vəziyyətdə olur. Bu halda müxtəlif ehtimallıqla aşağıdakı hadisələrdən biri baş verə bilər (şəkil 2.12).

- a) qırılmış yer «sağalar» və yenidən uclar köhnə qayda üzrə birləşirlər;
- b) qırılmış yer «sağalmır» və nüvədə xromosom qırıqları – fragməntlər əmələ gəlir;

### 1. Fragmentin bərpası



Qırılma baş  
vermişdir.



Xromosom  
fragmentlərə  
ayrılmışdır.



Fraqment  
birleşmişdir.

### 2. Fragmentin itməsi

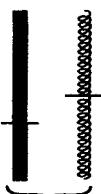


Bir xromosomda  
iki qırılma baş  
vermişdir.

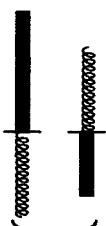


Fraqmentin kənarları birləşmiş,  
orta hissə isə ayrılmış və şübhə-  
siz ki, növbəti bölünmələrdən  
birində itəcəkdir.

### 3. Translokasiya



İki xromosomun hər  
birində bir qırılma  
baş vermişdir.



Qırılmış xromosomlar  
arasında hissələri ilə  
mübadilə getmişdir.

*Şəkil 2.12. Rentgen şüalarının təsiri ilə xromosom qırılmaları (Auerbaxa görə, 1968).*

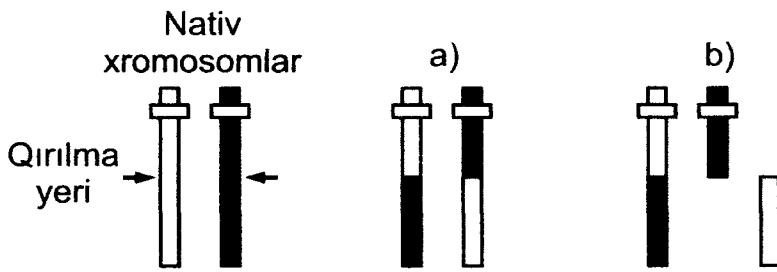
c) xromosomda iki zədələnmə nəticəsində qırılmış hissələrin sonu birləşir, orta hissə isə düşür – xromosom hissəsininitməsi baş verir. Bu halda, düşmüş fragment «yapışqanlı» kənarları ilə birləşib halqa əmələ gətirir;

ç) əgər eyni bir hüceyrədə bir neçə qırılma baş verərsə, xromosomda baş verən zədələnmələrin sayından və zədələnmiş xromosomların miqdardından asılı olaraq, qırılmış uclar müxtəlif inter və intra mübadilə əmələ gətirə bilər. İki zədələnmiş xromosom arasındaki mübadilə – translokasiya 2.12-ci şəkildə verilmişdir.

Müstəsna hallarda zədələnmə sentromerdə olur, xromosom qırılır və nəticədə fragməntlər əmələ gəlir ki, onlardan da biri sentromerli olur. Sentromeri olan fragməntə sentrik, qalanlarına isə asentrik deyilir. Əgər asentrik fragmənt sentrik fragmənlə birləşməyibsə, mitozda iştirak edə bilməyib, hüceyrədə qalır və sonra tədricən itir. Sentrik fragmənt adı xromosom kimi hüceyrə bölünməsində o zaman iştirak etmir, simmetrik fragməntin yapışqan ucu, başqa bir simmetrik fragməntin həmin ucu ilə birləşmiş olsun. Sentromerlə əlaqə pozularsa hüceyrədə sentromersiz fragməntlər iki, üç və daha çox sentromerli xromosomlar əmələ gəlir.

Asimetrik adlanan belə struktura malik olan dəyişkənliklər, demək olar ki, mitozda iştirak etmir və yaxud bir neçə bölünmə ərzində tədricən itir. Sentromer pozulmadan xromosom sahələrinin yerdəyişməsi ilə əlaqədar olan struktur mutasiya, simmetrik dəyişkənlik adlanır. Simmetrik dəyişkənliklərə malik xromosomlar ikiləşmə qabiliyyətini saxlamaqla, hüceyrə bölünməsində düzgün paylanırlar. Ona görə də belə dəyişkənliklərə əlaqədar olan əlamətlər nəsildən-nəslə verilir.

Xromosomarası dəyişkənlik – xromosomun qırılmış sahələri arasındaki inter mübadilə tam və yaxud qeyri-tam ola bilər (şəkil 2.13).



Şəkil 2.13. Xromosom sahələri arasında tam (a) və natamam (b) mübadilə.

Birinci halda bütün fragmənlər «yapışqan» ucları ilə birləşərək müxtəlif kombinasiyalar əmələ gətirirlər, ikinci halda isə onların hamısı birləşməyib, hüceyrədə sərbəst qalırlar.

#### 2.4. Xromosom tipli dəyişilmələr

Metafaza və anafaza mərhələlərində müşahidə edilən geniş yayılmış xromosom tipli mübadilə sxematik olaraq 2.14-cü şəkildə verilmişdir.

Metafaza və anafaza üsullarının özünə məxsus bir sıra üstünlükleri və çatışmazlıqları vardır.

Tədqiqatçıların fikrinə görə hər iki metodun nəticələri keyfiyyətcə və kəmiyyətcə bir-birinə yaxın olur. Xromosom dəyişilmələrinin öyrənilməsində istifadə olunan metafaza metodu obyektiv, dəqiqlik metod olub, xromosom dəyişilmələri haqqında düzgün məlumat verir. Lakin, o, morfoloji cəhətdən bir-biri ilə kəskin fərqlənən, az sayda xromosому olan obyektlərin öyrənilməsi üçün faydalıdır. Analizin sadəliyinə və vaxtin qənaətciliyinə görə anafaza üsulunun üstünlüyünə baxmayaraq, bu üsulun bir sıra çatışmazlıqları vardır. Xüsusi anafaza hüceyrələrində simmetrik xromatid və xromosom mübadiləsinin bir hissəsi gizli qalır və analizə yaramır.

Dəyişilmələrin tipləri	G <sub>1</sub> -də zədələnmə	G <sub>2</sub> -də mübadilə	Dəyişilmələr	
			metafaza	anafaza
Tam asimmetrik xromosom translokasiyası				
Qeyri-tam asimmetrik xromosom translokasiyası/asentrik fragmətlərin birləşməsi				
Qeyri-tam asimmetrik xromosom translokasiyası/asentrik fragmətlərin birləşməsi				
Tam simmetrik xromosom translokasiyası				
Qeyri-tam simmetrik xromosom translokasiyası				
Xromosom həlqəsi /asentrik/				
Birləşməmiş fragmətlər				
Xromosom həlqəsi /sentrik/				
Bacı xromatid mübadiləsi nəticəsində tek həlqənin əmələ gəlməsi				

**Şəkil 2.14.** Metafaza və anafazada nəzərə çarpan xromosom aberrasiyaları, oxlar – xromosomların zədələnməsini, strixlər – fragmətlərin birləşmə sahələrini göstərir.

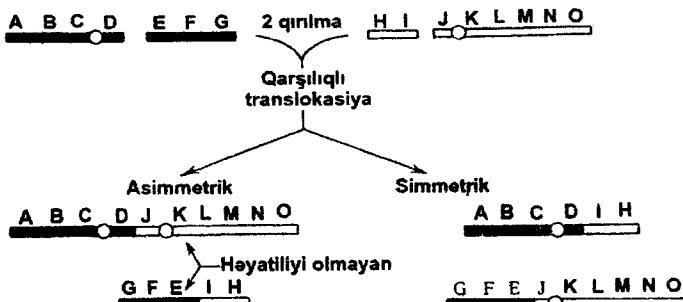
Xüsusi tip zədələnmələr mövcuddur ki, onlar bir və yaxud hər iki xromatidə təsir edərək və qırılmalardan asılı olmayaraq, xromatidlərin bütövlüyünü pozmur. Belə tip zədələnmələr dar və yaxud axromatin sahəsindəki boşluqdur. Metafaza plastinkalarında axromatin sahədə olan boşluqları həqiqi qırılmalardan fərqləndirmək çətin olur. Eyni zamanda anafaza hüceyrələrində boş yerlər həqiqi qırılmalardan fərqli olaraq, asentrik fraqmentlər əmələ gətirmir, bu isə özünü anafaza və metafaza hüceyrələrində xromosom dəyişkənliklərinin hesablanması vaxtı alınan nəticələrin müqayisəsində göstərir.

Metafaza metodunun çatışmazlıqlarından biri də mətiellərin fiksasiyadan əvvəl mitotoksin (kolxitsin, kolsemdir, vinkristin və s.) maddələrlə işlənməsidir ki, həmin maddələr özlərinin spesifik təsiri ilə iy tellərinə təsir edərək, hüceyrələri metafaza mərhələsində saxlayır və metafaza hüceyrələrinin toplanmasına səbəb olur. Mitotik zəhər olmaqla yanaşı onlar eyni zamanda mutagen xassəyə də malikdirlər ki, bu da alınan nəticələrin obyektiv qiymətləndirilməsində müəyyən çətinliklər törədir. Anafaza metodunda isə analiz olunan hər bir preparatda həmişə anafaza hüceyrələri olduğu üçün, metafaza metodundan fərqli olaraq, burada fiksasiyadan əvvəl, mitotoksin maddələrlə işləməyə ehtiyac qalmır.

Maddələrin toksikilik keyfiyyətinin və xromosom dəyişkənliklərinin spektrini analiz etmək üçün tədqiqat işlərində hər iki metodun tətbiqi və alınan nəticələrin müqayisəsi vacibdir.

Qeyd edildiyi kimi, xromosom tipli dəyişkənliklər bir hüceyrədə iki və daha çox xromosom qırılmalarından əmələ gələn və bir-birinə yaxın yerləşən fraqmentlərin yenidən birləşməsindən yaranır. Xromosom tipli dəyişkənliklər interfazanın presintetik dövründə ( $G_1$ ), xromosom bir effektli sap vəziyyətində olanda əmələ gəlir.

Xromosom sahələrinin müxtəlif kombinasiyalarından əmələ gələn dəyişkənliliklərin aşağıdakı xromosom tipli aberrasiyaları ayırd edilir (şəkil 2.15):



**Şəkil 2.15. Xromosomdaxili dəyişilmələr:**

1 – Homoloji xromosomların ilkin cütü; 2 – Delesiya; 3 – Duplikasiya;  
4-5 – İversiya; 6 – Translokasiya; Xromosomların bütünə hissələrinin  
fragmentasiyası (fragməntlər)

1. *Delesiya* (çatışmazlıq) – gen olan bütöv xromosom sahəsinin fragmentasiya nəticəsindəitməsi və yaxud düşməsidir. Sentromeri olan sentrik fragmənt *proksimal*, sentromeri olmayan isə *distal* adlanır. İki qırılma nəticəsində baş verən xromosom və yaxud xromatiddaxili çatışmazlıq interstisiyal delesiya, uclarda çatışmazlıq olduqda isə terminal delesiya və yaxud defişens adlanır.

2. *Duplikasiya* – xromosom sahələrinin ikiləşməsi (fragmentin genetik materialının təkrarı). Duplikasiya homoloji xromosomların uyğun sahələrinin hesabına baş verir.

3. *İversiya* – xromosomun iki nöqtədə qırılması və ayrılmış fragməntlərin  $180^{\circ}$  çevrilməsi ilə yapışqan ucların yenidən birləşməsi nəticəsində xromosom sahəsinin  $180^{\circ}$  çevrilməsindən əmələ gələn dəyişkənlilikdir. Bu halda fragmənt əks vəziyyətdə olur. İversiya parasentrik və perisen-

trik ola bilər. Əgər xromosomun  $180^{\circ}$  çevrilmiş fragmətində sentromer varsa o parasentrik və əksinə sentromersizdir sə perisentrik inversiya adlanır. Perisentrik inversiyada qırılma sentramerlərdən yanarda hər iki ciyində olmalıdır.

4. *Translokasiya* – qeyri homoloji xromosomların sahələri arasında yerdəyişmə və yaxud mübadilə vaxtı ilişikli gen qrupunun dəyişməsidir.

Delesiya və duplikasiya vaxtı genetik materialın miqdari dəyişir, inversiyada və translokasiyada isə genetik materialın miqdari əvvəlki kimi sabit qalır, yalnız onun vəziyyəti dəyişir. Lakin, inversiya vaxtı xromosumlarda genlərin yerləşmə qaydası dəyişir, translokasiyada isə ilişikli gen qrupları dəyişir, daha doğrusu yerini dəyişmiş gen başqa xromosomda yeni ilişikli qrupa düşür və nəticədə normal genotipin dəyişməsinə səbəb olur.

Metafaza və anafaza preparatlarında analiz olunan xromosom dəyişkənliliklərinin tipləri, xromosumlarda qırılmağın yeri, miqdari və eyni zamanda zədələnmiş xromosolların miqdarı ilə təyin olunur. Zədələnmələrin miqdarından asılı olaraq, müxtəlif miqdarda səthi zədələnmələr əmələ gəlir. Səthi zədələnmələr yüksək birləşmə qabiliyyətinə malik olmaqla xromosomları əvvəlki morfoloji vəziyyətə qaytarır və ya mümkün olan xromosom dəyişkənliliklərini əmələ gətirir.

Aşağıda zədələnmiş xromosom sahələrinin normal birləşməsi nəticəsində onun morfologiyasının bərpa olunması halları müstəsna olmaqla, xromosomdaxili və xromosom-arası mümkün olan dəyişkənliliklərin tipləri verilmişdir.

I. Xromosomun ciyinlərində birində bir qırılmadan ayrılmış distal uc mitozda cüt asentrik fragmənt ola bilər. Xromosom ciyinlərinin hansında qırılma əmələ gəlməsindən asılı olaraq qısalır və terminal delesiya əmələ gəlir (şəkil 2.16).

	G <sub>1</sub>		S+G <sub>1</sub>	metafaza	anafaza
a	{		{ } T	X	X    =
b	1 { 2 . 3 { 4 }	1 { 2 { 3 { 4 } T	1 { 2 { 3 { 4 } 0 3	0	0    =
c	1 { 2 . 3 { 4 }	1 { 2 { 3 { 4 } T	1 { 2 { 3 { 4 } 0 3	0	0    =
d	1 { 2 . 3 { 4 }	1 { 2 { 3 { 4 } T	1 { 2 { 3 { 4 } 2 { 3 }	X	X    =
e	1 { 2 . 3 { 4 }	1 { 2 { 3 { 4 } T	1 { 2 { 3 { 4 }	X	X =
f	1 { 2 . 3 { 4 }	1 { 2 { 3 { 4 } T	1 { 2 { 3 { 4 } 2 { 3 }	X	X    =

**Şəkil 2.16.** Bir xromosomda bir zədələnmədən (a) və xromosomun çiynində iki zədələnmədən xromosom dəyişkənliliklərinin əmələ gəlməsi

**II.** Bir xromosomda 2 qırılmadan yaranan dəyişkənliyin tipi, qırıqların bir ciyindən və yaxud iki ciyindən eyni vaxtda əməl gəlməsindən asılıdır. Əgər qırılma xromosomun iki ciyində baş veribsə onda aşağıdakılardan əmələ gəlir (şəkil 2.16(b)).

b) Sentromer sahələrin tam mübadiləsi ilə sentrik həlqənin və öz aralarında terminal fragmetlərin birləşməsindən sentromersiz sahələrin əmələ gəlməsi.

c) Sentromer sahələrin qapanaraq həlqə əmələ gətirməsi və öz aralarında birləşməmiş iki sentromersiz terminal fragmetlərin əmələ gəlməsi ilə qeyri-tam mübadilə.

c) Xromosomun qısalmış sentromer sahələri arasında qeyri-tam mübadilə və terminal fragmentdən ibarət sentromersiz sahənin əmələ gəlməsi.

d) Sentromer sahənin  $180^\circ$  dönməsi ilə tam mübadilə (perisentrik inversiya). Bu halda xromosomun bütövlüyü saxlanılır, lakin genlərin yerləşmə qaydası dəyişir.

e) Sentromer sahənin  $180^\circ$  dönməsi ilə qeyri-tam mübadilə (perisentrik inversiya) və terminal delesiyanın əmələ gəlməsi xromosom ciyinin uc delesiyasının ikiləşməsindən qarışiq sentromerə və cüt fragmetə malik qısalmış xromosom əmələ gəlir.

**III.** Xromosomun bir ciyində iki qırılmadan aşağıdakı xromosomdaxili dəyişkənliklərin tipləri əmələ gəlir (şəkil 2.17(a-e)):

a) Xromosolların qısalması və sentromersiz sahənin qapanaraq həlqə əmələ gətirməsi ilə tam mübadilə. Xromosom qısalır və həlqə şəklində cüt fragmet əmələ gəlir.

b) Xromosolların qırılması və sentromersiz sahələrin qapanaraq həlqə əmələ gətirməsi ilə qeyri-tam mübadilə. Xromosom qısalır, cüt fragmet və cüt sentrik halqa əmələ gəlir.

	G <sub>1</sub>			S+G <sub>2</sub>	metafaza	anafaza
a	1 2 3 4)	1 2 3 4)	1 2 3 4)	2 3		
b	1 2 3 4)	1 2 3 4)	1 2 3 4)	2 3 4		
c	1 2 3 4)	1 2 3 4)	1 2 3 4)	2 3 4		
d	1 2 3 4)	1 2 3 4)	1 2 3 4)	3 2 4		
e	1 2 3 4)	1 2 3 4)	1 2 3 4)	2 3 4		
f	1 2 3 4)	1 2 3 4)	1 2 3 4)	2 3 4		

**Şəkil 2.17.** Xromosomun çiyinlərinindən birində ilk zədələnmədən xromosom dəyişilmələrinin əmələ gəlməsi.

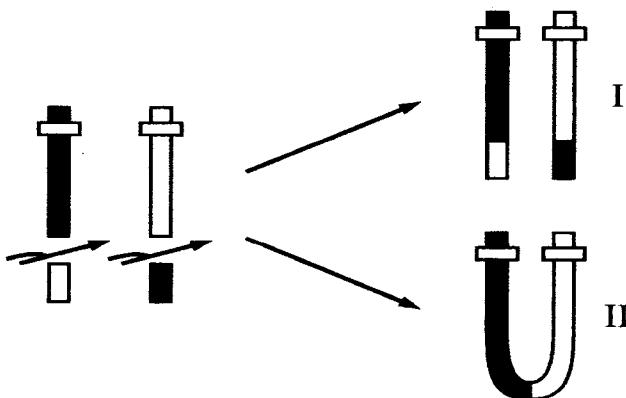
c) Xromosomun qısalması və sentromersiz sahənin itməsi ilə qeyri-tam mübadilə. Xromosom qısalır və interstitial delesiyanın ikiləşməsi ilə cüt fragmənt əmələ gəlir.

ç) Asentrik fragməntin  $180^\circ$  çevrilməsi ilə (parasentrik inversiya) tam mübadilə. Xromosomların bütövlüyü saxlanılır, ilişkili qrupların və genlərin yerləşmə qaydası dəyişir.

d) Proksimal və distal sahələr arasındaki qırılma və parasentrik inversiyanın əmələ gəlməsi ilə qeyri-tam mübadilə. İnterstitial və həlqəvi delesiyanın birləşməsi ilə cüt fragmənt əmələ gəlir və xromosom qısalır.

e) Xromosomun qırılması və sentromersiz sahənin  $180^\circ$  (parasentrik inversiya) çevrilməsi ilə qeyri-tam mübadilə. Üc delesiyanın itməsi nəticəsində cüt fragməntlər əmələ gəlir və xromosom qısalır.

IV. İki xromosomda iki dəyişkənlik nəticəsində (hər xromosomun bir ciyində) inter-mübadilə baş verir və dörd səthi zədələnmə (translokasiya) nəticəsində xromosom sahələri yenidən kombinə olunur. İntermübadilə tam, qeyri-tam, simmetrik və asimetrik tipdə ola bilər (Şəkil 2.18).



*Şəkil 2.18. İki zədələnmə nəticəsində simmetrik (I) və asimetrik (II) aberrasiya tipləri (Volfa görə, 1959).*

Asimetrik yenidən birləşmə somatik hüceyrələrin məhvini, cinsiyət hüceyrələrinin isə dominant letallığına səbəb olur. Simmetrik yenidən birləşmə zamanı distal sahələr arasında mübadilə baş verir, daha doğrusu resiprok translokasiya, yəni bir xromosom sahəsinin digər xromosomla birləşməsi, iç qırılma nəticəsində baş verir və bu duplikasiya üçün mənbə rolunu oynayır. Resiprok translokasiya inversiya kimi, adətən fenotipdə özünü göstərmir. Yalnız o effektli vəziyyətdə olanda fenotipik olaraq özünü bürüzə verir.

2.19-cu şəkildə iki xromosomda iki zədələnmə nəticəsində (hər xromosomun çiyinlərindən birində bir zədələnmə) mümkün olan mübadilə prosesləri göstərilmişdir.

a) Distal sahələrlə tam simmetrik mübadilə (resiprok translokasiya və ya seqmentlərin qarşılıqlı mübadiləsi) nəticəsində qısalmış və uzanmış xromosomlar əmələ gəlir.

b) Bir xromosomun proksimal sahəsinin ikinci xromosomun distal sahəsi ilə birləşməsi nəticəsində qeyri-tam simmetrik mübadilənin, sentrik və asentrik fraqmentlərin əmələ gəlməsi. Replikasiyadan sonra iki qısalmış xromosom və cüt asentrik fragment əmələ gəlir.

c) «b» bəndinə uyğun təsvir olunan qeyri-tam simmetrik mübadilə, lakin bu halda bir qısalmış, bir uzanmış xromosom və cüt asentrik fragment əmələ gəlir.

ç) Sentrik fraqmentlərin birləşməsi ilə disentrik xromosomların və asentrik sahələrin birləşməsi ilə bir cüt fraqmentlərin əmələ gəlməsi nəticəsində tam asimetrik xromosom mübadiləsi baş verir.

d) İki distal sahənin birləşməsi və proksimal sahənin birləşməsi nəticəsində yaranan qeyri-tam simmetrik mübadilə, iki qısalmış xromosomun və bir cüt asentrik fraqmentin əmələ gəlməsinə səbəb olur.

	G <sub>1</sub>	S+G <sub>2</sub>	metafaza	anafaza
a				
b				
c				
d				
e				
f				
g				

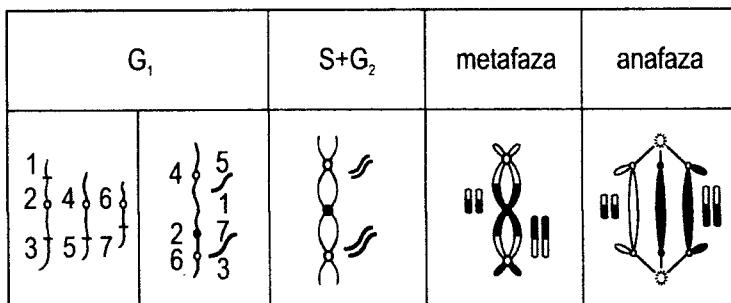
**Şəkil 2.19.** İki xromosomda zədələnmədən sonra xromosom dəyişkənliklərinin əmələ gəlməsi (hər bir xromosom çiynində bir zədə).

e) Proksimal sahənin birləşməsi və distal sahənin birləşməməsi nəticəsində yaranan qeyri-tam asimmetrik mübadilə, disentrik xromosom və iki cüt asentrik fragməntin əmələ gəlməsinə səbəb olur.

### Zədələnmələr və xromosom dəyişilmələrinin əmələ gəlməsi

Xromosomda olan zədələrin və zədələnmiş xromosolların sayından asılı olaraq bir hüceyrədə çoxlu miqdarda xromosom tipli dəyişkənliliklərin əmələ gəlməsi mümkündür. Lakin, əmələ gəlmış xromosom aberrasiyaları mahiyyətcə yuxarıda təsvir olunanlardan fərqlənmir, daha doğrusu onların əsasında zədələnmişdən delesiya, duplikasiya, inversiya və translokasiya əmələ gelir.

Çoxlu zədələnmələr nəticəsində səthi zədələrin sayı artırı, bu da uyğun olaraq, sahələrin kombinasiya dəyişkənliliyini artırır. Belə ki, üç xromosomda dörd zədələnmişdən əmələ gələn proksimal və distal fragmənlərdən əlavə (Şəkil 2.20(1), (3), (7)) interstisial delesiya (Şəkil 2.20(2)) və eyni zamanda dörd yenidən birləşməmiş və yaxud iki cüt-cüt birləşmiş asentrik fragmənlərin əmələ gəlmə ehtimallığı mümkündür.



Şəkil 2.20. Trisentrik xromosomun əmələ gəlməsi.

Dörd xromosomda altı dəyişiklik nəticəsində iki intersisial sentrik, iki sentrik və altı asentrik fragmentlər yaranır ki, onlar da tetrasentrik xromosomları və asentrik fragmentləri əmələ gətirə bilər. Daha çox xromosom dəyişkənliliyinin olması və eyni zamanda onlarda əmələ gəlmış bir neçə asimmetrik translokasiya polisentrik xromosomların əmələ gəlməsinə səbəb ola bilər.

Yüksək dozalı mutagen maddələrin təsirindən pulverizasiyanı xatırladan çoxlu miqdarda xromosom fragmentləri əmələ gəlir. Bu halda xromosom strukturunun tam pozulması baş verir ki, bu da hüceyrənin məhvini səbəb olur.

## 2.5. Xromatid tipli dəyişilmələr

Xromatid tipli dəyişilmələr (şəkil 2.21) hüceyrədə DNT-nin replikativ sintezindən sonra xromosom iki effektli sapdan ibarət olan vaxt ( $S$ ,  $G_2$  və mitozun profazası) baş verir.

Əgər dəyişkənlilik bir xromatidin zədələnməsi nəticəsində əmələ gəlibse, onda ona *xromatid dəyişikliyi* deyilir. Əgər dəyişkənlilik iki bacı xromatidin eyni vaxtda zədələnməsindən əmələ gəlibse, buna *izoxromatid dəyişilməsi* deyilir. Xromatidin sahələrinin kombinasiyası üzrə əmələ gələn xromatid tipli dəyişilmələr, xromosom tipli dəyişilmələrə oxşayır, daha doğrusu onlar delesiya və mübadilə dəyişilməsi kimi təsvir olunur. Xromosom dəyişilmələrində olduğu kimi, xromatid dəyişilmələrinin əmələ gəlməsi də zədələnmələrin və zədələnmiş xromatidlərin sayından aslidir.

I. Xromatidilərdən birində bir zədələnmədən sentrik və asentrik fragmentlər əmələ gəlir ki, nəticədə bu dəyişilmə, metafazada tək xromatid delesiyanın əmələ gəlməsinə səbəb olur, anafazada isə xromosomun çiyinlərindən birində qısalma və tək asentrik fragment müşahidə olunur (şəkil 2.22).

Xromatid tipi	Xromosomun sonunda delesiya	S ve ya G <sub>2</sub> -de zədələnmələr	Metafazada dəyişikliklər	Anafazada dəyişikliklər
	İnterstesial delesiya-əlavə olunma			
Tam xromatid tipi	İzolokus qırılma			
	Tam asimetrik translokasiya			
	Tam simmetrik translokasiya			
	Triradial			
	Xromatid tipi həlqə (delesiya)			
	Xromatid tipi həlqə (birləşməmiş fragməntlər)			

**Şəkil 2.21.** Metafazada və anafazada müşahidə olunan xromosom aberrasiyalarının əsas tipləri: oxlar – xromosomun zədələnənə sahələrini, strixlər – fragməntlərin qovuşma yerini göstərir.

G <sub>1</sub>	S+G <sub>2</sub>	metafaza	anafaza
{	{ } { }	{ } { } 1 J <sub>2</sub>	X -

*Şəkil 2.22. Xromosomun sonunda delesiya*

II. İki xromatiddə iki zədələnmədən (hər xromatiddə bir zədələnmə) izoxromatid dəyişkənlik əmələ gəlir ki, onlar da izolokuslu və izolokussuz ola bilər (şəkil 2.23 (a-e)).

a) İki xromatidin izolokussuz zədələnməsi nəticəsində distal fragməntlərin tam simmetrik mübadiləsi vaxtı mitozda bacı xromatidləri müşahidə olunur ki, onlardan biri qısalmış, ikincisi isə uzanmış olur.

b) Distal fragməntlərlə tam simmetrik mübadilə nəticəsində iki xromatidin izolokuslu zədələnməsi xromatidin morfologiyasını dəyişmir.

c) Asentrik fragməntlərin birləşməsi və sentrik fragməntlərin birləşməməsi nəticəsində bacı xromatidlər arasındakı izolokuslu və izolokussuz qeyri-tam mübadilə, izolokus fragməntlərin əmələ gəlməsinə və xromatidin qısalmasına səbəb olur. Aşağıda izolokussuz oxşar fragmənt mübadilələrindən fərqlənən, izolokuslu mübadilə nəticəsində əmələ gələn dəyişilmələrin sxemi verilmişdir.

ç) Sentrik fragməntin birləşməsi və asentrik fragməntin birləşməməsi nəticəsində, bacı xromatidlər arasındakı qeyri-tam izolokus mübadilə, mitozda tək bərabərçiyinli disentrik xromatidin və cüt asentrik fragməntin əmələ gəlməsinə səbəb olur.

$G_1$	$S+G_2$				metafaza	anafaza
a	{   2)   4)	1{   3   4)	1{   2)   4)	1{   4)   2)		
b	{   2)   4)	1{   3   4)	1{   2)   4)	1{   4)   2)		
c	{   2)   4)	1{   3   4)	1{   2)   4)	1{   3   2)   4)		
d	{   2)   4)	1{   3   4)	1{   2)   4)	1{   3   2)   4)		
e	{   2)   4)	1{   3   4)	1{   2)   4)	1{   3   2)   4)		
f	{   2)   4)	1{   3   4)	1{   2)   4)	1{   3   2)   4)		

**Şəkil 2.23.** İki xromatiddə iki zədələnmədən (hər xromatiddən birində) izolokuslu və izolokussuz izoxromatid dəyişilmələrinin əmələ gəlməsi.

d) İki xromatidin izolokus qırığının distal və proksimal fragmentinin birləşməməsi hər bir xromatiddə çiyinlərdən birinin qısalmasına və cüt asentrik fragmentin əmələ gəlməsinə səbəb olur.

e) İki bacı xromatidin izolokus qırılmasından sonra ayrılıqda distal və proksimal fragmentlərin birləşməsi asimetrik mübadilənin əmələ gəlməsinə səbəb olur ki, nəticədə tək bərabərçiyinli disentrik və tək fragment əmələ gəlir.

III. Bacı xromatidlərindən birində iki zədələnmədən aşağıdakı xromatid dəyişilmələrinin əmələ gəlməsi mümkündür (şəkil 2.24 (a-ə)).

a) İnterstitial delesiyanın  $180^{\circ}$  çevrilmesi və distal fragmentin birləşməsi nəticəsində parasentrik inversiya. Bu halda bacı xromatidləri öz morfoloji konfiqurasiyasını dəyişmir.

b) İnterstitial delesiyanın  $180^{\circ}$  çevrilmesi və distal fragmentin birləşməsi nəticəsində parasentrik inversiya. Bacı xromatidləri əmələ gəlmış tək fragment qədər qısalır.

c) İnterstitial delesiyanın qapanması və distal fragmentin xromosomun proksimal sahəsində birləşməsi nəticəsində xromatid həlqə əmələ gəlir. Xromatidlərdən biri düşmüş interstitial delesiya qədər qısalır.

ç) İnterstitial delesiyanın qapanması və tək fragmentin distal fragmentlə birləşməsi nəticəsində xromatid həlqənin əmələ gəlməsi. Xromatid düşmüş interstitial və sonuncu delesiya qədər qısalır.

d) İnterstitial delesiyanın qapanması və sonuncu delesiyanın birləşməməsi nəticəsində əmələ gələn iki tək fragmentlər interstitial və sonuncu delesiya qədər qısalır.

IV. İki xromosomda iki dəyişkənlilikdən (hər xromosomun bir xromatidində bir dəyişkənlilik) aşağıda xromatid dəyişkənliliyi əmələ gəlir (şəkil 2.25 (a-ə)).

$G_1$	$S+G_2$				metafaza	anafaza
a	{	{ 1 2 3 4 }	{ 1 2 3 4 }	{ 1 2 3 4 }		
b	{	{ 1 2 3 4 }	{ 1 2 3 4 }	{ 1 2 3 4 }		
c	{	{ 1 2 3 4 }	{ 1 2 3 4 }	{ 1 2 3 4 } 3		
d	{	{ 1 2 3 4 }	{ 1 2 3 4 }	{ 1 2 3 4 } 3		
e	{	{ 1 2 3 4 }	{ 1 2 3 4 }	{ 1 2 3 4 }		

*Şəkil 2.24. Bacı xromatidlərdən birində iki zədələnmədən xromatid dəyişilmələrinin əmələ gəlməsi*

$G_1$	$S+G_2$			metafaza	anafaza
a					
b					
c					
d					
e					
f					
g					

Şəkil 2.25. İki xromosomda iki zədələnmədən (hər xromosomun xromatidində) xromatid dəyişilmələrinin əmələ gəlməsi

a) tam simmetrik xromatid mübadiləsi nəticəsində zədələnmiş xromatidin distal fragməntləri xromosomlarla əvəz olunması və perikombinasiyada iştirak edən xromatidin çiyninin uzunluğunun dəyişməsinə səbəb olur.

b,c) xromatidlərdən birinin distal sahəsinin birləşməməsindən və tək fragməntin əmələ gəlməsi ilə xromosom mübadiləsində iştirak edən hər bir xromatidin qısalması ilə qeyri-tam xromatid mübadiləsi birinci hal (b); ikinci halda isə (c) xromatidlərdən birinin distal sahəsinin birləşməməsi nəticəsində tək fragməntin əmələ gəlməsi və xromatidlərdən birini qısalması və digərinin uzanması ilə qeyri-tam xromatid mübadiləsi.

ç) zədələnmiş xromatidlərdə hər iki distal sahələrin birləşməməsi nəticəsində iki tək asentrik fragməntin proksimal sahəsi qütblərə çəkilir, distal sahə isə iki tək fragmənt əmələ gətirir.

d) distal sahənin bitişməsi və proksimal sahənin bitişməməsi nəticəsində əmələ gələn qeyri-tam asimetrik xromatid translokasiyası. Xromatidlər əmələ gəlmış sonuncu delesiyənin uzunluğu qədər qısalır və tək fragmənt əmələ gəlir.

e) ayrılıqda proksimal və distal fragməntlərin birləşməsi nəticəsində əmələ gələn tam asimetrik xromatid translokasiyası. Proksimal sentrik fragməntlər birləşdikdə disentrik xromatid, asentrik sonuncu delesiya birləşdikdə isə tək fragmənt əmələ gəlir.

ə) proksimal sentrik fragməntin birləşməsi (disentrik xromatid) və distal sahənin birləşməməsi və iki tək asentrik fragməntin əmələ gəlməsi ilə qeyri-tam xromatid mübadiləsi.

Bu bölmədə qısaca da olsa oxoculara müxtəlif obyektlər üzərində müəyyən edilmiş və sitogenetiklər tərəfindən qəbul edilmiş xromosom və xromatid tipli dəyişilmələrin təsnifikasi

haqqında məlumat verilir. Paralel olaraq mümkün olan dəyişilmələrin mexanizmi də verilmişdir.

Xromosom strukturunun dəyişilməsi ilə əlaqədar olan mutasiyadan əlavə, mutagenezdə heç də az əhəmiyyət kəsb etməyən mutasiyalardan biri də gendaxili strukturun dəyişməsi ilə əlaqədar olan təbii və yaxud induksiya olunmuş genin molekulyar səviyyədə dəyişilməsidir. Bu dəyişilmələr ayrı-ayrı nukleotidlərə və yaxud onların kiçik qruplarına toxunduqlarına görə belə mutasiyaya *gen* və yaxud *nöqtəvi mutasiya* deyilir.

## 2.6. Gen mutasiyası

Molekulyar genetikanın müvəffəqiyyətlərindən hesab olunan, birinci növbədə irsiyyətin əsas daşıyıcılarından biri sayılan DNT-nin strukturu, onun molekulunun müəyyən edilməsi və genetik kodun açılması göstərdi ki, bütün gen mutasiyaları hüceyrədə baş verən mürəkkəb fizioloji proseslərin nəticəsidir ki, bunların da əsasında kimyəvi və fiziki-kimyəvi reaksiyalar durur.

Gen mutasiyalarının əmələ gəlməsi, onların xüsusiyyətləri, reparasiyanın xassələri və mexanizmi bir neçə monoqrafiyalarda ətraflı verilmişdir. Dreyk (Drace, 1970), Auerbach (1978), Dubinin (1978) və Tarasov (1982).

Genin strukturunu və onun funksional xüsusiyyətlərini müəyyən etmək istiqamətində aparılan tədqiqatlardan məlum olmuşdur ki, gen hüceyrədə müəyyən zülal sintezini programlaşdırmaq qabiliyyətinə malik olan genetik material vahiddir, daha doğrusu DNT və RNT-də nukleotidlərin özünəməxsus spesifik ardıcılılığı ilə əlaqədar olan genetik məlumatlar sistemində bioloji vahiddir. Gen potensial

dəyişkənliyə malik olmaqla, müəyyən üzrə xətt yerləşmişdir və hər bir belə sahə bir neçə alteranativ formada mövcud olur və onların müxtəlif sahələri arasında krossinqovor baş verə bilər. Genin özü-özünü yaratması nuklein turşusu molekulunun özü-özünü yaratması ilə əlaqədar olur və sintez olunmuş DNT molekulunda komplementarlıq prinsipinə görə purin və primidin əsasları ilə ardıcılığa uyğun olaraq düzülürələr.

Nuklein turşusunun molekulu çoxlu miqdarda ardıcıl yerləşmiş elementar vahiddən – nukleotiddən ibarətdir ki, onların da hər biri fosfat, şəkər və azot əsaslarından təşkil olunmuşdur (şəkil 2.26). DNT-nin tərkibinə 4 azot əsasları daxildir: iki purin – adenin (A), quanin (Q) və iki pirimidin əsasları – timin (T) sitozin (S). Bu nukleotidlər bütün növlərdə – bakteriyalardan və göbələklərdən başlayaraq ali bitkilərə, heyvanlara və insanlara qədər eynidir. Onu da qeyd etmək lazımdır ki, hər bir orqanizmin özünəməxsus irsiyyət məlumatı vardır. DNT molekulunun sabitliyi ayrı-ayrı populyasiya, cins, növ üçün səciyyəvi olmaqla o, eyni zamanda göstərilən dörd azot əsaslarının sabit növbələşməsinə görə hər bir fərd üçün spesifikdir. DNT molekulrasında olan azot əsaslarının ardıcılılığı zülal molekulrasında amin turşularının yerləşmə qaydasını müəyyən edir. Zülal molekulunun tərkibi 20 tip amin turşularının müəyyən ardıcılıqla birləşmələrindən ibarətdir və hər bir amin turşusu DNT zəncirində ardıcıl olaraq yerləşən hər üç müxtəlif nukleotidə – tripletə uyğun gəlir. Bütün tripletlərin məcmusu *genetik kod* adlanır və o nukleotidlərin ardıcılığına uyğun olaraq, amin turşularının ardıcıl yiğilmasında bilavasitə iştirak edir. Hər bir triplet yalnız müəyyən bir amin turşusunu kodlaşdırır.



**Şəkil 2.26. DNT molekulunun kimyəvi quruluşu.  
DNT-nin iki polinukleotid zənciri arasında – H rabbitəsi**

Genetik kod, tripletlərə qruplaşmış nukleotid ardıcılığından ibarət olub, *kodon* adlanır. Nukleotid ardıcılığında olan hər hansı bir dəyişkənlik DNT-nin replikasiya prosesində kod ardıcılığında informasiyaların pozulmasına səbəb olur və nəticədə gen mutasiyası əmələ gəlir. Gen mutasiyası nəticəsində programlaşmış bir amin turşusu əvəzinə başqa amin turşusu sintez olunur.

Gen mutasiyası DNT molekulunun struktur quruluşunda aşağıdakı dəyişikliklər nəticəsində baş verə bilər.

1. Əsasların yerdəyişməsi – əsaslardan birinin yerinə başqası düzülür.
2. Nukleotidlərin miqdarının dəyişməsi: a) həmin gen ardıcılığı üçün təzə əlavə; b) duplikasiya – sahələrin ikiləşməsi; c) delesiya – bir və ya bir neçə nukleotidinitməsi.
3. İversiya – blokun və yaxud bir neçə əsasların  $180^{\circ}$  dönməsi.
4. Translokasiya (və yaxud transpozisiya) gen daxilində əsasların başqa vəziyyətə keçməsi.

Gen mutasiyalarının əsas tipləri 2.27-ci şəkildə verilmişdir.

	T	A	Q	S	S	T	Q	A	Q	S	A	T	
1	P	P	Ş	Ş	Ş	Ş	P	Ş	P	Ş	Ş	P	
	A	T	S	Q	Q	A	S	T	S	Q	T	A	
2	T	A	Q	S	S	T	T	A	Q	S	A	T	
	P	P	Ş	Ş	Ş	P	P	P	Ş	Ş	P	P	
	A	T	S	Q	Q	A	A	T	S	Q	T	A	
3	T	A	Q	S	S	T	Q	A	T	Q	S	A	T
	P	P	Ş	Ş	Ş	P	Ş	P	P	Ş	Ş	P	P
	A	T	S	Q	Q	A	S	T	A	S	Q	T	A
4	T	A	Q	S	S	T	Q	A	S	A	T		
	P	P	Ş	Ş	Ş	P	Ş	P	Ş	P	P		
	A	T	S	Q	Q	A	S	T	Q	T	A		
5	T	A	Q	S	A	T							
	P	P	Ş	Ş	P	P							
	A	T	S	Q	T	A							
6	T	S	Q	A	S	T	Q	A	Q	S	A	T	
	P	P	Ş	P	Ş	P	Ş	P	Ş	Ş	P	P	
	A	Q	S	T	Q	A	S	T	S	Q	T	A	
7	T	A	Q	Q	A	Q	S	S	T	S	A	T	
	P	P	Ş	Ş	P	Ş	Ş	Ş	P	Ş	P	P	
	A	T	S	S	T	S	Q	Q	A	Q	T	A	

*Şəkil 2.27. Gen (nöqtəvi) mutasiyanın əsas tipləri:*

- 1 – Genda nukleotidlərin başlangıç vəziiyyəti; 2 – Əvəz olunma (tranzisiya və ya transversiya); 3 – Əlavə olunma (əlavə cüt əsaslar TA); 4 – delesiya (cüt əsasların itməsi QS); 5 – əsaslar qrupunun delesiyası (SQ, TA, QS, AQ, QS, SQ); 6 – inversiya (AT, QS, SQ əsaslarının 180° dönməsi); 7 – transpozisiya (SQ, SQ, TA cüt əsasları gen daxilində yeni sahaya köçür, əsaslar blokunun yerdəyişməsi inversiya ilə nəticələnə bilər).

Mutasiyalar düzünə ( $A \rightarrow \alpha$ ) və əksinə ( $\alpha \rightarrow A$ ) olur. Düzünə gen mutasiyası repersiya nəticəsində, başlanğıc forma dəyişkənliyə uğradıqda olur; əksinə mutasiya isə dəyişmiş forma normal hala qayıtdıqda olur.

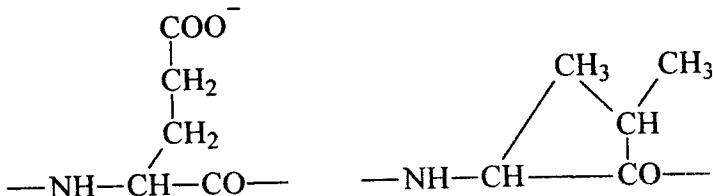
## 2.7. Əsasların əvəz olunması

Əsasların əvəz olunması ilə baş verən gen mutasiyası tez-tez baş verən dəyişkənlik tiplərindən biri olub, spontan olaraq  $10^{-5}$ - $10^{-10}$  tezliklə baş verərək təkamül üçün və eləcə də tədqiqat və təcrubi məqsədlər üçün mutant formaların alınmasında böyük əhəmiyyət kəsb edir. Həmin tezliklə mutantlardan bir neçəsi ilkin formaya qayıda biler. Hər hansı bir dəyişilmə, əksinə mutasiya nəticəsində aradan qaldırılır və yaxud yabanı tipin əlaməti suppressor mutasiya nəticəsində bərpa olunur. Əsasların əvəz olunması nəticəsində genetik kodun məlumatı pozulur. Kod vahidinin bütünlükə dəyişməsi nəticəsində kodun tərkibi dəyişir və sintez olunan zülalın tərkibinə başqa amin turşusu daxil olur.

Qanın hemoqlobinində qırmızı pigment polipeptid komponentinin sintezi üçün məlumat daşıyan genin mutasiyası yaxşı öyrənilmişdir. Sağlam insanın hemoqlobininin ( $A$ ) molekule 287 amin turşusundan təşkil olunmuşdur. Nukleotidlərdən birinin dəyişməsi, daha doğrusu hemoqlobinin sintezinə nəzarət edən gəndə bir tripletin dəyişməsi, hemoqlobinin başqa xassəyə malik olmasına səbəb olur. Əgər onun müəyyən molekulunda, sintez prosesində bir amin turşusu dəyişərsə bu halda normal hemoqlobin əvəzində anormal hemoqlobin ( $S$ ) və anormal oksigen daşıya bilməyən oraqvari eritrosit əmələ gəlir. Bu halda  $\beta$ -globinin zəncirində bir əsasın dəyişməsindən oraqvari hüceyrə

anemiya xəstəliyi inkişaf edir və nəticədə polipeptid  $G_1$  vəziyyətində, adətən glutamin turşusunun yerində valin amin turşusu dayanır (şəkil 2.28).

Amin turşularının ardıcılılığı	Hemoqlobin HB <sup>a</sup>	Hemoqlobin HB <sup>s</sup>
1	histidin	histidin
2	valin	valin
3	leysin	leysin
4	leysin	leysin
5	treonin	treonin
6	prolin	prolin
7	Glutamin turşusu	valin
8	Glutamin turşusu	Glutamin turşusu
9	lizin	lizin

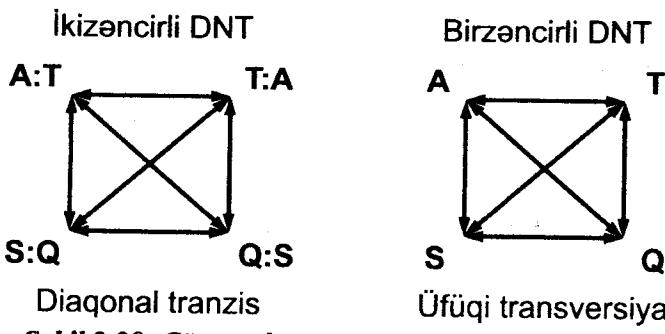


*Şəkil 2.28. İnsan hemoqlobinin müxtəlif tiplərində amin turşusu qalıqlarının tərkibinin dəyişməsi – genotipdə mutasiyanın nəticəsidir*

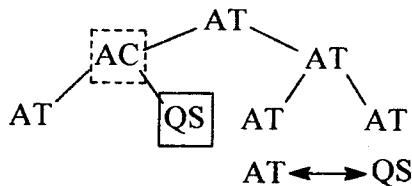
Cüt əsasların dəyişməsindən əmələ gələn mutasiya iki müxtəlif tipdə ola bilər: *tranzisi* və *transversin*. Tranzisidə purin purinlə, pirimidin isə primidinlə əvəz olunduğu halda, transversində isə purin primidinlə və primidin purinlə əvəzə olunur (şəkil 2.29). Tranzisinin 4 (AT; TS) və transversinin isə 8 (AT, AS, TS, ST) tipi mümkündür. Tranzisi və transversin tipli mutasiyaların mexanizmi DNT-nin replikasiyası, daha doğrusu molekuların polikonservativ ikiləşməsi ilə əlaqədardır.

Tranzisi və transversiyanın təsviri sxemi uyğun olaraq

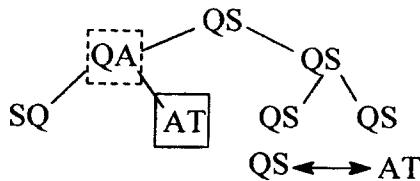
şəkil 2.30 və 2.31-də verilmişdir. Yuxarıdakı sxemdə purin A-nın purin T ilə əvəz olunması göstərilir ki, bu da autoreproduksiyadan sonra AS-nin düzgün cütləşməsi nəticəsində (qırıq xətlərlə) AC cütünün QS ilə əvəz olunmasına səbəb olur (bütöv xətlər).



*Şekil 2.29. Cüt əsasların əvəz olunması nəticəsində mutasiya  
(Tarasova görə, 1982)*

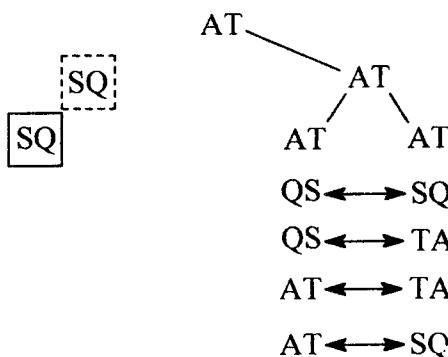


Aşağıdakı sxemdə QA-nın düzgün birləşməməsi (qırıq xətlərlə) nəticəsində S pirimidini T ilə əvəz olunur ki, bu da AT cütünün əmələ gəlməsi ilə nəticələnir (bütöv xətlə).



**Səkil 2.30.** Bir purinin başqa purinlə əvəz olunması ilə transversiya tipli mutasiyanın əmələ gəlməsinin ümumi sxemi (Dubinin, 1978)

Sol hissə pirimidin T-nin purin Q-ile əvəz olunmasını göstərir (bütöv xətlə). AC – cütü – DNT molekulunun replicasiyasından sonra SQ cütü ilə əvəz olunur. Sağ hissədə isə transversiya prosesində əvəz olunmanın bütün tipləri göstərilmişdir. Bütün hallarda DNT molekulunda cüt əsasların əvəz olunması baş verir, yəni pirimidin-purin cütü, purin-pirimidin cütü ilə və əksinə əvəz olunur.



*Şəkil 2.31. Purinin pirimidin və pirimidinin purinlə əvəz olunması ilə transversiya tipli mutasiyanın əmələ gəlməsinin ümumi sxemi (Dubinin, 1978)*

Tranzisi və transverin nəticəsində əsasların əvəz olunması nonsens və missens-mutasiyanı əmələ getirir. Birinci halda əsasların əvəz olunması, genin daxilində mənasız nonenskodonun əmələ gəlməsinə səbəb olur ki, o da translokasiya etmir və heç bir amin turşusunu kodlaşdırır.

Beləliklə, əmələ gələn terminal kodon translaksiya prosesini dayandırır və zülalın sintez olunduğu yerdə qırıq əmələ getirir. Gen isə yalnız polipeptid qırığını terminal kodonun əmələ gəldiyi yerə qədər kodlaşdırıa bilir.

İkinci halda (missens-mutasyia) əsasların əvəz edilməsi,

mənəsi dəyişilmiş mutant kodonu əmələ gətirir ki, nəticədə polipeptid zəncirində bir amin turşusu başqası ilə əvəz olunur. Bunun nəticəsində zülalın fizioloji rolü dəyişir və bu əsasların əvəz olunmasının fenotipik olaraq üzə çıxması onun xarakterindən və vəziyyətindən asılıdır.

## 2.8. Əsaslarınitməsi və əlavə olunması ilə əmələ gələn mutasiya

Əsasların əlavə olması (o cümlədən duplikasiya) və mövcud nukleotidlərin qırılıbitməsi (delesiya) triplet ardıcılığını mutasiya nöqtəsindən başlayaraq genin sonuna qədər 3 dəfədən az olmayaraq dəyişir. Kodonlar arasındakı sərhədlərdə əmələ gəlmış yerdəyişmə nativ DNT zəncirinin tripletində əsasların yerləşmə qaydasını pozaraq, mRNT-nin sintezində irsi məlumatların dəqiqliyinin dəyişməsinə səbəb olur ki, nəticədə modifikasiya olunmuş tripletdən başlayaraq sintez olunan zülal zəncirində amin turşuları səhv düzülür (şəkil 2.32).

1	AST	AST	AST	AST	AST	AST	AST	...
2	AST	ASQ	TAS	TAS	TAS	TAS	TAS	...
3	AST	ATA	STA	STA	STA	STA	STA	...

*Şəkil 2.32. Triplet çərçivəsinin sürüşməsi nəticəsində baş verən mutasiya: 1 – Gendə AST kodonunun normal ardıcılığı; 2 – Q (quanin) əsasının 2-ci kodona əlavə olunması. Əlavədən sonrakı bütün kodonlar AST-dən TAS-a çevrilir. 3 – S (sitozin) əsasının 2-kodondanitməsi ilə sonrakı kodonlar AST-dən STA-ya çevrilir.*

DNT strukturunda əlavə əsasların olması və yaxuditməsi ilə əlaqədar olan mutasiya dəyişkənliyinə freymışift mutasiya da deyilir. Əlavələrin, itmələrin və ya hər hansınukleotidlərin miqdarının 3 və 3-dən az olması səhvliyəgətirmir, yalnız uyğun sintez olunan zülalda bir və yaxud bir neçə amin turşusunun itməsinə və ya əlavə olunmasınasəbəb olur. Belə hallarda fenotipik təzahür, həmin zülalınfəaliyyətindən, itmiş və yaxud əlavə olunmuş amin turşusunun nə kimi əhəmiyyətə malik olmasından asılıdır.

Bu bölmədə biz oxocuları mutagenezin bəzi nəzəri vəpraktiki məsələləri ilə və eyni zamanda ibtidai orqanizmlərin və eukariotun somatik hüceyrələrində baş verən proseslərlə tanış etdik. Xüsusən, mitotik tsiklin müxtəlif fazalarında hüceyrələrdə baş verən proseslərin molekulyar mexanizmi və hüceyrə tsikli şərh edilmiş, spontan və induksiya olunmuş mutagenezin müasir problemləri verilmiş, DNT-nin bir və iki spirallı fazasında əmələ gələn zədələnmələr, mutasiyaların tipləri, onların həqiqi mutasiyaya keçmələri və mexanizmi verilmişdir.

Hüceyrələrin spontan (orqanizmlərin təbii qocalmasımisalında) və ekzogen metabolitlərin modifikasiyaedici təsirindən baş verən mutasiyanın əsas göstəricilərdən biri mitotik indeksin dəyişməsidir, daha doğrusu mitozda olan hüceyrə miqdarının tədqiq olunan toxumadakı ümumi hüceyrələrin miqdarına olan nisbətidir.

## **2.9. Mitotik indeks**

Mitotik indeks promillə ifadə olunur, daha doğrusuböülünen hüceyrə saylarının baxılmış 1000 hüceyrə sayına nisbətidir. Bunun üçün bir neçə preparatlarda hüceyrələr

sayılır (adətən hər variantda 15 preparatın hər birində 200 hüceyrə saymaqla ümumi say 3000-ə çatdırılır və bunların içərisində mitotik tsiklin fazalar üzrə) profaza P, metafaza M, anafaza A, telofaza T) bölünən hüceyrələrin miqdarı nəzərə alınır. Mitotik indeks aşağıdakı formula görə hesablanır:

$$\frac{P - M - A - T}{I - P - M - A - T} \cdot 3000\%,$$

məxrəcdəki I – interfazada olan hüceyrələrin sayıdır.

Hüceyrələrin sayılmasını 2 üsulla aparmaq olar: 1-ci halda «soldan sağa, yuxarıdan aşağıya», ikinci halda isə hüceyrələrin ümumi miqdarı preparatın 5 hissəsində bərabər miqdarda (40 olmaqla) sayılan hüceyrələrin miqdardından təşkil olunur. İkinci üsul daha dəqiqlik üçün hesab olunur.

İlk dəfə olaraq Hovard və Pelk (*Hovard, Pelc 1953*) öz işlərində mitotik tsikldə baş verən prosesləri radioavtoqrafiya üsusu ilə öyrənmək üçün radioaktiv indikator izotopu kimi fosfordan ( $^{32}\text{P}$ ) və nişanlanmış  $^3\text{H}$  – timidindən istifadə etmişlər. (Eukoriotun hüceyrə tsiklinə bax).

Hazırda bir sıra klassik bitki və heyvan obyektlərinin müxtəlif üzv və toxumalarının hüceyrələri üçün, eləcə də insanlarda təcrubi olaraq hüceyrə tsiklinin ümumi müddəti, onun fazaları müəyyən edilmiş və müvəqqəti parametrlərin çox geniş dəyişdiyi göstərilmişdir.

Təbii populyasiyalara müxtəlif modifikasiyaedici amillər təsir etdikdə onların ümumi hüceyrə tsikli, müvəqqəti parametrləri və ayrılıqda hər bir fazası dəyişə bilər. Bu halda ekstremal amilin sitogenetik toksikliyini müəyyən etmək üçün, mitotik indeks əlavə test sayılır, bununla yanaşı paralel olaraq mutasiya səviyyəsini və onun kənarlanmalarını

analiz etməklə, müxtəlif pataloji proseslərin təsirindən hüceyrənin normal və qeyri-normal şəraitdə olub-olmamasını müəyyən etmək olar.

Sitogenetik analizlərdə istifadə edilən obyektlərin mitotik tsiklinin müvəqqəti parametrləri, nişanlanma əyrisinin analizinə görə (radioavtoqrafiya üsulu), metafaza hüceyrələrinin qütblərə çəkilməsini pozan kolxitsin və ona oxşar maddələrdən istifadə etməklə (tetraploid üsulu), hüceyrə tsiklinin müəyyən fazasında olan hüceyrələrin miqdarını saymaqla (hüceyrə bölünməsinin və DNT sintezinin ingibitorundan istifadə etmə üsulu) və yaxud daha yüksək dəqiqlik əldə etmək üçün bu üsulların əlaqələndirilməsindən istifadə edilir (mitotik tsikl və onun fazasının müvəqqəti parametrinin analizi üsuluna bax).

Asinxron bölünən hüceyrələrin mitotik tsiklin dövrlərini müəyyən etmək üçün Quastler və Sherman (*Quastler, Sherman*, 1959) tərəfindən işlənib hazırlanmış radioavtoqrafiya üsulu, hüceyrə tsiklinin parametrlərinin müddətini müəyyən etmək üçün ən geniş yayılmış üsuldur. Hüceyrənin bütövlüyünü, onun strukturunu pozmadan onda baş verən metabolik prosesləri öyrənmək üçün istifadə edilən, morfoloji və biokimyəvi analizlərin principini özündə birləşdirən kəmiyyət üsullarından biri olan radioavtoqrafiya üsulu mitotsiklin müəyyən dövrünə nişanlanmış timidin  $^3\text{H}$  izotopunun daxil edilməsinə əsaslanır.

Radioavtoqrafiya üsulunda, radioaktiv nişanlanmış birləşmələrdən istifadə olunur, daha doğrusu atomlardan biri radioaktivliyə malik olan radioaktiv izotop atomu ilə əvəz olunur. Hər bir elementin izotopu kimyəvi xassələrinə görə bir-birindən fərqlənmirlər, heyvan, bitki və yaxud hüceyrə kulturalarına daxil edilmiş bu izotoplar özlərini bütün

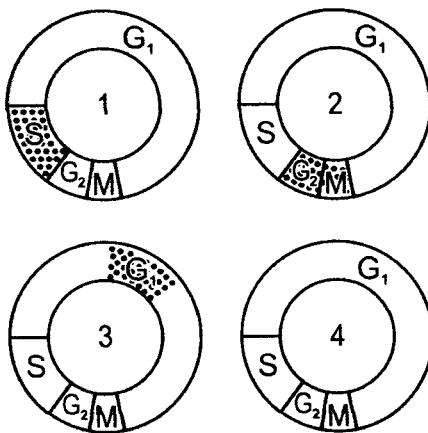
proseslərdə adı qaydada aparırlar. Lakin, izotoplarnın radioaktiv şüalanma xassələrinə görə nümunələrdə onların miqdarını və yayılmasını müəyyən etmək mümkündür.

DNT-nin sintezini və mitotik tsiklin parametrlərini analiz etmək üçün aşağıdakı izotoplardan istifadə edilir,  $^3\text{H}$ -timidin,  $^3\text{H}$ -dezoksisisitidin,  $^3\text{H}$ -dezoksiuridin,  $^3\text{H}$ -bromdezo-ksiuridin,  $^3\text{H}$ -dezoksiadenozin,  $^3\text{H}$ -dezoksiuanozin,  $^3\text{H}$ -io-dezoksiuridin və s. Nişanlanmış timidin, nuklein turşularının strukturunu təşkil edən əsaslar içərisində yeganə əsasdır ki, o replikasiya dövründə yalnız DNT molekulunun tərkibinə daxil olur.  $^3\text{H}$ -timidin başqa nukleotidlərə nisbətən bir sıra, o cümlədən: DNT sintez edən toxuma və strukturaya tez daxil olmaq, orqanizmdə qaldığı qısa müddətdə onun toksikliyinin zəif olması və sair xüsusiyyətlərinə görə ondan hüceyrələrin mitotik tsikli keçməsi qanuna uyğunluqlarını öyrənmək üçün geniş istifadə edilmək kimi üstünlüklərə malikdir.

Mitotik tsikli tədqiq etmək üçün istifadə edilən radioavtoqrafiya üsulu ilə mitotik tsiklin parametrlərini və onun ayrılıqda fazalarını ( $G_1$ ,  $S$ ,  $G_2$  və  $M$ ) müəyyən etmək olur. Radioavtoqrafiya üsulu ona əsaslanır ki,  $^3\text{H}$ -timidin orqanizmə daxil edilərkən bir qrup hüceyrələr nişanlanır, nişanlanmış hüceyrələr o hüceyrələr olur ki, məhz onlarda DNT-nin sintezi gedir, daha doğrusu həmin hüceyrələr izotop daxil edilən vaxt, mitotik tsiklin S-dövründə olurlar. Bu isə nişanlanmış hüceyrələrə görə bütün hüceyrə populyasiyalarının dinamikasını öyrənməyə imkan verir (Yepifanova və b., 1977).

Bu və ya digər toxumanın hüceyrələrinə  $^3\text{H}$ -timidin daxil etdikdən müəyyən vaxt sonra ilk anda mitoza daxil olan hüceyrələr nişanlanmış olur (Şəkil 2.33). Nişanlanmayan hü-

ceyrələr o hüceyrələrdir ki, radioaktiv izotop daxil edilən vaxt onlarda DNT-nin sintezi qurtarmış və onlar G<sub>2</sub> dövründə olmuşdur.



**Şəkil 2.33.** S-dövründə <sup>3</sup>H-timidin nişanlanmış hüceyrələrin mitotik tsikli keçmələrini əks etdirən sxem (Ihasher, 1966). Yepisanova və müölliflərə görə 1977 (Ihasher, 1966). M – Mitoz, G<sub>1</sub> – presintetik dövr, S – DNT-nin sintezi dövrü, G<sub>2</sub> – postsintetik dövr.

Sonra mitoza daxil olan hüceyrələr nişanlanmış olur ki, bunlar da <sup>3</sup>H-timidin orqanizmdə olarkən DNT-nin sintezi S dövründə olan hüceyrələrdir. Sonralar yenə mitoza daxil olan hüceyrələr nişanlanmamış olur, nişanlanmayan hüceyrələr o hüceyrələrdir ki, <sup>3</sup>H-timidin orqanizmdə olarkən həmin hüceyrələr mitotik tsiklin G<sub>1</sub> və mitoz dövründə olmuşdur. Nişanlanmış hüceyrələr yenidən bölünür və yenidən nişanlanmış mitoz görünür. Birinci və ikinci maksimum nişanlanmış mitoz əyrisinin arasındakı məsafə mitotik tsiklin müddətinə (T) uyğun gəlir.

Tədqiqatın məqsədindən və obyektdən asılı olaraq orqanizmə daxil edilən <sup>3</sup>H-timidinin xüsusi aktivliyi və

dozası dəyişə bilər. Bu isə təcrübi yolla müəyyən edilir və elə olmalıdır ki, yuxarıda göstərilənlər normadan artıq olmasın, əks təqdirdə kimyəvi birləşməyə daxil olan izotop və onun cüzi miqdarda radioaktiv şüalanması hüceyrənin normal metabolizminə mənfi təsir göstərə bilər.

İzotop uzun müddətə daxil edildikdə o, bir neçə saat, hətta fiksasiyaya qədər obyekt olan mühitdən kənar edilmir. Bu üsul xüsusən kultura olunan hüceyrələrdə istifadə edilir. Qısa müddətli üsuldan isə (3-5 dəqiqədən 15-20 dəqiqəyə qədər), impulslu nişanlanma materiallarını müxtəlif saatlarda fiksə etməklə hüceyrə tsiklinde dövrlərin müddətini müəyyən etmək üçün istifadə edilir.

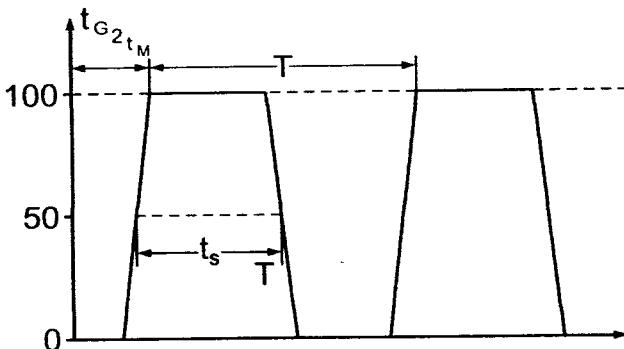
İmpulslu nişanlanma üsulunun köməkliyi ilə (Yepifanova əməkdaşları ilə birlikdə 1977) mitotik tsiklin ayrı-ayrı dövrlərinin müvəqqəti parametrlərini müəyyən etmişlər (şəkil 2.34). Mitotik tsiklin hər bir dövrünün müddəti bütün hüceyrə populyasiyaları üçün sabit kəmiyyətə malik olduğu halda, nişanlanmış izotopun daxil olduğu andan birinci nişanlanmış mitozun göründüyü vaxta qədər olan məsafə  $G_2$  dövrünü əhatə edir. Bu halda  $S$ -dövrü isə nişanlanmış mitozun qalxan əyrisi ilə enən əyrisinin 50%-liyindəki əyrlər arasındaki məsafəyə uyğun gəlir. Presintetik dövrün ( $G_1$ ) müddəti isə (mitoz müddətinin yarısı da daxil edilməklə) aşağıdakı düstur ilə hesablanır:

$$t_{G_1} = T - (t_s + t_{G_2} + t_m),$$

burada  $T$  – mitotik tsiklin ümumi müddətidir;  $t_{G_1}, t_s, t_{G_2}, t_m$  isə uyğun olaraq  $G_1, S, G_2$  və  $M$  dövrlərini əhatə edir.

Formula əsaslanaraq  $M$  – fazalarının müddətini (xüsusi mitozu) müəyyən etmək olar, lakin bu isə hər bir hüceyrə

üçün mitotik tsiklin bütün dövrlərinin müddəti bərabər olan halda mümkündür. Odur ki, nişanlanmış mitoz üsulu ilə mitozun müddəti haqqında təxminini cavab alır, ona görə də bu kəmiyyəti düzgün tapmaq üçün kolxitsindən və rentgen şüalarının aşağı dozalarından istifadə edilir (Utkin, 1959; Yepisanova, 1965; Yakovlev, 1973; Yepisanova və b., 1977).



*Səkil 2.34.  ${}^3\text{H}$ -timidinin orqanizmə bir dəfə daxil edilməsindən sonra müxtəlif vaxtlarda nişanlanmış dəyişilməsi (faizlə). Hipotetik halda, bütün hüceyrə populyasiyaları üçün mitotik tsiklin hər bir dövrünün müddəti daimidir. (Yepisanova, Terskixe, Zaxarova, 1977). Absis oxunda –  ${}^3\text{H}$ -timidin daxil edildikdən sonrakı vaxt; Ordinant oxunda – nişanlanmış mitoz (faizlə). T – mitotik tsiklin müddəti və mitoz dövrünün müddəti.*

Mitotik tsiklin fazalarını radioavtoqrafiya üsulu ilə analiz etdikdə ən yaxşı nəticəni, təbii sinxron bölünən hüceyrə populyasiyalarında almaq olur. Belə hüceyrə populyasiyaları olan obyektlərə çobanyastığı çıçayıının (*Crepis Capillaris*) quru toxumunu və periferik qan leykositlərini misal göstərmək olar. Çobanyastığı çıçayıının hüceyrələrinin bölünməsini toxumun suda isladılması ilə, leykositlərin bölünməsini isə fitohemaqluytininlə stimulə etmək olar.

Çobanyastığı çıçayıının quru toxumunda rüseymin hüceyrələri presintetik dövrdə, leykositlər isə sakitlik dövründə

olur.

Stimulə edici təsirdən sonra çobanyastığı çıçeyinin hüceyrələri, leykositlər sinxron olaraq bölünürlər və mitotik tsiklin fazalarını bir neçə müddət eyni vaxtda keçirlər.

Mitotik tsiklin müvəqqəti parametrlərini təyin etmək üçün radioavtoqrafiya üsuluna əlavə, 5 – bromdezok-siuridindən, süni sinxronizasiyalar – DNT sintezinin ingibitorlarından (5 – aminourasil, 5 ftor – 2 dezoksiuridin, amiinoaterin (metotreksat) yüksək dozalı timidin və başqları) hüceyrələri metafaza mərhələsində saxlayan, hüceyrələrin qütblərə çəkilməsini təmin edən iy tellərini pozan maddələrdən) kolxitsin və ona oxşar sintetik vinkristin, kolsemid, vinblastin və s. istifadə edilir. Bu bölməni yekunlaşdıraraq qeyd etmək lazımdır ki, mitotik tsiklin müvəqqəti parametrləri haqqında daha dəqiq məlumatları almaq üçün radioavtoqrafiya üsulunu başqa üsullarla əlaqələndirməklə nail olmaq mümkündür. Belə ki,  $^3\text{H}$  – timidindən və kolxitsindən eyni vaxtda paralel istifadə olunması nişanlanmış və nişanlanmamış hüceyrələrin mitoza daxil olma sürətini öyrənməyə imkan verir. Asinxron populyasiyalı hüceyrələri DNT sintezinin ingibitorları ilə sinxronlaşdırıldıqda kontrol kimi götürülən  $^3\text{H}$  timidinlə sinxronlaşmanın müəyyən etmək olar. Radioavtoqrafiya analizlərində alınan məlumatlar ingibitorların effektliyinin göstəricisi ola bilər. Əgər mitoza daxil olan hüceyrələrdə nişanlanma getmişsə, deməli bu onu göstərir ki, izotop DNT-nin sintezi dövründə hüceyrəyə daxil edilmişdir. Radioavtoqrafiya üsulu, işlənmə texnikası və onun vasitəsi ilə həll olunan məsələlər haqqında daha ətraflı məlumatlarla aşağıdakı alimlərin işlərində tanış olmaq olar: Boyd, 1957; Qraçeva və başqları, 1960, 1968; Kols, Limarenko, 1962; Zavarzin, 1967; Yepifanova, Terskix 1969; Yepifanova və b., 1977.

## Fəsil 3

# XROMOSOM VƏ GEN MUTASIYALARININ STRUKTUR DƏYİŞİLMƏLƏRİNİN TƏDQİQAT ÜSULLARI

Sitogenetik analiz üçün preparatların ümumi hazırlanma prinsipləri. Spontan və induksiya olunmuş mutasiyaları analiz etmək üçün aparılan təcrübələrin sxemi bir-birindən fərqlənirlər. Spontan mutasiyaların analizləri üçün götürülen materiallar fiksasiyaya qədər elə bir şəraitdə saxlanmalıdır ki, onlara heç bir amil təsir göstərməsin. Induksiya mutasiyalarında isə spontan mutasiyalarından fəqli olaraq, materiallara tədqiq olunan amillərlə təsir edilir.

Tədqiq olunan mutagen amillərin sitogenetik təsirini öyrənmək üçün paralel olaraq sudan (toxumlar căcər-dilərkən), fizioloji məhlullardan (qan kulturası ilə təcrübələrdə) və s. istifadə edilir. Bəzi mutagenlər suda və fizioloji məhlullarda həll olmadığı üçün onları həll etmək üçün xüsusi həlledicilərdən (spirt, tvin və s.) istifadə edilir. Buna görə də həlledicilərdən istifadə edərkən təcrübədə paralel olaraq bunların da kontrolu olmalıdır.

Sitogenetik analiz üçün preparatların hazırlanması vaxtı bəzi hazırlıq işlərindən başqa aşağıdakı metoda riayət etmək lazımdır: materialların fiksasiyaya hazırlanması, fiksasiya, materialların rənglənməsi, daimi və müvəqqəti preparatların hazırlanması. Sitogenetik analizin son mərhələsi isə, preparatların mikroskopda baxılmasından və analizin nəticəsinin riyazi hesablanmasından ibarətdir.

Sitogenetik analiz üçün tədqiq olunacaq materialların hazırlanmasının texniki təfsilatı hər bir obyekt üçün konkret olaraq aşağıdakı üsullarda verilmişdir.

### **3.1. Fiksasiyadan əvvəl materialların hazırlanması**

Anafaza və metafaza üsullarının köməkliyi ilə xromosomların strukturundakı dəyişilmələrin qeyd alınması, preparatların sitogenetik analiz üçün keyfiyyətli olması şərtlərindən biri preparat hazırlayan zaman onların bir qatlı alınmasından və xromosomların ayrı-ayrılıqda paylanmasından ibarətdir. Bu məqsədə nail olmaq üçün bir çox hallarda, əlavə olaraq maserasiyaedici maddələrdən də istifadə edilir.

**Maserasiya** (*macerato* – yumşaltma) toxumaların ayrı-ayrı hüceyrələrə ayrılmasına səbəb olur və əsasən müvəqqəti preparatların hazırlanmasında fiksasiyadan sonra aparılır. Maserasiya üsulu aşağıdakı qaydada aparılır. Materiallar  $60^{\circ}\text{C}$ -də  $\text{InHCl}$ -la hidroliz olunur (və yaxud  $20^{\circ}\text{C}$ -də 5 N  $\text{HCl}$ -la və sonra 45%-li sirkə turşusu, 40-45%-li propion turşusu, xloralhidratla, sitaza və 5%-li pektinaza fermentinin məhlulları ilə işlənir.

**Hipotoniya** – (*hypotonos* – latinca gərginliyin, tonusun aşağı düşməsi deməkdir) məhlullarının osmotik təzyiqi hüceyrənin osmotik təzyiqindən aşağı olduğuna görə bu məhlullar nüvəni şisirdir, qıraf partlayır və nəticədə preparatlarda xromosomlar yaxşı paylanır. Bu üsul məməlilərin toxumalarından müvəqqəti preparat düzəldilərkən istifadə edilir və material 0,075 M KCl məhlulunda ( $37^{\circ}\text{C}$ ) 1%-li üçəvəzli sodium sitrat və  $40^{\circ}\text{C}$ -yə qədər qızdırılmış distillə suyunda qısa müddətli inkubasiya olunmaqla bu proses fiksasiyaya qədər davam etdirilir.

Bir çox hallarda preparatların mikroskopik analizində xromosomların uzun olmasına görə onları saymaq çətin olur, çünki çox vaxt bu uzun xromosomların sahələri üst-

üstə düşərək sitogenetik və kariotipik analizlərin keyfiyyətini aşağı salır. Bu çətinlikləri isə materialları fiksasiyaya qədər xüsusi maddələrlə işləməklə aradan qaldırmaq olar. Xromosomların kariotipik analizini asanlaşdırmaq üçün onların yüksək dərəcədə spirallaşmasına və uzunluqlarının qısalmasına səbəb olan maddələrdən və onların məhlullarından istifadə edilir. Bu məqsədlə xloralhidratın 0,3-1%-li məhlulundan, 8-oksixinolin 0,002 M məhlulundan, paridoxlorbenzolun və monobromnaftalinin qatı məhlullarından istifiadə edilir. Fiziki amil kimi aşağı temperaturun özü də xromosomların spirallaşmasına və qısalmasına səbəb olur. Cücərən materialların bir gün və yaxud kökcüklerin 2 saat fiksasiyaya qədər  $0^{\circ}$  temperaturda soyuducuda saxlanması xromosomların kariotipinin analizini asanlaşdırır.

Metafaza mərhələsində analiz üçün lazımi miqdarda hüceyrə toplanmasını təmin etmək üçün bitki və heyvan toxumalarını fiksasiyaya qədər 2-3 saat kolxitsinin zəif məhlulunda və eləcə də ona oxşar olan sintetik maddələrin (vinkrastin, vinblastin, kolsemid və s.) məhlullarında saxlamaq lazımdır.

Bitki toxumalarından preparat hazırlanarkən, xromosomların yaxşı spirallaşmasına və qısalmasına nail olmaq üçün kolxitsinin məhlulundan istifadə edilir. Yadda saxlamaq lazımdır ki, maddələrin seçilməsi, onların qatılığı, materialların maddə saxlanma müddəti, temperatur rejimi və s. hər bir bitki növü üçün spesifikdir.

### **3.2. Fiksasiya**

Materialların sitogenetik analizinin keyfiyyət göstəricilərinin əsas şərtlərindən biri sitogenetik analiz üçün lazım olan hüceyrə strukturunun tamlığını saxlamaqdandır ibarətdir

ki, buna da hüceyrəyə asan daxil olan fiksatorla nail olmaq olar. Elə etmək lazımdır ki, fiksə olunan materialların hamısı bütövlükdə bir bərabərdə fiksə olunsun. Bunun üçün fiksə olunan material mütləq təzə olmaqla, ölçüsü iri olma malıdır (5 mm-dən artıq olmaz) və bütünlükdə fiksə olunan məhlulla örtülməlidir. Fiksə məhlulunun həcmi, fiksə olunan materialın həcmindən 50-400 dəfə artıq olmalıdır.

Bundan əlavə fiksator hüceyrənin biokalloid sistemini həll olmayan vəziyyətdə saxlamaqla onların hüceyrədən çıxmasının qarşısını alır.

Fiksatorlar, fiksə etmə vaxtı onun temperaturu, nəzərdə tutulan tədqiqata və tədqiq olunan obyektin xüsusiyyətinə uyğun seçilir. Nəzərə almaq lazımdır ki, bitki toxuması heyvan toxumasına nisbətən tədricən fiksə olunur ki, bu da bitki hüceyrələrinin heyvan hüceyrələrinə nisbətən qalın sellüloz təbəqəsi ilə əhatə olunmasından irəli gəlir.

Sitogenetik analizdə nüvə və xromosom analiz edilərkən nüvə faktorlarından istifadə olunur ki, onlar da sulu və yaxud spirtli ola bilər (əlavə I-a bax).

Spirtli fiksatorlar (Karnuz, Yakovlev, Sirkə alkoqolu, Çemberlen) toxumaya tez daxil olur, material tez fiksə olunur və ona görə də onlar spirtli fiksatorlarda az (obyekt-dən asılı olaraq 30 dəqiqədən 12 saatə qədər) saxlanıla bilər. Lakin, spirtli fiksatorlar müvəqqəti preparatlar düzəldilərkən əlverişlidir. Sulu fiksatorlar (Navaşin, Madilevski) bitki toxumasına daxil olaraq onları mühafizə etməklə, parafin-ləmək işini asanlaşdırır. Sulu fiksatorlar toxumaya tədricən daxil olur, ona görə də materiallar həmin fiksatorlarda 24 saatdan bir neçə günə qədər saxlanıla bilər.

### **3.3. Müvəqqəti preparatların hazırlanması**

Təcrübənin məqsədindən, analizin vaxtından və obyektdən asılı olaraq, preparatlar müvəqqəti, daimi mikrotom preparat və s. formada hazırlanara bilər.

Müvəqqəti preparat hazırlamanın üstünlüklerindən biri onun sadə və tez hazırlanması ilə yanaşı, mürəkkəb proseslər tələb edən işlərə ehtiyacın olmamasıdır.

Fiksə olunmuş və lazımi hazırlıq mərhələsi (maserasiya və s.) keçmiş materialların analizini tezləşdirmək lazımdır, bitki və heyvan toxumalarından müvəqqəti preparatlar hazırlanır. Bunun üçün material xüsusi nüvə rəngləyiciləri ilə rənglənir. Rənglənmiş materialdan lazımi hissə götürülüb əşya şüşəsinin üstünə əvvəlcədən bir damla tökülmüş qatı xloralhidrata və yaxud 45 faizli sirkə turşusuna qoyulur və örtücü şüşə ilə ehtiyatla örtülür. Örtücü şüşənin ehtiyatla qoyulmasında məqsəd ondan ibarətdir ki, örtücü şüşə yerindən tərpənməsin. Sonra süzgəc kağız ilə müəyyən əşyalarla (qələm, kibrit çöpü, barmaq və s.) örtücü şüşə əşya şüşəsinə doğru sıxlır. Nəticədə əşya şüşəsinin üzərində toxuma hüceyrələrinin bir qatından ibarət təbəqə əmələ gəlir və bu sitogenetik analizi asanlaşdırır. Müvəqqəti preparatları bir neçə müdədət saxlamaq lazımdır, örtücü şüşənin kənarları maye parafinlə, rezin yapışqanı ilə, jelatin sirkə turşusunu (10 mq jelatin 100 ml 50 faizli sirkə turşusunda) qarışığı ilə haşiyələmək lazımdır. Preparat yaxşı olar ki, soyuducuda 0-4°C-də saxlansın.

Sitogenetik analiz üçün preparatların hazırlanması prosesində əsas həlqələrdən biri, hər bir obyekt üçün xüsusi və dəqiq olan rəngləyicinin seçilməsidir. Rəngləyici maddələrin

seçilməsi eyni zamanda istifadə olunan fiksasiyadan da aslıdır.

Daimi və müvəqqəti preparatlarda nüvənin strukturunu analiz etmək üçün «əslərlə» və yaxud «kationlara» bölünmiş nüvə rəngləyicilərindən istifadə edilir (əlavə 2-yə bax). Əsas nüvə rəngləyiciləri (cation və anion), nüvənin nuklein turşusu və zülali ilə turş xassəyə malik duza oxşar birləşmə əmələ gətirərək hüceyrənin strukturunu rəngləyir. Azur P-eozin, göy metil; göy toluidin, yaşıl metil, əsas fuksin və s. daha çox istifadə olunan boyayıcı maddələrdir. Rəngab boyayıcılarla (hematoksilin), hüceyrələri rəngləmək üçün materiallar əlavə olaraq aşılıyıcı maddələrlə, daha doğrusu, duz tipli birləşmələr əmələ gətirən ammonium, dəmir, mis duzları və s. işlənmişdir.

Mərhələlərin ardıcılığından asılı olaraq rəngləmə üsulları şiddətli və zəif olur. Şiddətli üsulla boyanma vaxtı preparat boyayıcının zəif məhluluna salınır və boyanmanın keyfiyyəti mikroskopla yoxlanılır. Hər bir obyekt üçün müvafiq rəngləmə müddəti təcrübi yolla seçilir. İkinçi halda, zəif rəngləmə müddəti təcrübi yolla seçilir. İkinci halda, zəif rəngləmə üsulunda, preparat qatı rəngləyici ilə rənglənir, sonra isə xüsusi seçilmiş məhlullardan istifadə etməklə, lazımı səviyyəyə çatana kimi rəng kənar edilir. Bu halda da preparatın keyfiyyəti mikroskopla yoxlanılır.

Məsələn, hematoksilinlə rənglənmənin seçilməsi 3 mərhələdə aparılır: preparat zəylə aşilanır, hematoksilinlə rənglənir, sonra isə zəif zəy məhlulu ilə rəngin artığı yuyulub təmizlənir.

### **3.4. Müvəqqəti preparatların daimi preparatlara keçirilməsi**

Müvəqqəti preparatların daimi preparatlara keçirilməsi üçün geniş tətbiq edilən üsul Honger və Farçayld (*Conger, Faircheld*, 1953) tərəfindən quru buzdan istifadə edilməsinə əsaslanır. Lakin bu üsul karminlə rənglənmiş preparatlar üçün məsləhət görülmür.

Müvəqqəti preparatları daimi preparatlara keçirmək üçün onları quru buzun üzərində olan hər hansı bir metal lövhənin üzərinə qoyub 5-10 dəqiqə saxlamaq lazımdır. Bundan sonra ülgüt və yaxud cərrah bıçağı ilə örtücü şüşə əşya şüşəsi üzərindən qoparılır və hüceyrə əşya şüşəsinin üzərində qalır. Sonra materialın nəmliyini almaq üçün (iki mərhələdə) 70, 96, 100 faizli etil spirtdən və ksiloldan keçirilir və son mərhələdə hüceyrənin üzərinə kanad balzamı töküülür və təmiz örtücü şüşə ilə örtülür.

Asetokarminlə rənglənmiş preparatlardan ötürüçü şüşəni qoparmaq üçün preparati 10 faizli sirkə turşusu məhluluna salırlar və 10-15 dəqiqədən sonra örtücü şüşə əşya şüşəsindən ayrılır. Üzərində hüceyrə olan əşya şüşəsi ardıcıl olaraq: sirkə alkoqolundan, mütləq spirtdən, ksiloldan keçirilir və balzamla örtülür.

Fyulgen üsulu ilə əsas fuksinlə rənglənmiş heyvan və bitki toxumaları olan əşya şüşəsindən örtücü şüşəni aralamaq üçün əşya şüşənin üz hissəsi aşağı, içərisində 40 faizli spirt olan Petri piyaləsinə salınır (*Darlington, Zabaur*, 1980) 8-10 dəqiqədən sonra örtücü şüşə əşya şüşəsindən ayrılır. Sonra örtücü və əşya şüşəsini 80 faizli (2 dəqiqə) və mütləq spirtdən (2 mərhələdə 2 dəqiqə olmaqla) keçirilir və örtücü şüşə ilə əşya şüşəsi örtülür və balzamla bağlanır.

### **3.5. Daimi mikrotom preparatlarının hazırlanması**

Müvəqqəti preparatların bəzi üstünlüklerinə baxmaya-raq, əksər hallarda onlar qarşıya qoyulan məqsədə nail olmaq üçün tələbatı ödəmir. Belə olan halda obyektin parafinlə bağlamaq üsulu ilə daimi preparat hazırlanır.

Bu üsulla daimi preparat hazırlanıqdan, tədqiq olunacaq obyekt çox mürəkkəb hazırlıq mərhələsindən keçirilir və ardıcıl olaraq aşağıdakı proseslərdən: fiksasiyadan əvvəl materialın xüsusi hazırlanması, fiksasiya prosesi, fiksə olunmuş materialın yuyulması, tədqiq olunacaq materialın, qatılığı tədricən 100 faizə qədər artan spirt məhlullarında nəmsizləşdirilməsi, parafin həllədicisinin materiala hopdurulması, materialın parafinlə örtülməsi, parafin bloklarının düzəldilməsi, onlardan kəsiklərin hazırlanması, parafinin kənar edilməsi, kəsiyin rənglənməsi, materialın yenidən nəmsizləşdirilməsi, ksilolla spirtin qovulması və örtücü şüşənin balzamda bağlanmasıdan ibarətdir.

Materialların fiksasiyaya hazırlanması, fiksasiya, obyektin rənglənməsi və bu proseslərin ümumi prinsipləri haqqında biz yuxarıda danışdıq. İndi isə işiq mikroskopu üçün daimi preparatların hazırlanması ilə tanış olaq.

Fiksasiyadan əvvəl materialların xüsusi hazırlanması üçün mərhələlər üzrə aşağıdakı amillərin təsirindən:

1) Xromosomların uzunluğunu qısaltmaq (0,3-1 faizli xloralhidrat məhululundan; 0,002 M8-oksixonilin məhululundan, paradoxorbenzolun və monobromnaftalinin qatı məhululundan; aşağı temperaturdan).

2) hüceyrəni metafaza mərhələsində saxlayan kolxit-sindən, kolsemiddən, vinkristindən və vinblastindən;

3) hipotonik və maserasiya edici amillerdən istifadə edilir.

**Fiksasiya.** Materiallar su və yaxud spirt qarışqlı fiksədici maddələrlə ağız kip bağlı qablarda fiksə olunur (əlavə 1-ə bax). Nüvə fiksatorlarının seçilməsi, fiksasiya müddəti və temperatur rejimi hər bir konkret şəraitdən, məqsəddən və tədqiq olunan obyektin xüsusiyyətindən asılıdır. Əgər toxuma su və qanla zəngindirsə, yaxşı olar ki, fiksator iki dəfə dəyişdirilsin.

Fiksə olunmuş materialları fiksatorların qalığından və onların parçalanma məhlullarından təmizləmək üçün yoxlamaq lazımdır. Su qarışqlı fiksatordan sonra material axar su altında 1-3 saat ərzində və daha çox yaxalanır. Sonra materiallar qurumasın deyə onları ardıcıl olaraq müxtəlif faizli (20, 40, 60, 80) spirt məhlullarının hər birində 30 dəqiqə saxlamaq lazımdır. Spirt qarışqlı fiksatordan sonra material 3 dəfə dəyişdirilməklə 80 faizli spirtlə yaxalanır və sirkə turşusunun iyi tam itənə qədər 1-2 saat müddətində həmin spirt məhlulunda saxlanır. Su və spirt qarışqlı fiksatorlarla fiksə olunmuş materialları uzun müddət 80 faizli spirtdə saxlamaq olar.

Daimi preparatların hazırlanmasında mürəkkəb və çox zəhmət tələb edən proseslərdən biri preparatların nəmsizləşdirilməsidir.

Bunun üçün materiallar iki növbədə 96 faizli və mütləq spirtdə 0,5 dəqiqədən 1 saata qədər saxlanılır.

Material saxlanılan mühitin tərkibinin kəskin dəyişməməsinə yol verilməməsi, spirtin tədricən artan qatılığından istifadə edilməsi, sonralar isə spirtin hissə-hissə parafinlə və onun həlledicisi ilə əvəz olunması, bütün bu işlərin mərhələ ilə aparılması fiksə olunmuş materialda hüceyrə strukturunun tamlığını saxlamaqdan ibarətdir.

### **3.6. Parafin həllədicisinin materiala həpdurulması**

Materialların müxtəlif məhlullardan keçirilməsində son məqsəd hüceyrəyə, onun strukturuna maddələrin müntəzəm keçməsini nizamlayan, onlardan xüsusi mikrotom cihaz ilə nazik kəsik alınmasını təmin edən plastik sıx maddəyə salmaqdan ibarətdir.

Sitogenetik tədqiqatlarda belə maddə kimi parafindən və az hallarda isə selliloiddən və jelatindən istifadə edilir. Daha çox plastikliyə malik olan və qalınlığı 5-10 mkm olan kəsik, parafinə salınmış materialdan alınır.

Parafin suda və spirtdə həll olmur. Buna görə də obyekti parafinə salmaq üçün hüceyrədəki suyu ardıcıl olaraq spirtlə sonra parafinin həllədicisi olan xloroformla, ksilolla, benzol və toluolla əvəz etmək lazımdır. Bu həllədicilər içərisində tələbata dolğun cavab verən xloroform və ksiloldur. Kiçik obyektlərlə işləyən zaman parafini həll etmək üçün nəmsizləşdirilmiş xloroformdan, böyük obyektlərdə işləyəndə isə ksilol və toluoldan istifadə edilir.

Mütləq spirtin parafin həllədicisi ilə tədricən əvəz olunması məqsədi ilə material xloroform və ksilola dərhal keçirilmir. Bunun üçün bir neçə mərhələdə müxtəlif spirt qarışığında, həllədicinin qatılığını tədricən artırmaqla həyata keçirilir.

I – 1 hissə həllədici 3 hissə mütləq spirt;

II – 1 hissə həllədici 1 hissə mütləq spirt;

III – 3 hissə həllədici 1 hissə mütləq spirt.

Material hər bir qarışqda onun həcmindən asılı olaraq 1 saatdan 3 saata qədər saxlanılır və sonra isə 2 mərhələdə təmiz həllədicidən keçirilir. Təmiz həllədicinin hər bir mərhələsində material 1 saatdan 10 saata qədər və daha çox

saxlanıla bilər. Material tam nəmsizləşdirildikdə o təmiz həlleidicidə şəffaf olur. Bəzi hallarda parafin blokunda obyektin yerini müəyyən etmək üçün 70 faizli eozin və spirtdə həllədici qarışığına (3:1) fuksin əlavə edilir.

Parafinin materiala hopdurulması və materialın parafinə yapışdırılması ərimə temperaturu 52-54°C-ə olan parafin həllədicerinin bir-birini əvəz etməsi yolu ilə həyata keçirilir. Bunun üçün materiala axırıcı həllədicerindən təzə həllədici olan byuksa keçirilir və material həllədicerinin səviyyəsindən 3-4 mm aşağıda qalmalıdır. Sonra həllədicerinin üst təbəqəsinə 1:1 nisbətində əridilmiş parafin və həllədici qarışığı tökülür. Səthdə əmələ gələn parafin qarışığının təbəqəsi mayenin tez buxarlanması mane olur. Parafinin materiala yaxşı hopdurulması üçün byuksa ağızı bağlı halda, gün ərzində parafinin ərimə temperatur dərəcəsindən 3-4° yuxarı olan sabit 56-57°C-də saxlanılır. Sonra byuksun qapağı götürülür və byuksun içərisindəki həllədici tam buxarlanana qədər həmin temperaturda saxlanılır. Həllədicerinin tam buxarlanması 2-5 gündən sonra başa çatır və tam buxarlanması parafin iyinin olmaması ilə müəyyən etmək olur. Bundan sonra byuksa bir qədər təmiz əridilmiş parafin tökülür və byuksun içərisində olan qarışıqlar xüsusi kağız qutulara tökülür və onlar soyuq suyun üzərinə qoyulur. Obyektin qutuda bərabər sahədə yayılmasını təmin etmək üçün qızdırılmış pinsetdən və yaxud preparat hazırlayan iynədən istifadə edilir. Tez soyuma nəticəsində parafin kristallaşa bilmir. Çensev əməkdaşları isə (1977) başqa bir təklif irəli sürmüdüdür. Onun təklifinə görə byuksun içərisində olanlar saat şüşəsinin üstünə tökülür və saat şüşəsinin arxası soyuq suya qoyulmaqla soyudulur.

Qeyd etmək lazımdır ki, materialın yapışdırılması üçün

istifadə edilən parafin, uçucu və mexaniki qarışqlardan təmizlənmiş olmalıdır. Bunun üçün yaxşı olar ki, parafin əridilsin və bir neçə gün termostatda saxlanılsın. Parafini qızdırılmış qıfdan süzməklə mexaniki qarışqlardan təmizləmək olur. Parafinin keyfiyyətini yaxşılaşdırmaq üçün 5-10 faizli təmiz arı mumu və 5 faizli stearin əlavə etmək lazımdır.

### **3.7. Parafin bloklarının və onlardan kəsiklərin hazırlanması**

Material uzun müddət sərin yerdə saxlanılır. Lazım olduqda obyekt az miqdarda parafinlə birlikdə qızdırılmış cərrah biçağı ilə kəsilir və onun köməkliyi ilə ağac tutacağına bərkidilir. Ağac tutqacı əvvəlcədən nazik parafin təbəqəsi ilə örtülür və obyektin nömrəsini bildirən kağız etketi onun yan səthinə yapışdırılır. Parafin bloku suda soyudulur, onun artıq parafini kəsilir və ona piramid forması verilir, lakin materialın kənarlarında 1-2 mm parafin artıq saxlanılır.

Parafinlə örtülmüş materialdan kəsik xüsusi alətlərdə mikrotomlarda hazırlanır. Biz burada mikrotomun texniki hissəsləri və onda kəsiklərin hazırlanması qaydalarından ətraflı danışmaq istəmirik, çünki hər bir alət üçün onun texniki təsviri haqqında məlumat verilmişdir. Lakin biz burada kəsiyin keyfiyyətinə təsir edən bir neçə şərtlər üzərində dayanmaq istəyirik.

Keyfiyyətli kəsik alınmasının əsas şərtlərindən biri biçağın yaxşı vəziyyətdə olmasıdır. Biçaq iti və düzgün itilənməlidir. Bundan əlavə, parafin blokla işləmək üçün yastı əyilmiş formaya malik olan biçaq tutacağa möhkəm bərkidilməlidir. Kəsiyin keyfiyyəti həmçinin müəyyən dərə-

cədə bıçağın meylik bucağı ilə də müəyyən edilir. Bıçağın meylik bucağı adətən  $15^{\circ}$  olmalıdır (Censov və b., 1977). Kəsiyin keyfiyyəti eyni zamanda parafinin keyfiyyətindən, iş otağının temperaturundan və parafinə salınmış obyektin kütləsindən asılıdır.

### 3.8. Kəsiyin əşya şüşəsi üzərinə yapışdırılması

Mikrotomla alınmış kəsiklər seriyası ardıcılılığına riayət etməklə onlar əşya şüşəsi üzərinə köçürürlər. Bunun üçün əşya şüşəsi xrom qarışığında (1 l qatı sulfat turşusu və 80 qr kalium hidroxromat) təmizləndikdən sonra axır və distillə suyunda yuyulur, termostatda qurudulur və 70 faizli spirt və efir qarışığında ağız kip tixacla bağlanmış bankada saxlanılır.

Çox vaxt kəsiyi əşya şüşəsinin üzərinə yapışdırmaq üçün Mayer albumininindən 25 ml yumurta ağı, 25 ml qliserin, 0,5 qr qliserinlə zülal qarışığından istifadə edilir. Bunun üçün toyuq yumurtasının ağı kağız süzgəcdən süzülür və 1:1 nisbətində qliserinlə qarışdırılır və qarışığa kristal antiseptik timol da əlavə edilir. Əşya şüşəsi zülal qliserin qarışığı təbəqəsi ilə örtülür, havada qurudulur və sonra əşya şüşəsi üzərinə sahəsi örtücü şüşənin sahəsindən bir qədər az olan distillə suyu və ya 20 faizli spirt əlavə edilir. Mikrotomla alınmış kəsiklər mayenin səthində yerləşdirilir və bu vəziyyətdə preparat qızdırıcı stol üzərində müəyyən müddət saxlanılır. Bu müddət ərzində parafin əriməməlidir. Əşya şüşəsi üzərində olan mayenin artığı süzgəc kağızı ilə çıxarıılır və beləliklə kəsiklər tamamilə əşya şüşəsinə yapışır. Preparatlar ağaç kəsik üzərinə yerləşdirilir və termostatda  $35-37^{\circ}$  temperaturda bir neçə gün tam quruyana qədər saxlanılır.

### **3.9. Kəsiklərin parafinsizləşdirilməsi və rənglənməsi**

Preparatları rəngləmək üçün kəsiklər, hüceyrə strukturuna rəngləyicinin daxil olmasına və həmçinin sitoloji tədqiqatlarda sulu rəngləyicilərdən istifadə edilməsinə Mənecilik törədən parafindən təmizlənməlidir. Bu əməliyyat aşağıdakı mərhələlərdən ibarətdir.

1. həllədicilərlə parafinsizləşdirmə (ksilol, benzol, toluol).

a) preparatı I-ksilol məhlulunda 10 dəqiqə saxlamalı  
b) preparatı II-ksilol məhlulunda 10 dəqiqə saxlamalı

2. həllədicinin spirtlə əvəz edilməsi

a) preparatı 96 faizli spirtlə yumalı

b) yuyulmuş preparatı 86 faizli I spirtdə 10-15 dəqiqə saxlamalı

c) preparatı 96 faizli II-spirtdə 10-15 dəqiqə saxlamalı

ç) preparatı 90 faizli spirtdə 2-5 dəqiqə saxlamalı.

3. Spirtin su ilə əvəz edilməsi

a) preparatı distillə suyu ilə yumalı,

b) preparat ardıcıl olaraq I, II və III mərhələdə, hər birində 15-30 dəqiqə olmaqla distillə suyunda saxlanılır.

4. Suyu rəngləyicilərlə rəngləmə (əlavə 2). Nüvə strukturunun rənglənməsi üçün rəngləyicinin seçilməsi, obyektin xüsusiyyətindən və məqsəddən asılıdır.

**Nəmsizləşdirmə və spirtin ksilolla əvəz olunması.** Rənglənmiş preparatlar 20-30 dəqiqə müddətində axar suda yuyulur və sonra kanada balzamında saxlamaq üçün 96 faizli və mütləq spirtdə 10 dəqiqə ərzində susuzlaşdırılır və ksiloldan material açıq rəng alır və şəffaflaşır.

Şüa sindirma göstəricisi, şüşə və toxumanın şüa sindirma göstəricisi arasında olan Kanada balzamı

kəsiklərin yerləşdirilməsi üçün ən yaxşı mühit hesab olunur.

Kanada balzaminin optiki xassəsi, ksilolda, benzolda yaxşı həll olması, tez quruması və uzun müddət qalması kimi xüsusiyətləri nəzərə alınaraq daimi preparatların hazırlanmasında geniş istifadə edilir.

Kəsikləri örtütü şüşənin altında yerləşdirmək üçün, preparati təmiz ksiloldan çıxarmaq və ksilol tam buxarlanmamış kəsiyin səthinə bir damla balzam əlavə edib və təmiz örtütü şüşə ilə örtmək lazımdır. Ksilolun və balzamin artığı süzgəc kağızı ilə kənar edilir. Bir-iki gündən sonra preparati analiz etmək olar.

### **3.10. Quru hava preparatlarının hazırlanması**

Balıqların, məməlilərin və insanların hüceyrə kulturlarında xromosom dəyişilmələrini və bacı xromatidlər mübadiləsini analiz etmək üçün, fiksə olunmuş hüceyrə suspenziya preparatlarını qızdırmaq və yaxud fiksator havasında qurutmaq üsulu işlənib hazırlanmışdır.

Qisa və uzun müddətli kultura olunan hüceyrə və toxuma kulturalarından quru hava preparatları hazırlamaq üçün hüceyrə suspenziya qarışığı hipotonizasiya və əlavə işlənmə üsullarından sonra tədricən 5-6 ml soyuq fiksatora töküür. Fiksatorun hüceyrəyə lazımı miqdarda daxil olmasına təmin edən müddətdən sonra hüceyrə 10-15 dəqiqə müddətinə soyuducuya qoyulur, sentrifuqadan keçirilir və alınmış çöküntünün üzərinə təzə fiksator əlavə olunur və həmin müddətə yenidən soyuducuya qoyulur. Bu proses çöküntü təmiz ağ rəng alana və fiksator şəffaflaşana qədər davam etdirilir.

Fiksatorun sonuncu dəyişilməsi vaxtı nazik paster

pipetkası vasitəsi ilə 0,2-1,0 ml həcmində çöküntü götürülür və hüceyrə əşya şüşəsi üzərinə köçürülür. Bunun üçün 1-3 damla suspenziya 5-7 sm hündürlükdən kimyəvi təmiz soyuq əşya şüşəsi üzərinə damcılmalıdır. Şüşə üzərinə düşən damları ehtiyatla üfürmək lazımdır ki, damla yayılaraq çox sahə tutsun və qurusun. Əşya şüşəsi üzərindəki hüceyrə qarışığını spirit lampası üzərindən bir neçə dəfə keçirməklə qurutmaq olar. Sonuncu əməliyyat metafaza lövhəsində xromosomların normal yayılmasını və onların bir səviyyədə yerləşməsini təmin edir. Qurudulduqdan sonra seçmə yolu ilə preparatların asetokarminlə rənglənməsini və onların keyfiyyətini mikroskopla yoxlamaq olar.

Xromosom strukturlarının dəyişilməsini analiz etmək üçün preparatlar Fyulgenə görə, azur II – eozin və yaxud Unna mavisinə görə rənglənir. Bacı xromatidlərinin mübadiləsinin identifikasiyası üçün isə rəngləmədə Xaxet – bimza metodundan istifadə edilir.

**Bitki toxumu kökcüyünün meristem hüceyrələrinin sitogenetik analizi metodu.** Bitkilərin somatik hüceyrələrində xromosom strukturunun dəyişilməsini və mitotik aktivliyi analiz etmək üçün ən əlverişli material cürcəti kökcüyünün böyüyən sahəsi – meristem hüceyrələridir. Meristem hüceyrələri aktiv bölünmə qabiliyyətinə malikdirlər.

Spontan mutasiyanı öyrənmək üçün toxum Petri piyaləsinə süzgəc kağızı üzərinə düzülür və su ilə ısladılır. Kimyəvi birləşmələrin sitogenetik təsir dərəcəsini analiz etmək üçün kontrol olaraq adı suda cürcərdilmiş materiallardan istifadə olunur. Əgər maddə suda həll olmayıb xüsusi həllədicidə həll olursa, onda həllədicidə cürcərdilmiş material kontrol kimi götürülür. Tədqiqatın məqsədindən asılı olaraq toxumlar kimyəvi birləşmələrdə və kontrol

variantında kökcüklerin fiksasiyasına qədər cürcərdilir.

Tədqiqat işlərinin məqsədindən asılı olaraq fiziki amillərin sitogenetik təsirini öyrənmək üçün quru toxumlara və yaxud cürcərdilmiş toxumlara müəyyən dövrdə fiziki amillərlə təsir edilir. İçərisində toxum olan Petri piyalələri 23-25°C temperaturu olan termostata qoyulur. Toxumlar termostatda birinci mitozun başlanması qədər cürcərdilir, cürcərmə müddəti isə hər bir bitki növü üçün müxtəlifdir. Hər bitki növü üçün kökcükler müəyyən ölçüdə fiksə olunur. Fiksə olunmuş materiallardan sitogenetik analiz üçün yuxarıda qeyd olunan üsullara əməl etməklə daimi və müvəqqəti preparatlar hazırlanır.

### **3.11. Yarpaqların meristem hüceyrələrinin sitogenetik analizi (*Bovner Halloran, 1981*)**

Kökcüğün meristem hüceyrələrində genom mutasiyalarının, xromosom dəyişilmələrinin və mitotik indeksin sitogenetik tədqiqi həmişə istənilən nəticəni vermir. Belə hallarda tədqiqatçılar rüseym yarpaqcığının meristem hüceyrələrinin sitogenetik analizini aparırlar ki, bu metod məlum metodlar içərisində yerinə yetirilməsinə və sadəliyinə görə daha əlverişli metod hesab olunur.

Tədqiqat işi aşağıdakı ardıcılıqla aparılır: toxum yesiyə basdırılır və çıxan cürcəti 25°C-lə istixanada təbii işıqda saxlanılır. Bu şəraitdə cürcətmə, sitogenetik analiz üçün rüseym yarpaqcığında fasıləsiz olaraq bölünməni və lazımı miqdarda hüceyrə olmasını təmin edir. 3-4 əsas və bir neçə əlavə cürcəti çıxdıqdan sonra rüseym yarpaqcığı sitogenetik analiz üçün istifadə edilir.

Preparatın hazırlanması isə aşağıdakı mərhələlərdən

ibarətdir:

1. Cücərti əsas (7-10 mm) rüşeym qabarcığı ilə birlikdə monobromnaftalinin doymuş məhluluna salınır və otaq temperaturasında 4 saat saxlanılır.
2. Material yuyulur və 15 dəqiqə müddətində fiksatora (3:1) keçirilir. Materialları uzun müddət saxlamaq üçün onu 70 faizli spirtə keçirmək lazımdır.
3. Material 60°C-də In HCl-da 14 dəqiqə hidroliz olunur.
4. Material fuksinə keçirilir və onun meristem sahəsi tünd qırmızı rəng alana qədər burada qalır.
5. Cücərti 1 damla 45%-li sirkə turşusuna salınır, rənglənməyən sahə rənglənmiş sahədən kəsilib ayrılır.
6. Material örtüyü şüşə ilə örtülür və yüngülə üstdən basılır ki, meristem toxuması bir qatda yayılsın.
7. Preparat bir neçə dəfə spirt lampası üstündə qızdırılır.
8. Sirkə turşusunun artığını çıxartmaq üçün örtüyü şüşə baş barmaqla əşya şüşəsinə sıxlır və kənarlara çıxmış sirkə turşusu süzgəc kağıza hopdurulur.
9. Xromosomlar yaxşı rəngəlməyib sə örtüyü şüşənin kənarlarına az miqdarda asetoarsein əlavə edilir və rəngin şüşənin altına keçməsinə şərait yaradılır.

Preparatdan uzun müddət istifadə etmək üçün onu quru buz üzərinə qoyurlar. Lazım gəldikdə isə preparati otaq temperaturuna və yaxud 40°C olan termostata keçirmək lazımdır.

Bu üsuldan istifadə edərək tədqiqatçılar buğdanının (*Triticum aestivum*) yulafın (*Avena Coliva*) və arpanın (*Hordeum Vulgare*) yarpaq meristemlərindən çoxlu mitozu olan preparatlar almışlar.

Fiksasiyadan sonra material maserasiya üçün 5 dəqiqə müddətinə qatı xlorid turşusu ilə metil spirtinin qarışığına (1:1) salınır və nəticədə hüceyrə divarını təşkil edən pektin maddəsi həll olur və material yumşalır. Material yuyulduqdan sonra asetokarminə keçirilir və daha yaxşı rənglənməsi üçün spirt lampası üzərində qızdırılır.

Yarpaq toxumalarını eyni vaxtda maserasiya etmək və rəngləmək üçün bir neçə üsul mövcuddur. Bunun üçün fiksə olunmuş materialı saat şüşəsi üzərinə 2 faizli asetoarsein və yaxud 2:1 nisbətində standart asetolakmoida və 1 N *HCl*-a salınır. Sonra material 2-3 dəfə spirt lampası üzərində qızdırılır və 10-30 dəqiqə saxlanılır. Yarpağın bir hissəsi əşya şüşəsinin üstündə təzə hazırlanmış bir damla asetoarseinə və yaxud asetolaksoidə keçirilir və örtücü şüşə ilə örtülərək preparat hazırlanır.

### **3.12. Toxumalarda və hüceyrə kulturalarında xromosom dəyişilmələrinin analiz metodu**

İnsan və heyvanların kultura olunan somatik hüceyrələrində xromosom aberrasiyalarının sitogenetik analiz metodu, ətraf mühitin amillərinin təsirini istər *in vivo* və istərsə də *in vitro*-da öyrənmək üçün ən əlverişli üsuldur.

Toxumanın ilkin eksplantasiyasından və onun kultura olunma texnikasından asılı olaraq bir neçə toxuma və hüceyrə növü ayırd edilir. Ən çox yayılan və istifadə edilən növ bir laylı və suspenziyalı kulturadır. Bir laylı toxumanın hüceyrəsi, sitogenetik analizlərin aparılması üçün münasib modeldir. Bir laylı hüceyrə toxumasının iki əsas növü ayırd edilir: ilkin və köçürürlən.

Ilkin hüceyrə toxuması bilavasitə insan və heyvanlarının

embrional inkişaf dövründə maliqnizə olunmamış toxuma-sından alınır. Belə toxumaların yaşama müddəti məhduddur. Müəyyən dövr keçdikdən sonra onlarda spesifik olma-yan degenerasiya hadisəsi baş verir ki, bu da özünü sitop-lazmanın qranulyasiyasında, hüceyrənin girdələşməsində, hüceyrə və substrat arasında əlaqəninitməsində göstərir.

Bəzi hüceyrələr isə degenerasiya olmalarına baxma-yaraq, onlar böyümə və çoxalma qabiliyyətlərini saxlaya bilirlər. Belə hüceyrələr *in vitro*-da sonsuz çoxalma qabiliyyətlərinə malik olmaqla, onları bir neçə dəfə təkrar əkdikdə onlar sonra köçürürlən toxuma hüceyrələrinə başlangıç verirlər. Köçürürlən hüceyrələrin əsas üstünlükleri ondan ibarətdir ki, onlar ilkin kulturaları nisbətən, süni qidalı mühit-də becərilən mikroorqanizmlərə uyğun olaraq, organizm-dən kənarda fasılısız olaraq çoxalma qabiliyyətinə malikdirlər.

Hüceyrə kulturaları üzərində təcrübələr aparıлarkən, müvafiq avadanlıqlardan, geniş çeşiddə məhlullardan, qidalı mühitdən və s. istifadə olunur.

Kulturalarda hüceyrələrin böyüməsi üçün müxtəlif sintetik, yarımsintetik və təbii qidalı mühitlərdən istifadə edilir.

Hüceyrə kulturaları üçün qidalı mühit hazırlayarkən iki əsas məsələni həll etmək lazımdır. Birinci çalışmaq lazımdır ki, qidalı mühit hüceyrənin *in vivo*-dakı mühitinə maksimum uyğun olsun, ikinci tərəfdən standart şərait yaratmaq üçün qidalı mühitin tam tərkibini bilmək lazımdır.

Sitogenetik analiz üçün test sistem kimi istifadə olunan köçürürlən (insan və heyvanların diploid hüceyrə xətti) hüceyrə kulturalarının kultura olunmasında ən çox istifadə olunan qidalı mühit I99, əsas və minimal qidalı mühit *İqla*

sayılır.

Hüceyrə kulturaları üçün müxtəlif növ zərdablardan istifadə olunur. Qidalı mühitdə 5-10 faiz zərdab olmazsa hüceyrələrin çoxalması və bir layın alınması mümkün deyildir. Zərdablar içərisində buğa zərdabı geniş istifadə edilir. Buğa zərdabı ilə yanaşı eyni zamanda at, dovşan, buzov, insan zərdabı və s. istifadə olunur.

Müxtəlif xətli hüceyrələrin çox hissəsi yuxarıda qeyd olunan qidalı mühitlərdən hər hansı birinə pH – 6,8-7,2 olan 5-10 faiz zərdab əlavə etdikdə yaxşı inkişaf edir. Bəzi hallarda hər iki qidalı mühitdən eyni miqdarda (45% iqlə 45% 199) və 10% buzov zərdabı qarışığından istifadə olunur.

Hüceyrə kulturaları ilə işləyən vaxt aseptika qaydalarına düzgün riayət etmək lazımdır. Hüceyrə kulturası olan qidalı mühitdə mikroorqanizmlər olduqda çox yaxşı inkişaf edirlər. Standart qidalı mühitlərdən birinin tərkibinə antibiotik daxil edilirlər ki, o da maddələr mübadiləsində iştirak etmir. Hazırda ən çox pensillin, streptomitsin, kanamisin, neomisin, funqizon və başqa antibiotiklərdən istifadə edilir ki, bunlar müxtəlif miqdarda qidalı mühitə daxil edilir.

Kultura olunan hüceyrələrin mikroorqanizmlərlə, bacteriyalarla, mikroskopik göbələklərlə yoluxması çox vaxt hüceyrələrin məhv olmasına səbəb olur. Məhv olmayan yoluxmuş hüceyrələr sitogenetik analiz üçün əlverişli olur, çünki belə hüceyrələrin kariotipi spontan mutasiya spektri dəyişir, bu da analiz vaxtı müxtəlif səhvlərin baş verməsinə səbəb olur.

Kultura olunan hüceyrələri mikroskopik göbələklərdən qorumaq üçün qidalı mühitə antibiotiklər aşağıdakı miqdarda əlavə edilir. Pensillin 100-200 vahid (ml, streptomitsin

100-200 mkq/ml) olmalıdır. Kultura olunan hüceyrələrlə işləyən vaxt son dərəcədə təmizliyə riayət etmək lazımdır (laboratoriya qabları, cihazlar və otaq sterilləşdirilməlidir).

İlkin hüceyrə kulturalarının alınma üsulları, qidalı mühit tərkibləri toxuma və hüceyrə kultura olunan laboratoriya üçün lazım olan avadanlıqlar və sterilizasiya üsulları ilə daha ətraflı M.K.Voroşilov və başqaları (1964), D.B.Qolubev və başqaları (1976) tərəfindən yazılmış əsərlərdə və C.Uoslinin (1976) redaksiyası ilə tərtib olunmuş məcmuələrdə tanış olmaq olar.

İnsanın, heyvanın toxuma və hüceyrə kulturalarından istifadə etməklə (tədqiq olunan hüceyrələrin tipindən asılı olaraq) aparılan sitogenetik analiz metodları aşağıdakılardan ibarətdir:

1. Məməlilərin, amfibilərin və quşların sümük iliyi hüceyrələrindən xromosom preparatlarının düzünə alınma üsulu. Bu üsul çox vaxt tələb etmir və 24 saat müddətində sümük iliyindən sitogenetik analiz üçün preparat hazırlamaq olur.

2. Məhdudlaşdırılmış (insan və heyvanların tam köçürülməyən ştamm diploid hüceyrələri) və uzun müddətli (*Hela*, *HEP-2*, *F*. və b.) hüceyrələrin kultura olunması. Birinci iki üsulda mitozu induksədici amillərdən istifadə edilir.

3. 48-72 saat müddətində periferik qan limfositləri, dalaq, limfa düyünləri hüceyrələrinin kultura olunması. Bu üsulda stimulədici kimi, kultura olunan mühitə fitohemaqlıyutinin əlavə edilir.

### **3.13. Kultura olunmamış sümük iliyi hüceyrələrindən xromosom preparatlarının alınma üsulu**

Sümük iliyi hüceyrələrindən xromosom preparatlarının alınma üsulu ilk dəfə Ford və onunla birlidə müəlliflər (*Ford et al.*, 1956, 1958) tərəfindən verilmişdir. Sonralar bu üsula bir çox alımlər tərəfindən əlavələr və dəyişikliklər edilmişdir (Tjio, Whang, 1962, Voronsov müəlliflərlə 1969, Dimin 1976, Orlov 1976, Merkurovun 1982). Hazırda isə bu əlavələr və dəyişilmələrdən: insanların, məməlilərin, amfibillərin və quşların sümük iliyi hüceyrələrinin sitogenetik analizində geniş istifadə edilir. Sitogenetik analiz üçün kifayət qədər metafaza hüceyrələrinin olması üçün kolxitsin və onun analoqu sintetik kolsemindən istifadə olunur ki, onlar da iy tellərini pozaraq mitozu metafaza mərhələsində saxlayır. Bu məqsədlə maddələr qarın boşluğununa (məməlilər, amfibilər, quşlar), başqa hallarda isə dekapitasiyadan sonra sümük iliyiniə daxil edilir.

I. Əgər sümük iliyi döş və yaxud bud sümüyündən biopsiya, nunksiya üsulu ilə götürülərsə:

1. 0,5-1,0 ml sümük iliyi şprislə dərhal sentrifuqa şüşəsinə keçirilir və buraya:

a) tərkibində 0,86 faiz sodium xlorid məhlulu olan və 0,001 mq/ml kolxitsin və ya kolsemid əlavə edilmiş 6,6 ml sodium fosfat buferindən (pH-7) 2-3 ml və yaxud

b) kolxitsin (0,75 mkq/ml qarışığı olan 5,0-6,0 ml fizioloji məhlul götürüb əlavə edilir.

2. Qarışq suspenziyasızlaşdırılır və 1-2 saat (a, b) 20-30°C-də və yaxud (b) 37°C-də saxlanılır.

3. Qarışq 4-5 dəqiqə 800-1000 dövr dəqiqə sentrifuqada fırlanılır, çöküntünün üst şəffaf hissəsi damcıladıcı ilə götürü-

rülür və buraya 37°C-yə qədər qızdırılmış distilə suyunda hazırlanmış 5-6 ml birfaizli üç əvəzli sodium sitrat məhlulu əlavə edilir. Sınaq şüşəsini yırğalamaqla çöküntü suspensiyasızlaşdırılır və 25 dəqiqə 37°C-də termostatda saxlanılır.

4. Suspenziya sentrifuqada fırladıldıqdan sonra çöküntünün üst şəffaf hissəsi götürülür. Qalan çöküntünü sınaq şüşəsində çalxalamaqla suspenziyasızlaşdırılır və buraya təzə hazırlanmış soyuq fiksator əlavə edilir (1:3 nisbətində soyuq sirkə turşusu və mütləq metanol) və 10-15 dəqiqə soyuducuda saxlanılır. Sentrifuqada firlatma və fiksatorun bir neçə dəfə ardıcıl dəyişdirilməsi, qalıq ağ rəng alana və fiksator isə təmiz və şəffaf olana qədər aparılır.

5. Yenidən sentrifuqada fırladılır, çöküntünün üst şəffaf maye hissəsi kənar edilir, 0,2-1,0 ml təzə fiksator əlavə edilir (çöküntünün həcmindən asılı olaraq) və çöküntü ağ süd rəngi alana qədər suspensizləşdirilir.

6. Təmizlənmiş və soyuducuda saxlanmış suspenziya nazik damcılادıcı ilə 1-3 damla götürülərək, soyudulmuş əşya şüşəsinin üstünə tökülr (əşya şüşəsi 45° bucaq altında tutulur və damla 5-7 sm məsafədən damcılادılır), əşya şüşəsini yanar spirt lampası üzərində saxlamaqla fiksator qurudulur, nəticədə xromosomların əşya şüşəsi üzərində yaxşı yayılması və analizi asanlaşır (*Seherz, Reed, 1962*).

7. Qurudulmuş preparatı Fyulgenə görə və yaxud azur II-eozində rəngləmək olar.

## II. Kolxitsindən istifadə edildikdə:

1) heyvanların qarın boşluğununa hər qram çəkiyə 0,01 ml miqdardında 0,04 faizli kolxitsin məhlulu daxil edilir.

2) bir saatdan sonra heyvan öldürülür, bud sümüyü götürülür, əzələdən təmizlənir və epifiz hissəsi kəsilir. Bud sümüyündən sümük iliyi şprislə götürülür və mülayim (37°C)

hipotonik məhlulla şprisdən istifadə etməklə sınaq şüşəsində yuyulur.

Sonrakı əməliyyatlar yuxarıda qeyd olunan əməliyyatın 4-7-ci bəndinə uyğun aparılır.

### **3.14. Tam və yarı tam köçürülmüş hüceyrə xətlərinin sitogenetik analizi**

Sümük iliyi hüceyrələrinin sitogenetik analizində tədqiqatçıların mutasiya prosesini modifikatorlarla manipulyasiya etmə imkanı məhdud olur, belə ki, bu hüceyrə populasiyalarının bölünmə tsiklinə görə asinxrondur və praktiki olaraq kultura olunmur. Ona görə də mutasiya induktorları ilə aparılan təcrübələrdə canlı orqanizmə təsir etməklə kifayətlənilir.

Buna görə də spontan və induksion mutagenezin praktiki və nəzəri məsələləri ilə işləyən tədqiqatçılar üçün münasib, əlverişli test, insan və heyvanların tam və yarı tam köçürülen hüceyrə kulturalarıdır.

Uzun müddət tam köçürülen hüceyrələr əlverişli obyekt sayılır, ona görə ki, birincisi – heterogen populyasiyalı hüceyrələrin bir neçə tsikli ərzində sitogenetik analizini aparmaq olur: ikincisi hüceyrə tsiklinin müəyyən mərhələlərində blok əmələ gətirməklə, hüceyrələri sinxronlaşdırmaq və hüceyrə tsiklinin müəyyən fazasında yerləşən hüceyrələrində induksiya yolu ilə mutasiya yaratmaq və onları analiz etmək mümkündür. Bu sahədə daha əlverişli test təbii sinxron olan periferik qanın limfosit populyasiyalarıdır, kultura olunan mühitə adı lobya toxumundan alınmış fitohemoqlyutinin (FQA) mukopolisaxarid əlavə etməklə hüceyrələrin bölünmə prosesinə stimulədici təsir göstərmək olar.

Sitogenetik analiz üçün konservasiya şəraitində saxlanmış tam köçürülən hüceyrə xətlərindən, insan və heyvanların embrion (rüşeym) toxumalarından hazırlanmış yarı tam köçürülən diploid kulturalardan istifadə edilir. Məməlilərin hüceyrələrində ekstremal amillərin mutagen aktivliyini öyrənmək üçün aşağıdakılar tövsiyə olunur:

- 1) təcrübənin sxeminə həllədicinin kontrolu və pozitiv kontrol daxil edilmişdir. Spontan mutasiya aşağı olmaqla, ümumi qəbul olunmuş səviyyəyə uyğun olmalıdır.
- 2) öyrənilən maddənin qatılığı geniş diapozonda tədqiq olunmalıdır.
- 3) pozitiv cavab dozanın təsirindən asılı olmalıdır.

Hüceyrə kulturalarından sitogenetik analiz üçün xromosom preparatlarının hazırlanma üsulunun müxtəlifiyi *Rothfels, Siminovitch* (1958), *Mocrheld et al* (1960) və başqaları tərəfindən təklif olunmuş iki əsas üsulun modifikasiyası ilə əlaqədardır. Axırıncı üsul insanların leykosit kulturaları üçün işlənib hazırlanmışdır və eyni zamanda bu üsul tam köçürülən hüceyrə kulturaları üçün də istifadə oluna bilər. *Rothfels and Simnovitch* (1958) metodlarına uyğun olaraq Medvedyev və başqalarının (1969, 1971) modifikasiyaları ilə Kareliya flakonunda və yaxud müxtəlif həcmli bioloji döşəklərdə becərilmiş hüceyrələr trypinizasiya olunur və içində örtücü şüşə qırığı olan pensillin şüşəsinə köçürülür. Üsul aşağıdakı qaydada aparılır:

1. hüceyrə kultura olunan qabdan qida mühiti boşalıdır.
2. hüceyrə layına iliq ( $37^{\circ}\text{C}$ ) – 0,25%-li tripsin, 0,02-0,04%-li versen məhlulu və yaxud onların qarışığı tökülür. Bunun üçün 5ml 2,5%-li tripsin məhlulu 100 ml 0,02%-li versen məhlulunda həll edilir, kulturanın növündən asılı

olaraq otaq temperaturunda saxlanılır və bu halda 3-30 dəqiqə ərzində hüceyrə şüşənin divarından sürüşüb düşür. Termostatda ( $37^{\circ}\text{C}$ ) saxladıqda isə hüceyrənin şüşənin divarından ayrılması sürətlənir.

3. hüceyrə monoqatı yumşaldıqdan sonra tripsin boşalılır müəyyən miqdarda boy maddəsi (kulturanın həcmindən asılı olaraq) tökülür və damcıladicının köməyi ilə homogen qarışq alınır.

4. hüceyrənin miqdarı Qoryayev kamerasında sayıldıqdan sonra qarışq alınmış hüceyrələrin növündən asılı olaraq boy maddəsində əkilmə dozasına qədər həll edilir. Sonra qarışq içərisində örtücü şüşə olan ağızı kif bağlı olan pensillin şüşəsinə tökülür.

Əgər tədqiqatda məqsəd kultura olunan hüceyrələrdə spontan mutasiyanı müəyyən etməkdirsə və şüşənin divarında hüceyrə monotəbəqəsi əmələ gəlibə, onda sitogenetik analizi fiksasiyadan sonra (aşağıya bax) əşya şüşəsi üzərində aparmaq lazımdır. Təcrübənin məqsədi müəyyən mutagen amilin sitogenetik analizini öyrənməkdən ibarətdirdə, onda mutagen amil kulturaya böyümənin loqarifmik fazasında verilir və material fiksasiyası isə hər bir hüceyrə tsiklindən sonra aparılır.

Kultura olunan hüceyrələrin fiksasiyalan əvvəlki hazırlıq işləri və fiksasiyası aşağıdakı qaydada aparılır.

1. Mitotik aktivliyin maksimum dövründə (hər bir hüceyrə kulturası üçün spesifik olan), kultura olunan mühitə kultura olunmanın sonuna 2-4 saat qalmış 0,2-0,5-dən 1,0-1,2 mkq/ml-ə qədər miqdardında kolxitsin əlavə edilir. Kolxitsinin miqdarı və təsiretmə müddəti yaxşı olar ki, hər bir kultura üçün xromosomların spirallaşmasına görə seçilsin.

2. Kolxitsin boşaldılır və sınaq şüşəsinin divarı ilə

ehmallica 37°C-yə qədər qızdırılmış 6-8 ml hipotonik məhlul tökülür. Hər bir kultura hipotonik məhlulların təsirinə qarşı müxtəlif reaksiya cavabı verdiyi üçün, hüceyrənin növündən asılı olaraq aşağıdakı hipotonik məhlullardan istifadə edilir:

- 1) Xenks məhlulu ilə distillə suyunun qarışığı (1:4; 1:5);
  - 2) Əsas İqla məhlulu ilə distillə suyunun qarışığı (1:5; 1:6);
  - 3) 0,7-0,95%-li natrium sitrat məhlulu;
  - 4) 0,55%-li kalium xlorid məhlulu;
  - 5) 0,17%-li natrium xlorid məhlulu.
3. Pinsetlə hüceyrə monotəbəqəsi olan örtücü şüşə çıxarıılır, qıraqları süzgəc kağızı ilə qurudulur və asetoalkoqol fiksatoruna (3:1) keçirilir və 2 saatdan 24 saata qədər saxlanılır. Uzun müddətli fiksasiyada yaxşı olar ki, fiksator iki dəfə dəyişdirilsin.
4. Örtücü şüşə üfiqi vəziyyətdə otaq temperaturunda qurudulur.
5. Preparatın keyfiyyəti qabaqcadan mikroskopla yoxlandıqdan sonra material otaq temperaturunda 1 dəqiqə ərzində 6*n* HCl məhlulunda və yaxud 60°C-də 6 dəqiqə ərzində 1 *n* HCl məhlulunda hidroliz edilir.
6. Örtücü şüşə diqqətlə yuyulur, qurudulur və Unnaya görə (*Unna blue*) mavi və yaxud 1:6 nisbətində durulmuş Romanov-Qimza rəngləyicisi ilə 25-40 dəqiqə ərzində rənglənir (əlavə 2-yə bax).
7. Örtücü şüşə yuyulur, qurudulur və əşya şüşəsinin üstünə qoyularaq kənarları kanada balzamı ilə örtülür və müvəqqəti preparat analiz edilir. Daimi preparat hazırlamaq lazım gəldikdə preparat kanada balzamı və yaxud polistirolla örtülür.

*Morchead et al* (1960) tərəfindən təklif olunmuş metoda görə hüceyrə içərisində örtücü şüşə olan pensillin şüşəsində deyil, Karrelyə qablarında və yaxud müxtəlif həcmli bioloji döşəklərdə kultura edilir. Bu qablarda kultura olunan monoqatlı hüceyrə təcrübənin sxeminə uyğun olaraq tədqiq olunacaq maddə ilə işlənir.

Kontrol olaraq eyni şəraitdə qablarda saxlanmış intakt hüceyrələr götürülür. Fiksasiyaya 2-4 saat qalmış hüceyrə kultura olunan mühitə kolxitsin əlavə edilir. Qida mühiti boşaldılır, sonra tripsin əlavə edilir və ayrı-ayrı hüceyrələrin suspenziyaları alınır. Ardıcıl olaraq hipotopik məhlullarla işlənməni, fiksasiyanı, preparatların mikroskopik analiz üçün hazırlanmasını, rənglənməni, kultura olunmadan sümük iliyi hüceyrələrinin xromosom analizi üçün preparatların düzəldilməsi üsuluna uyğun aparırlar.

Mitotik tsiklin müəyyən fazalarında induksiyon amillərin təsirində asılı olaraq ilkin zədələnmələrin əmələ gəlməsini və xromosom aberrasiyalarını tədqiq etmək və mitotik tsiklin ayrı-ayrı fazalarında maksimum hüceyrə yiğilmasını (məs. kultura olunan hüceyrələrin metafaza mərhələsində yiğilması) təmin etmək üçün hüceyrə populasiyalarını sinxronlaşdırma üsulu mövcuddür.

Belə ki, 4-fluorodezoksiuridinin təsirindən və qida madđələrinin çatışmazlığından *Hela* hüceyrələrini (*Zittlifield*, 1965), oksisidikcövhərinin (0,32 mM) təsiri ilə Sıriya dağşıcanının *B*, *PGT* hüceyrələrinin (*Today Ley*, 1970) sinxronlaşması məlumdur.

DNT-nin replikativ sintezinin zəifləməsi ilə blokun əmələ gəlməsi nəticəsində insanın aminion (Fl) hüceyrəsinin sinxronizasiyası, kultura olunan mühitə DNT sintezinin (500 mq/ml) daxil edilməsi ilə alınmışdır (*Əliyev*, 1981).

Müəyyən edilmişdir ki, 5-AU-in təsirindən 24 saat sonra soyuq timidinlə (7 mkq/ml) blok götürüldükdən sonra hüceyrələr sinxron olaraq G<sub>2</sub>-fazasına daxil olur və maksimum metafaza hüceyrələri timidin daxil edildikdən 17 saat sonra müşahidə edilir.

### **3.15. Leykosit hüceyrələrinin sitogenetik analiz üçün kultura olunması**

Periferik leykosit qan hüceyrələrinin kultura olunması üçün iki üsuldan: götürülən qanın miqdardından asılı olaraq mikro və makro – üsuldan istifadə olunur.

Leykosit hüceyrələrini makro üsulla kultura edərkən, adətən bəzi hallarda *morchea et al* (1960) üsullarına əlavələr etməklə istifadə etmək olar.

1. Təcrübədən əvvəl «Reonae» firmasından olan təzə steril maye heparin (satışda olan) xüsusi fizioloji məhlulda 1:10 ml nisbətində həll edilərək işçi heparin məhlulu hazırlanır. Heparinləşdirilmiş steril şpritlə dirsək venasından götürülmüş 10-20 ml qan, hazırlanmış işçi heparin məhlulla ağızı kip bağlanan sınaq şüşəsinə keçirilir.

2. Eritrositlərin çökməsi üçün sınaq şüşəsini 30-40 dəqiqə temperaturu 4°C olan soyuducuda saxlamaq lazımdır. Bu müddət ərzində eritrositlər çökməyibsə onda steril şəraitində 3:1 nisbətində (3 hissə qan və 1 hissə jelatin) 10%-li jelatin məhlulu əlavə edilir.

3. Paster damcıladicısı ilə plazmanın üst hissəsi götürü-lür və bölgülü sentrifuqa sınaq şüşəsinə tökülr.

4. Həcmə plazmanın həcmindən 1,5 dəfə artıq olan qida mühiti əlavə edilir. Qida mühiti 4,5 hissə 199 mühitindən və yaxud qlutaminlə iqla və 1,5 hissə öküz zərdabından ibarət

olur.

5. 10 ml kultura qarışığına görə hesablanmaqla 0,2 ml, «Welcome» firması FQA-M və yaxud 0,02 ml macar FQA-sından ibarət FTA işçi məhlulu əlavə edilir. FQA işçi məhlulunu hazırlamaq üçün steril şprislə tixacdən içərisində toza oxşar FQA olan qaba onu həll etmək üçün 0,5 ml steril fizioloji məhlul əlavə edilir.

6. Bir ml qarışığa 100 vahid (ml penisillin, 50 vahid) ml isə streptomitsin əlavə edilir.

7. Hər bir steril flakona 2 ml kulturalı mühit tökülür.

8. Kip tixacla bağlanmış və leykoplastırla bərkidilmiş flakon temperaturu  $37^{\circ}\text{C}$  olan termostata qoyulur. Hüceyrələr adətən kulturanın 72-ci saatında fiksə olunur. Bu müddət ərzində təcrübənin sxemində asılı olaraq intakt hüceyrələrin xromosom aberrasiyalarının spektrini təyin etməklə yanaşı, kultura olunan təbii sinxronlu hüceyrə populyasiyalarının mitotik tsikli haqqında olan məlumatlardan istifadə edərək mitozun müəyyən fazasında mutasiyanı dəyişmək olar.

9. İnkubasiyanın sonuna 3 saat qalmış, penisillin şüşəsinə 0,75 mkq/ml hesabı ilə temperaturu  $37^{\circ}\text{C}$  olan kolxitsin məhlulu əlavə edilir və 3 saat müddətinə  $37^{\circ}\text{C}$ -də kultura olunur.

10. Kultura olunan mühitdən Paster damcıladicısı ilə hüceyrə suspenziyasından götürüb sınaq şüşəsinə tökülür və dövretmə müddəti dəqiqədə 8000-1000 olan sentrifuqada 5-6 dəqiqə müddətinə fırladılır.

11. Üz səthdə olan maye xaric edilir və çöküntü temperaturu  $37^{\circ}\text{C}$  olan 5-6 ml Xenks məhlulu ilə yuyulur.

12. Sentrifuqa edilir, Xenks məhlulu ayrılb xaric edilir və materiala 10 dəqiqliyinə temperaturu  $37^{\circ}\text{C}$ -yə qədər

qızdırılmış hipotonik məhlul tökülür.

13.Dövretmə müddəti dəqiqədə 6000 olan sentrifuqa 5 dəqiqə fırladılır və üst hissə xaric edilir və çöküntüyə onun tamlığını pozmadan, sınaq şüşəsinin divarı ilə ehmallıca təzə hazırlanmış soyuq asetoalkoqol fiksatoru (3:1) əlavə edilir. 3-5 dəqiqədən sonra hüceyrə fiksatorda suspenziyalasdırılır və 15 dəqiqə soyuducuya qoyulur.

14.Çöküntü ağ rəng alana qədər fiksator təkrar olaraq bir neçə dəfə dəyişdirilir. Sentrifuqada fırladılır və damcıladıcı ilə qarışdırılır.

15.Damcıladıcı möhkəm qarışdırılmış suspenziyadan bir damla götürüb üzərində 1 ml və ya az fiksator olan əşya şüşəsinin üstünə əlavə edilir.

16.Preparat 10 dəqiqə müddətində 6 N HCl-da hidroliz olunur və preparati HCl-dan tamam təmizləmək üçün axar su ilə yaxalanır.

17.Preparat 20-40 dəqiqə müddətində Romanov-Qimza (azur və eozinlə) və yaxud mavi Unna rəngləyicisi ilə rənglənir.

B. Periferik limfosit qan hüceyrələrinin mikrometodla kultura olunması üçün müxtəlif variantlar mövcuddur (*Aarakaku, Sparkes 1963; Tips et al 1963; Dartanall Gray 1965; Hunderford 1965; Visotskaya 1966; Samoş 1971; Dıqın 1976*). Lakin bu üsullara bir qədər əlavələr edilməklə dəyişdirilmişdir.

1. Qan hüceyrələrini kultura etmək üçün steril flakona 3-5 ml işçi qida mühiti əlavə edilir ki, onun da tərkibi aşağıdakı birləşmələrdən ibarətdir:

a) Tərkibində ikiqat əsaslı amin turşuları və Erlaya görə tərkibində vitamin olan 7,5 %-li Na HCO<sub>3</sub>-in köməkliyi ilə pH-ı 7,0-yə qədər çatdırılmış və aşağıdakı əlavələrlə;

qlutomin 2mM penisillin vahid/ml, streptomitsin 0,1 mq/ml və 0,007 mq/ml qırmızı fenol indikatoru olan tarazlaşdırılmış Erla duzlu məhlulu hazırlanır. Qamma-qlobulindən azad edilmiş öküz və yaxud dana zərdabı və FQA M (*Defco*) uyğun olaraq 1,5 və 2% miqdarında son həcmə əlavə edilir.

b) 4 ml kultura olan mühitə 3:1 nisbətində I99 yaxud İqla mühiti və aktivsizləşdirilmiş öküz zərdabı ilə yanaşı 0,1 ml işçi FQA (Wellcome) məhlulu və yaxud 0,01 ml macar FQA-sı və 1 ml mühitə 100 vahid penisillin əlavə edilir.

Ağzi kip bağlanmış və leykoplastır ilə bərkidilmiş içərisində kultura olan flakon soyuducuda uzun müddət saxlandıqda belə kultura öz aktivliyini itirmir.

2. İçərisində qidalı mühit olan hər bir flakona şprislə (əvvəlcədən heparinləşmiş) venadan götürülmüş 0,2 ml və yaxud əl barmağından götürülmüş 0,1-0,2 ml qan tökülür.

3. Kultura 3 gün müddətində termostatda 37°C-də inkubasiya edilir. Eritrositlərin aqqulyutinasiyasının qarşısını almaq üçün, içərisində kultura olan flakonu kultura olunmanın birinci 2-3 saatında hər 30 dəqiqədən bir silkələmək lazımdır.

Sonrakı işlər: kolxitsin daxil edilməsi, hipotonizasiya, fiksasiya və rəngləmə mikro və makrometodda bir-birinə uyğun aparılır.

### **Mikrometod.**

#### ***Siçovulun periferik limfosit hüceyrələrinin xromosom aberrasiyalarının analizi üçün kultura olunması.***

Bu üsulun üstünlüyü ondan ibarətdir ki, eyni bir laboratoriya heyvanından A.S.Monaxovun təsvir etdiyi qaydaya uyğun olaraq uzun müddət istifadə etmək olur.

Penisillin flakonuna aşağıdakı miqdarda maddələr əlavə edilir: 1,6 ml İqla mühiti: 0,4 ml iribuynuzlu mal-qara zərdabı; 1:5 nisbətində distillə suyunda və yaxud İqla mühitində (0,01 iq/ml) durulaşdırılmış FQA «Wellcome» və yaxud FQA, 100 vahid penisillin, streptomitsin və siçovulun quyruq venasından heparinləşdirilmiş şprislə götürülmüş 0,20-0,25 ml qan.

Flakonda olan qarışq ehmallica qarışdırıldıqdan sonra 37°C olan termostata qoyulur. İnkubasiyanın 68-ci saatında kultura olunan flakona kolxitsin əlavə edilir. Kolxitsin (0,2 mkq/ml) əlavə edildikdən sonra kultura daha 3 saat inkubasiya olunur.

Quru-hava preparatının hazırlanma qaydaları isə insannın periferik limfosit qan hüceyrəlerinin kultura olunmasının makrometoduna uyğun aparılır.

**Hövzə-su heyvanlarının xromosom aberrasiyalarının analizi üçün limfositlərin kultura olunması (Blaxhall, 1983).** Tədqiqat obyekti olaraq siyənək balığının *Salmo trutta* və yaxud karp balığının *Cyprinus Carpio Z* onurğa venasından götürülmüş qandan istifadə edilir.

1. Götürülmüş qan 1:2-yə nisbətində Xenks məhlulu ilə 5-10 dəqiqə müddətində 4°C-də qarışdırılır.

2. Limfositlər fikol-pak qradiyetində ayrılır (yaxşı xromosom preparatlarının alınmasına maneçilik törədən nüvəli eritrositlər xaric edilir) və 8°C-də 5 ml Xenksdə dövretmə müddəti dəqiqədə 1000 dövr olan sentrifuqada çökdürülür.

3. 1 ml 5 A Makkoya mühitində I99 və yaxud tərkibində minimal İqla mühiti olan 2%-li 200 mM qlütomin və 0,2 mkl/ml<sup>-1</sup> xolestriks suspensiyalasdırılır, qatılıq 3 ml-də 1-2·10<sup>6</sup> mkl/ml<sup>-1</sup>-ə qədər durulaşdırılır və həyatilik qabiliyyəti

tripanı yaşıl ilə yoxlanılır.

4. Karp balığı üçün son qatılığrı 0,005 vahid/ml və siyənək balığı üçün 0,001 vahid/ml<sup>-1</sup> olan FQA əlavə edilir (FQA M 25 mkl/ml<sup>-1</sup> qatılıqda).

5. Kulturani atmosfer havasında və yaxud 0,5%-li CO<sub>2</sub>-qazı mühitində 19-20°C-də 5 gün müddətində hər gün qarışdırmaqla inkubasiya edilir və fiksasiyaya 3-5 saat qalmış 0,1 mkq/ml<sup>-1</sup> qatılıqda kolsemdir əlavə edilir.

6. Xromosom preparatlarının hazırlanması və rənglənməsi adı üsulla aparılır.

Keyfiyyətli metafaza lövhəli preparatı 19°C-də inkubasiya etməklə kolsemdir vasitəsi ilə 4 gün 12 saatla – 4 gün 21 saat arasında almaq olar.

## Fəsil 4

# MİTOTİK TSİKLİN MÜVƏQQƏTİ PARAMETRLƏRİNİN VƏ ONUN FAZALARININ TƏYİN EDİLMƏ ÜSULLARI

### 4.1. Radioavtoqrafiya

Radioavtoqrafiya üsulu əsas etibarı ilə mitotik tsiklin ümumi qanuna uyğunluqlarını və hüceyrə populyasiyalarının dinamikasını tədqiq etmək üçün istifadə olunur.

Radioavtoqrafiya üsulunda mitotik tsikli öyrənən zaman tədqiq olunan obyektə radioaktiv izotop daxil edilir. Izotop daxil edilmiş preparat fotoqrafiya, emulsiya ilə örtülür və müəyyən dövrdən sonra xromosomda DNT-nin sintezinin aktivliyini və onun yerini müəyyən etmək olur. DNT-nin sintezini öyrənəndə radioaktiv izotop kimi nişanlanmış timidindən istifadə olunur.

DNT-nin sintezini öyrənəndə nişanlanmış timidindən istifadə etməyin üstünlüyü ondan ibarətdir ki, bu nukleotid o biri nukleotidlərdən fərqli olaraq DNT-nin polinukleotid strukturunun əmələ gəlməsində bilavasitə iştirak edir.  $^3\text{H}$ -timidin xromosomlara yalnız DNT-nin sintezi mərhələsində daxil olur ki, nəticədə hüceyrə nişanlanır və bir neçə nəsildə bu nişanlanmış hüceyrələri öyrənmək olur.

Radioavtoqrafiya üsulu haqqında «Mitotik indeks» bölməsində ətraflı məlumat verildiyinə görə burada əsas məqsəd yalnız müxtəlif test-sistemlər üzərində mitotik tsiklin analizini aparmaq üçün preparatların hazırlanma texniki ilə tanış olmaqdan ibarətdir.

Xromosomun radioavtoqrafiya tədqiqatını istənilən bitki və heyvanın bölünən hüceyrələrində aparmaq olar.

Radioavtoqrafiya analizini bitkilərin bölünən hüceyrələrində: toxumların və soğanaqların ilk kökcüklerində, heyvanlarda isə *in vivo*-da kultura olunan və eləcə də canlı orqanizmlərin hüceyrələrində aparmaq olar.

Xromosom radioavtoqrafi düzəldilən vaxt əsas keyfiyyət göstəricilərindən biri xromosom preparatlarının keyfiyyətli olmasıdır. Məsələn, bitkilərdən radioavtoqrafiya üçün xromosom preparatı düzəldilən zaman məsləhət görülür ki, bitkinin kökcükleri, ilbizin boğaz uru vəzisinin mayesi olan sitaza ilə maserasiya edilsin (İoqdanski, 1965). Radioavoqrafiya üçün heyvan hüceyrələrindən xromosom preparatı hazırlayan zaman yaxşı olar ki, əzilmiş preparatlardan yox, qurudulmuş preparatlardan istifadə edilsin.

Nişanlanmış izotop tədqiqat obyektindən və qarşıya qoyulan məqsəddən asılı olaraq orqanizmə 0,5-20 mk Kyuri/ml qatılıq arasında (peroral, qarın boşluğununa, dəri altına), nişanlanmış izotop olan məhlulda orqanların, hüceyrələrin və toxumaların inkubasiyası yolu ilə daxil edilir.

Radioavtoqrafiya analizi üçün materialları spirt Karnua qarışığında, 3:1-ə nisbətində spirtlə sirkə turşusu qarışığında və yaxud 1:1 nisbətində spirtlə asetonun qarışığında fiksə etmək daha məqsədə uyğundur.

Fotomateriallarla işləyən vaxt tələb olunan qaydalara uyğun olaraq, radioavtoqrafiya analizi üçün preparat hazırladıqda bütün işlər işıq buraxmayan qaranlıq otaqda aparıldıqda preparat jelatinlə gümüş halloidin mikrokristal qarışığı olan və ionizasiya şüalarına həssas olan fotoemulsiya ilə örtülür və otaq temperaturunda 3 həftəyə qədər ekspozisiya olunur. Bundan başqa fotoemulsiyadan düzəldilmiş plyonkadan da istifadə etmək olar.

Preparatın ekspoziyası dövründə  $^3\text{H}$ -timidinin parçalan-

ması nəticəsində əmələ gələn  $\beta$ -hissəciklərinin fotoemulsiyada hərəkətləri vaxtı izlər qalır.  $\beta$ -hissəciklərinin hərəkət yollarında olan gümüş, aydınlaşdırma prosesində gümüş metalina qədər bərpa olunur ki, onlar da xromosomlar üzərində qara nöqtələr şəklində görünür.

Preparatin ekspoziya müddəti qurtardıqdan sonra amidol, metol və hidroxinon qarışığından ibarət aydınlaşdırıcı məhlullarından istifadə edilir. Çox hallarda avtoqrafları aydınlaşdırmaq üçün «M» tipli emulsiyalar üçün aşağıda təklif olunan (Boqomolov və b., 1957) amidol aydınlaşdırıcısından istifadə edilir.

1. Amidol – 3 qr.
2. Susuz sulfit – 112 qr.
3. Su – 1 litr.

(aydınlaşdırıcının pH-ı bir litr suya 0,4-0,6 qr miqdarında limon turşusu əlavə etməklə 6,7-yə çatdırılır. Aydınlaşdırma 2% dəqiqə müddətində aparılır.

Preparati su ilə yaxalamaq və 0,5 dəqiqliyinə temperaturu 18-20°C olan aydınlaşdırmanı dayandıran 1%-li sirkə turşusu vannasına salmaq lazımdır.

Fiksaj etmək üçün möhkəmləndirici kimi 30%-li hipsulfit məhlulundan istifadə edilir. Fiksajdan sonra preparat 10-15 dəqiqə yuyulur və sonra qurudulur. Preparati tozdan və yad cisimlərdən qorumaq lazımdır, çünki emulsiyanın çirkənməsi preparatin analizinin keyfiyyətinə mənfi təsir göstərə bilər.

Preparati emulsiya ilə örtənə qədər və yaxud da hazır avtoqraf alındıqdan sonra rəngləmək olar. Preparati rəngləyən vaxt elə etmək lazımdır ki, rəngləyici tələb olunan qaydalara uyğun olaraq hazırlanın, əks təqdirdə preparatin analizi çətin olar.

Preparat emulsiya ilə örtülenə qədər rənglənərsə o zaman Fyulgen və karbol-fuksin rəngləyicisi ilə, hazır avtoqraf alındıqdan sonra isə Heydenhayna və Erlixə görə hemotoksilinlə, Unnaya görə mavi rənglə, Romanov Himzaya görə azur, eozinlə rənglənir (əlavə 2-yə bax).

Xromosomların nişanlanmasıının keyfiyyət və kəmiyyət göstəriciləri mikroskopla analiz edilir. Preparat rəngləndikdən sonra onu balzamla örtüb quru və qaranlıq yerdə saxlamaq lazımdır.

Toxuma kulturasının hüceyrələrinə və *in vitro*-da heyvanların müxtəlif toxuma hüceyrələrinə impuls yolla timidin daxil etməklə radioavtoqraf almaq üçün tədqiqatçılar, Hovad və Pelk (*Hovard, Pelc* 1953) tərəfindən işlənmiş üsullardan geniş istifadə edirlər. Sonrakı işlər də məməlilərin kultura olunan hüceyrələrindən radioavtoqraflar hazırlamaq üçün yuxarıda qeyd olunan üsula Çensov müəlliflərlə birlikdə (1977) bir sıra əlavələr etməklə yeni metod hazırlamışlar.

Hüceyrə eksponensial böyümə fazasına çatdıqda 10-30 dəqiqə müddətinə kultura olunan mühitə  $^3\text{H}$ -timidin daxil edilir. Şüşə üzərində olan hüceyrələr Karnua qarışığı və yaxud sirkə alkooqol ilə 30 dəqiqə müddətinə fiksə olunur, spirtdə yuyulur və qurudulur. Üzərində hüceyrə olan örtüçü şüşə balzam vasitəsilə əşya şüşəsinə yapışdırılır. Sonrakı işləri qaranlıq otaqda qırmızı işıqda aparmaq lazımdır.

Preparatları örtmək üçün istifadə olunan MK(M) və yaxud Mp(«p») tipli fotoemulsiya  $37-40^\circ\text{C}$ -də əridilir və preparatı həmin ərintiyə salmaqla və yaxud diametri 2-2,5 sm olan mis həlqədən istifadə etməklə örtmək olar.

Preparat üfüqi vəziyyətdə qurudulduğdan sonra işıq buraxmayan qutuda  $4^\circ\text{C}$ -də soyuducuda saxlanılır, vaxt isə empirik yolla (7-30 gün) seçilir.

Avtoqraf təzə hazırlanmış aşağıdakı tərkibə malik qarışqda 19-20°C-də 3 dəqiqə müddətinə aydınlaşdırılır: amidol – 3,0 qr, susuz natrium sulfat – 1,0 qr, limon turşusu – 0,4-0,5 qr, su – 1 litr. Bununla yanaşı digər aydınlaşdırıcıdan *Rodak D*, 19 v-dən də istifadə etmək olar. Avtoqraf bu aydınlaşdırıcı 3-5 dəqiqə müddətinə 20°C-də aydınlaşdırılmalıdır. Bu aydınlaşdırıcı aşağıdakı ardıcılıqla (Adams, 1983) suda həll edilməlidir: metal 2,2 qr, hidroxinin 144 qr, natrium karbonat (susuz) – 48 qr, kalium bromid – 4,0 qr, həcm distillə suyu ilə bir litrə çatdırılır və 4°C-də tam doldurulmuş şüşədə saxlanılır ki, oksidləşmə getməsin.

Preparat 19-20°C-də distillə suyunda 30 saniyə müddətinə yaxalanır və 30-40%-li hiposulfit məhlulunda 15-17°C-də 5-6 dəqiqə fiksə olunur. Sonra 15-20 dəqiqə 15-17°C temperaturu olan suda yuyulur, qurudulur və hemotoksilin ilə rənglənir. Preparati emulsiya ilə örtənə qədər və yaxud avtoqraf alındıqdan sonra rəngləmək olar.

Bu üsul eyni olaraq tam köçürülüən hüceyrə kulturaları, leykosit qan hüceyrələri və məməlilərin sümük iliyi hüceyrələri üçün də tətbiq edilə bilər. Lakin bu vaxt tədqiqatın məqsədindən asılı olaraq izotopun mitotik tsiklin hansı dövrünə və necə daxil edilməsi ilə yanaşı, onun qatılığında da düzəlişlər aparmaq lazımdır. Belə ki, misal üçün insan leykosit hüceyrəsi kulturasının  $G_1$ , dövrünün 3-4 saatə bərabər olduğunu bilərək,  $^{3}H$ -timidin materialın fiksasiyasına 4-6 saat qalmış daxil edilir.

Heyvanlar üzərində təcrübə aparıllarkən izotop fizioloji məhlulla qarın nahiyyəsinə və yaxud dəri altına daxil edilmir.

Tədqiqat üçün lazım olan hissə götürülür, fiksə edilir, parafinə qoyulur və qalınlığı 3-5 mkm olan kəsik hazırlanır.

Emulsiyada əvvəl preparat parafından təmizlənir və əşya şüşəsinin üzərinə qoyulur.

Mitotik tsiklin analizində fasılısız nişanlanma metodundan istifadə olunur. Bu yuxarıda qeyd olunanın onuna fərqlənir ki,  $^3\text{H}$ -timidin (2% mk Ki ml; mmol) kultura olunan mühitə uzun müddət daxil edilir. Müəyyən vaxtdan sonra örtücü şüşə üzərində olan hüceyrə fiksə olunur və yuxarıda qeyd olunan qaydaya uyğun olaraq radioavtoqrafik analiz üçün preparat hazırlanır. Radioavtoqrafiyada nişanlanmış mitozların, hüceyrələrin nisbi miqdari və hüceyrədə aydınlaşmış gümüş dənəciklərin orta miqdarı hesablanır.

#### **4.2. İzotopların bitki hüceyrələrinə daxil edilməsi**

Təcrübənin məqsədindən asılı olaraq toxum və yaxud soğanaqların ilk kökcüklərini  $^3\text{H}$ -timidin məhlulunun lazımı qatılığında qısa və yaxud uzun müddətə, yəni DNT-nin minimum bir replikasiya müddətində saxlayırlar.

Karnua qarışığı və yaxud sirkə alkokolu ilə fiksə olunmuş cürcətilərin kökcüklərindən keyfiyyətli xromosom preparatları hazırlamaq üçün onu 2-4 saat müddətinə 5%-li pektinaza fermenti məhlulunda maserasiya edirlər. Maserasiya edilmiş kökcüklərdən əzilmiş preparatlar düzəldilir. Əşya şüşəsindən örtücü şüşəni ayırmak üçün müxtəlif üsullardan: preparatı içərisində 100%-li sirkə turşusu olan qaba qoymaqla, quru buz və yaxud soyudulmuş maye azot üzərində saxlamaqdan istifadə edirlər. Əşya şüşəsi üzərində qalmış hüceyrələri nəmsizləşdirmək üçün onu 70%-li spirtdən başlayaraq 100%-li spirtdə qədər müxtəlif faizli spirtdə qeyd olunan sxemə uyğun olaraq emulsiya ilə örtülür, ekspozisiya olunur, aydınlaşdırılır, fiksə olunur və rənglənir.

#### **4.3. İzotop kimi 5-bromdezoksi-uridindən istifadə olunması (Çebotarov, Seleznyova, 1979)**

Bu üsulun əsasını bacı xromatidlərinin 5 bromdezoksiuridinin (BDU) iştirakı ilə diferensial rənglənmə təşkil edir ki, müəlliflər buna əsaslanaraq çin dağ siçanı hüceyrələrinin kultura modeli üzərində hüceyrə tsiklinin parametrlərini və onun fazalarını müəyyən etmək üçün çox maraqlı üsul təklif etmişlər.

Təklif olunan üsul ona əsaslanır ki, DNT-nin bir tsikl replikasiya müddətində kultura olunan mühitə hallogenlaşmış əsaslar daxil etdikdə komplementarlıq prinsipinə uyğun olaraq, 5-bromurasil DNT-molekulunda timidinin yerinə daxil olaraq adeninlə qoşalaşır və nəticədə xromatidlər və yaxud onun ayrı-ayrı sahələri tərkiblərindəki təzə qurulmuş əsaslara görə adı əsaslar olan sahələrdən öz xassə və əlamətlərinə görə fərqlənirlər. Bu üsula görə xromosomlar xüsusi rəngləyici ilə rəngləndikdə aşağıdakı kimi görünür: tərkibində BDU olan xromatid açıq, tərkibində BDU olmayan ikinci xromatid isə tünd rənglənmiş olur.

Müəlliflər BDU-bacı xromadılərinin rənglənməsi üsulunda bir qədər də dəyişiklik etmişlər, belə ki, fiksasiyaya 24 saat qalmış kultura olunan mühitə BDU əlavə edilir, 12 saatdan sonra isə BDU yuyulur və kultura olunan mühitə tərkibində BDU olmayan təzə qida mühiti əlavə edilir və nəticədə bacı xromatidləri yaxşı rənglənir. Təcrübə aşağıdakı sxem üzrə aparılır.

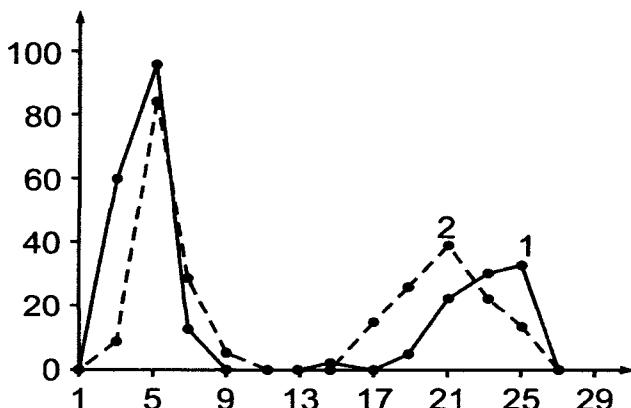
Çin dağsiyanının köçürüldən hüceyrə kulturasının 24 saatında kulturada müxtəlif dövrlər arasında 10 və 50 mkq/ml qatılıqda BDU əlavə edilir. (BDU-nun daxil edilməsi və yuyulması qaranlıq otaqda qırmızı işıqda aparılır). Kifayət

qədər mitozun toplanması üçün fiksasiyaya bir saat qalmış 0,5 mkq/ml kolxitsin əlavə edilir.

Hüceyrə tsiklinin müddətini və  $G_2$ -dövrünü müəyyən etmək üçün 50 mkq/ml qatılıqda BDU ilə iki saatlıq inkubasiya olunmuş hüceyrələrdən istifadə edilir və inkubasiyanın ortasından 1 saatdan başlayaraq 29 saatə qədər fiksə olunmuş materiallar analiz edilir.

Təcrübənin sxemindən göründüyü kimi, BDU-nun kulturada olma müddəti DNT-nin replikasiya müddətindən az olduğuna görə, açıq rənglənən sahə DNT-nin gec replikasiya olunan sahəsidir. Əgər BDU  $S$  dövrünün gecikmiş dövründə birinci hüceyrə tsiklində iştirak edirsə, hər iki xromatid nişanlanacaq və yaxud əgər  $S$  dövrünün gecikmiş dövründə 2-ci hüceyrə tsiklində iştirak edirsə bir xromatid nişanlanacaq. Bunları nəzərə alaraq və qrafik quraraq (Şəkil 4.1) müəlliflər müəyyən etmişlər ki, hüceyrə tsiklinin müddəti ( $T$ ) 16 saatə bərabərdir, daha doğrusu bu müddət BDU ilə nişanlanan, xromosom sahələrinin gec replikasiya edən iki maksimum nöqtəsi arasındaki vaxta bərabərdir.  $G_2$ -dövrün müddəti hüceyrə populyasiyasının mitoz mərhələsindən başlayaraq 50%-ə qədər BDU ilə nişanlanmış mitozun alındığı vaxta görə hesablanır ki, bu da 3 saatə bərabərdir.

Hüceyrə tsiklinin ayrı-ayrı fazalarının müddətini təyin etmək üçün BDU (10 mkq/ml) kultura olan mühitdə 6 saat qalmaqla fiksasiyaya 8, 12, 16, 20, 24, 28, 36 eyni zamanda hüceyrələr yuyulmadan fiksasiyaya 4 saat qalmış daxil etmək olar. Tsiklin müddəti birinci halda olduğu kimi 16 saat olmuşdur (Şəkil 4.2). Fiksasiyanın ilk birinci  $G_1$  – dövründə  $G_1$  (I) və ikinci  $G_2$  – dövründə  $G_2$ -2 (II) BDU DNT-yə daxil olmur və bütün xromosomlar tünd rənglənmiş olur.  $S$  – dövrünün müddəti isə nişanlanmanın 50%-li səviyyəsindəki qalxan və enən əyrinin arasındaki məsafə ilə müəyyən edilir (Şəkil 4.1).  $S$  – dövrünün müddəti 8 saat (9-17 saat) olmuşdur.

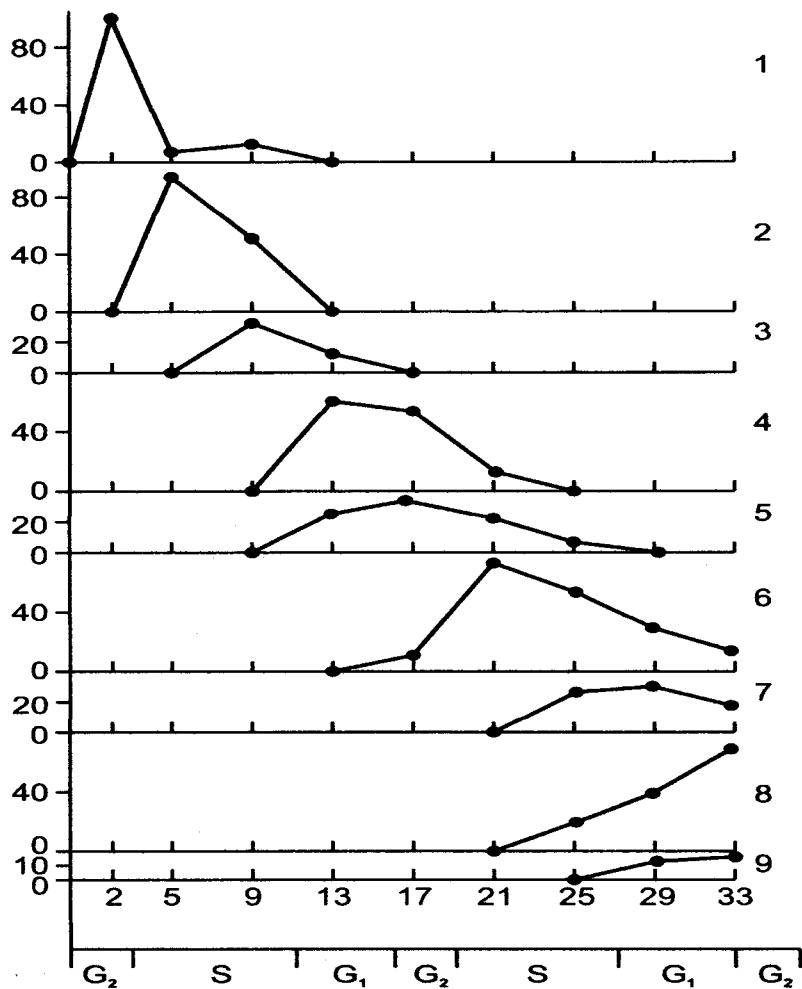


**Şəkil 4.1.** Xromosom sahəsinin gecikmiş replikasiyاسında bir və iki xromatiddə BDU-nun nişanlanmasından asılı olaraq metafazaya düşən hüceyrələrin miqdari. Üfüqi xətdə – daxil edilmiş vaxtdan fiksasiyaya qədər, saatla; şaquli xətdə – bacı xromatidlərinin diferensial rənglənməsi ilə metafaza hüceyrələrinin miqdari, %-la.  
1. Bir təcrübənin nəticəsi; 2. Digər təcrübənin nəticəsi.

G<sub>2</sub> dövrünün müddətinin (3 saat), S – dövrünün (8 saat) və hüceyrə tsiklinin bütövlükdə (16 saat) olduğunu bilərək G<sub>1</sub>-dövrünün müddəti hesablanmış və müəyyən edilmişdir ki, onun müddəti 5 saatdır. Mitozun müddəti isə müəlliflər tərəfindən müəyyən edilməmişdir, lakin onun müvəqqəti parametrlərinin 0,5-1,0 saatdan artıq olmadığını bilərək G<sub>1</sub> və G<sub>2</sub> – dövrünə 0,5 saat əlavə etməklə təyin etmək olur.

Lakin, lazımlı olduqda M – dövrünü və onun ayrı-ayrı fazalarını müəyyən etmək üçün, DNT sintezi ingibitorunun köməkliyi ilə hüceyrə populyasiyasının sinxronlaşdırılması üsulundan istifadə etmək olar.

Mitotik tsiklin parametrlərini təyin etmək üçün istifadə edilən <sup>3</sup>H-timidin üsulundan fərqli olaraq bu üsul üstünlük



**Şəkil 4.2.** BDU-nun daxil edilmə vaxtından asılı olaraq hüceyrə tsiklinin müvafiq mərhələlərinə uyğun hüceyrələrin müxtəlif tip rəngli xromosomlarla miqdarı

1 – Gecikmiş; 2 – Orta; 3 – Erkən; 4 –  $G_1(I) + G_2(II)$ ; 5 – Gecikmiş; 6 – Orta; 7 – Erkən; 8 –  $G_1(II) + G_2(III)$ ; 9 – Gecikmiş; qalan işaretlər 4.3-cü şəkildəkinə uyğundur.

təşkil edir. Eyni hüceyrələrdə  $^3\text{H}$ -timidinin köməyi ilə alınmış (Eqolina, Zaxarov, 1971) nəticələri, BDU-nun təsiri ilə alınan nəticələrlə müqayisə etdikdə bu üsulun bir sıra üstünlüklərə malik olduğunu görmək olar.

BDU-nun istifadə edilən yüksək qatılığı (100-200 mkg/ml  $^3\text{H}$ -timidindən fərqli olaraq (*Vig et al*, 1968) mitotik tsiklin müddətinə təsir etmir və hüceyrə üçün sitogenetik toksikliliyə malik olmur. Eyni zamanda BDU ilə aparılan təcrübələrdə nəticələr  $^3\text{H}$ -timidinlə aparılan təcrübələrə nisbatən tez alınır.

#### **4.4. Sitogenetik analiz üçün metafaza hüceyrələrinin alınma üsulu**

Bitki-heyvan hüceyrələrinin *in vitro*-da və *in vivo*-da və eləcə də insan hüceyrələrinin metafaza üsulu ilə sitogenetik analizini keyfiyyətli aparmaq üçün əsas şərtlərdən biri preparatda çoxlu miqdarda metafaza hüceyrələrinin alınması, interfazanın müxtəlif dövrlərində blok əmələ gətirən DNT sintezinin ingibitoru vasitəsi ilə mümkündür ki, nəticədə asinxron bölünən hüceyrələr sinxronlaşır. Blokun kənar edilməsi hüceyrələrin sinxron olaraq mitotik tsiklə daxil olmasını və müəyyən müddətdən sonra isə metafaza mərhələsində toplanmasını təmin edir. Metafaza hüceyrələrinin toplanmasına eyni zamanda, metafaza mərhələsində iy tel-lərini pozan, mitotoksiki maddələrdən – kolxitsin və onun sintetik analoqlarından (kolsemid, vinblastin, vinkoistin və s.) istifadə edirlər.

Hüceyrələrin G<sub>1</sub>, erkən S və S dövründə sinxroniizasiyasını, yüksək qatılıqlı timidinin, aminopterinin, ametopterinin və 5-stordezoksiuridinin təsiri ilə aparmaq olar. Antimetabolitlərin ingibitor təsirini aradan qaldırmaq üçün,

onları kultura olunan mühitdən kənar etmək və yaxud bütün hallarda kultura olunan mühitə timidin əlavə etməklə mümkünkündür. Yüksək qatılıqlı timidinin təsiri ilə yaranan bloku aradan qaldırmaq üçün mühitə qatılığı 10 mkm olan dezoksisitidin əlavə edilir (*Morris Jisher* 1960).  $G_1$  və  $S$  fazasında blok əmələ gəlməsi üçün təcrübədə geniş istifadə olunan Adams (1983) tərəfindən hazırlanmış ikiqat timidin bloku ilə tanış olaq.

1.  $3 \cdot 10^5$  *Hela* hüceyrəsi diametri 5 sm olan qabda, tərkibində 10 faizli dana zərdabı və 3 mM timidin olan İqla mühitində əkilir.

2. 16 saatdan sonra mühit timidinsiz təzə mühitlə əvəz olunur.

3. 8 saatdan sonra 3 mM qatılıqda timidin əlavə edilir.

4. 16 saatdan sonra ikinci mərhələ təkrar edilir və nəticədə hüceyrələr sinxron olaraq  $S$  dövrünə daxil olur.

Çox hallarda bitki və heyvanların hüceyrələrini sinxronlaşdırmaq üçün timinin struktur analogu olan 5-aminourasildən (5-AU) istifadə edilir. *Vicia faba*, *crepis capillaris* və məməlilərin asinxron hüceyrə populyasiyaları üzərində aparılan tədqiqatlar nəticəsində məlum olmuşdur ki, 5-AU təsirindən blokun əmələgəlmə mexanizmi, DNT-nin replikativ sintez sürətinin zəifləməsi ilə əlaqədardır. Deməli, əgər hüceyrə populyasiyasına bir mitotik tsiklin baş verması üçün lazımlı olan vaxt ərzində 5-AU ilə təsir edilərsə onda hüceyrələrin əsas hissəsi sintetik dövrdə olacaq. Belə ki, ingibitorla təsir edilən vaxt  $S$  – dövründə olan hüceyrələr bölünmə fazasına daxil olmur.  $G_1$ ,  $G_2$  və M-birinci və  $G_1$  ikinci mitotik tsikldə olan hüceyrələr isə ardıcıl olaraq bölünmə mərhələlərini keçir,  $S$  dövrünə daxil olur və 5-AU təsirindən  $S$  fazasında ləngiyir. Blok əmələ gətirən

inhibitorlarının təsiri aradan qaldırıldıqdan sonra hüceyrələr sinxron olaraq G<sub>2</sub> və sonrakı mitotik tsiklin fazalarına daxil olur. Təcrübənin məqsədindən asılı olaraq hüceyrələrin blokdan çıxmاسını stimulə etmək üçün ingibitor yuyulduqdan sora kultura olan mühitə 5-10 mkq/ml qatılıqda qeyri-radioaktiv timidin daxil etməklə ingibitorun təsirini fəaliyyətdən salmaq olar. Maksimum miqdarda hüceyrələrin metafaza mərhələsinə daxil olma vaxtı emprik yolla, müxtəlif fiksasiya vaxtlarından sonra onların miqdarını saymaqla müəyyən etmək olur.

Hüceyrələri sinxronlaşdırmaq məqsədi ilə 5-AU-dən başqa 5-ftor-2-dezoksiuridindən, ametopterindən və başqa mexaniki üsullardan istifadə edilir.

Hüceyrələrin metafaza mərhələsində toplanmasını təmin etmək üçün güclü mitotoksin olan və iy tellərinin əmələ gəlməsini pozan *Colchicum autumnale* bitkisinin soğanağından alınmış alkoloid kolxitsindən və onun sintetik analoqlarından (kolsemid, vinblastin, vinkristin və s.) istifadə edilir.

Kolxitsin universal xüsusiyyətə malik olmaqla öz təsirini istər bitki, istərsə də məməlilərin hüceyrələrində *in vivo* və *in vitro*-da göstərir. Fiksasiyaya 2-5 saat qalmış müxtəlif obyektlər üçün müxtəlif qatılıqda daxil edilmiş kolxitsin metafaza mərhələsində çoxlu miqdarda hüceyrələrin toplanmasına səbəb olmaqla eyni zamanda xromosomların bərabər paylanması və sıx spirallaşmasını təmin edir. Sinxronlaşma üsulu ilə birlikdə kolxitsinin tətbiq edilməsi nəticəsində metafaza mərhələsində 70 faizdən çox hüceyrə toplanır.

Yuxarıda qeyd olunan üsulların köməkliyi ilə *vicia faba*-nın yan kökcüklerində (Makarov, Savronov, 1981) və insanın köçürülən amnion hüceyrə kulturasında (Əliyev, 1981) mitozun toplanması üçün təcrübə təxminini olaraq

aşağıdakı sxem üzrə aparılmışdır.

I.1. Bitki yan kökcükləri ilə birlikdə qatılığı 700 mkq/ml 5-AU-da 24 saat saxlanılır.

2. Kökcüklər 30 dəqiqə  $10^{\circ}$  axar suda yuyulur və bitkilərin böyüməsi üçün hazırlanmış qida mühitinə keçirilir. Bu şəraitdə mitoz hüceyrələrin miqdarı 15 saatdan sonra maksimuma çatır.

3. 5-AU yuyulduğdan 12 saat sonra mühitə 0,5 mq/ml qatılıqda kolxitsin əlavə edilir.

4. Bitki bu məhlulda 4 saat saxlanılır və sonra sirkə turşusu alkoqolunda fiksə edilir, bir saatdan sonra fiksatoru dəyişdirmək lazımdır. Material 3 gün  $4^{\circ}\text{C}$ -də fiksatorda saxlanılır. Materialı uzun müddət saxlamaq lazımlı gələrsə onda fiksatoru 70 faizli etil spiriti ilə əvəz etmək lazımdır.

Müvəqqəti və daimi preparatların hazırlanması (masse-rasiya, rəngləmə və s.) bitki obyektlərinin sitogenetik analizi üçün yuxarıda qeyd olunan sxemə uyğun aparılır.

II.1. İnsanın amnion hüceyrə kulturası (*F*) 10 faizli öküz zərdabı əlavə edilmiş I99 qida mühiti olan flakonda əkilir və  $37^{\circ}\text{C}$ -də termostatda kultura edilir.

2. İnkışafın loqarifmik fazasında mühitə 5-AU (500 mkq/ml əlavə edilir.

3. 24 saatdan sonra qida mühiti xaric edilir, hüceyrələr  $37^{\circ}\text{C}$  Xenks məhlulunda yuyulur, sonra təzə qida mühitə və 7 mkq/ml qatılıqda soyuq timidin əlavə edilir.

Bu halda maksimum metafaza hüceyrələri blok götürüldükdən 17 saat sonra müşahidə edilir.

4. Fiksasiyaya 2 saat qalmış, daha doğrusu mühitə soyuq timidin əlavə edildikdən 15 saat sonra 10 mkq/ml qatılıqda kolxitsin əlavə edilir.

5. Fiksasiyaya rəngləmə və sitogenetik analiz üçün

preparatların hazırlanması, məməlilərin köçürüldən hüceyrə kulturaları üçün təsvir olunmuş sxemə uyğun aparılır.

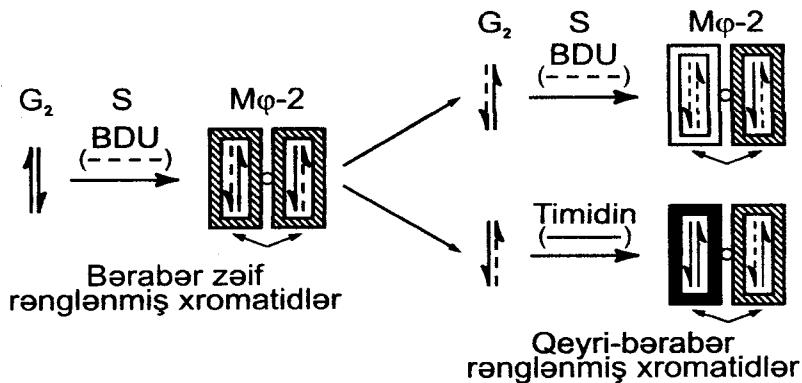
Tam və yarı tam köçürüldən hüceyrə xətlərinin kulturalarında mitotik hüceyrələrin toplanması üçün kimyəvi sinxronlaşdırıcı üsullarla yanaşı hüceyrələrin bu və ya digər fiziki xassələrindən də istifadə edilir. Belə ki, bölünən hüceyrələrin seçilməsinə kultura olunan qabların sirkələnməsi ilə nail olmaq olar. Bu üsul ona əsaslanır ki, bir qatda böyükən hüceyrələr bölünmə vaxtı girdə forma alır, substrata zəif yapışmış olurlar və qabların silkələnməsi vaxtı onlar asanlıqla ayrılırlar. Daha sonralar hüceyrələrin seçiməsini ölçülərinə görə elektron hesablayıcısı və sentrifuqa vasitəsi ilə də aparmaq olar. Lakin bu üsul çox mürəkkəb olmaqla baha qiymətə başa gelir.

#### **4.5. Bacı xromatid mübadiləsinin (BXM) analiz üsulu**

Qız xromosomlarında seqment mübadiləsinin əmələ gəlməsini radioavtoqrafiya üsulu ilə ilk dəfə olaraq Taylor müəlliflərlə (*Tayler et al*, 1957, *Tayler* 1958) müəyyən etmişlər. Müəyyən edilmişdir ki, nişanlanmış izotop olan mühitdə xromosomların ikişəməsi gedərsə o zaman metafaza xromosomları bütün uzunluqları boyu nişanlanmış olurlar. Birinci tsikl replikasiya başa çatdıqdan sonra izotop xaric edildikdə, xromosomlar  $^3\text{H}$ -timidin olmayan tsikl replikasiyanı keçdiqdə xromatidlərdən biri «açıq rənglənmiş» ikincisi isə «tünd rənglənmiş» olur. Eyni zamanda bəzi xromosomlar bütövlükə rənglənməmişlər, daha doğrusu xromatidərin bəzi sahələri nişanlanmış, bəzi sahələri isə nişanlanmamış olur. Deməli, bacı xromatidləri arasında mübadilə getmişdir.

1970-ci ilin başlangıcında bacı xromatid mübadiləsinin radioavtoqrafiya üsulundan əlavə başqa üsulla öyrənilməsi də təklif edilmişdir (Eqolina, Zaxarov, 1972; Latt, 1973; Jukushima, Wolff, 1974; Lerry, Wolff, 1974; Zaxarov, 1975; Fischer, Kim, 1975). Bu üsul radioavtoqrafiyaya nisbətən sadə və dəqiqdır. Bu üsul Flyurosent rəngləyicisi «Qimza» adlanır.

Bu üsulun prinsipi ondan ibarətdir ki, hallogenləşmiş əsaslar olan mühitdə, iki tsikl replikasiya müddətində xromosomların bacı xromatidləri kultura olunduqda timin, iki ardıcıl hüceyrə tsiklinin S mərhələsində hallogenləşmiş əsaslarla əvəz olur və bunlar bir-birilərindən xüsusi rəngləyiçilərlə: Qimza rəngləyicisi, flyaroxrom tərkibli benzimidazolun törəməsi *Hoechst 33258* və yaxud akridin narıncısı ilə diferensial rənglənmə nəticəsində fərqlənirlər (Latt 1973, Dutrillaux et al 1974). Bacı xromatidin BDU olan mühitdə bir və iki tsikl replikasiyada diferensial rənglənməsi sxemi 4.4-cü şəkildə verilmişdir.



**Şəkil 4.4. BDU-dan istifadə etməklə bacı xromatidlərinin differensiasiyası (Zatt, 1981).**

Xromosomun morfolojiyasının deyişməsi və bacı xromatidlərinin lokusları arasındaki simmetrik mübadilənin analizinə imkan verən BXM hazırda ekstremal amilin potensial mutagenlərini müəyyən etmək üçün həssas və faydalı üsul sayılır.

Bu üsulun üstünlüklerindən biri də ondan ibarətdir ki, bunun vaitəsilə maddələrin çox kiçik dozada sitogenetik toksikiliyini müəyyən etmək olur. Halbuki, onlar həmin fazada xromosomlarda heç bir dəyişilmələr əmələ gətirmir və bu üsul xromosom aberrasiyası testindən 10 dəfə həssasdır. Bu üsulla məməlilər və bitki obyektlərinin *in vivo*-da və *in vitro*-da spontan mutasiyalarını və endogen metabolit maddələrin sitogenetik toksikiliyini də analiz edir. BXM-də əsasən bitki obyektlərindən: çobanyastığı çıçayı (*Crepis capillaris*), at paxlası (*Vicia fala*), soğan (*Allium cepa*), heyvanlardan: siçan, siçovul, balıq, meyvə milçəyi və insannın leykosit və sümük iliyi hüceyrələrindən istifadə edilir.

Təsir edən amillərin sitogenetik toksikiliyini müəyyən etmək üçün yaxşı olar ki, BXM bir neçə test sistem üzərində öyrənilsin. Ona görə ki, müxtəlif orqanizmlər və hətta eyni bir orqanizmin müxtəlif orqanlarının mutagen və kanserogen maddələrin təsirinə qarşı həssashiği müxtəlif olur.

Qarşıya qoyulan məqsəddən və tədqiqat obyektlərindən asılı olaraq hallogen əsasların qatılığı və BDU-nun daxil edilmə formaları müxtəlif olur.

Təcrübələrin qoyuluşunda nəzərə almaq lazımdır ki, BDU DNT-yə daxil olarkən mitodepressiv təsir göstərməklə spontan və induksiya olunmuş bacı xromatid mübadiləsini modifikasiya edir. BDU-nun eyni dozasına qarşı müxtəlif orqanizmlərin həssashiği müxtəlif olduğu kimi, eyni xətdən olan siçanların çəkilərinə görə qatılığı 2,2-dən 13,5 mkq/q

olan BDU daxil etdikdə iki tsikl replikasiya müddətində hər hüceyrəyə görə BXM-tezliyi sümük iliyində 1,64, sper-mototoniyada 1,82, dalaq hüceyrələrində 1,89, bağırsaq hüceyrələrində 2,89 və limfa düyünlərində 3,69 təşkil edir. Buna görə də BXM üsulu ilə ekstremal amillərin sitogenetik toksikliyini öyrənən zaman onların minimum təsireddi qatılığından istifadə etmək lazımdır. Minimum qatılığın götürülməsi eyni zamanda ona görə lazımdır ki, BDU-nun yüksək qatılığı fluoressensiya intensivliyinin zəifləməsinə səbəb olur.

BXM-nin analizi vaxtı nəzərə almaq lazımdır ki, BDU-əsası ilə əvəz olunmuş DNT, ekzogen amillər ilə induksiya olunmuş BXM-nə və xromosom aberrasiyasına daha çox həssas olur. Yalnız  $G_2$  dövründə ilk mitotik tsiklə təsir nəticəsində baş verən mübadilə heç də kontroldan fərq-lənmir.

İndi isə biz müxtəlif test-sistem üzərində BXM-nin təyin edilməsinə əsaslanmış bir neçə təcrübənin sxemi ilə tanış olaq.

BXM-si ilə əlaqədar olan bir sıra məsəlləri və eləcə də BXM-nin baş verməsinin molekulyar mexanizmini başa düşmək üçün aşağıda qeyd olunan müəlliflərin işləri ilə tanış olmaq lazımdır. Letta (*Lett et al*, 1978, *Lett* 1981), Şubert və Rilger (*Schubert, Rilger*, 1981).

Müasir dövrdə tədqiqatçılar tərəfindən müxtəlif testlər üçün bir qədər modifikasiya olunmuş, Perri və Wolf tərəfindən təkmilləşdirilmiş diferensial rəngləmə üsulundan istifadə edilir ki, burada da preparatın rənglənməsinə Qimza rəngləyicisi ilə flyuroxrom *Hoechst* 33258-in birləşməsindən istifadə edilir.

Metodika dağ siçanının hüceyrələrinin kulturaları

üzərində işlənib hazırlanmış və bir sıra tədqiqatçıların işlərində isə məməlilərin *in vivo* və müxtəlif üzvlərinin kultura olunan hüceyrələrində ekstremal amillərin sitogenetik toksikliyini müəyyən etməkdə tətbiq edilir.

#### **4.6. Çin dağ siçanının hüceyrələrinin diferensial rənglənməsi üsulu ilə BXM-ni analizi (Perry, Wolf, 1974)**

Perri və Volfun dağ siçanının yumurtalıq hüceyrələri üzərində hazırlanmış metodu, sonralar müvəffəqiyyətlə bu gəmiricinin başqa orqanlarının kultura olunan hüceyrələrinin tədqiqi üçün də istifadə olunmuş və müəlliflər buna əsaslanaraq BXM-nin analizinin təyin edilməsi üsulunda müəyyən dəyişilmələr etmişlər.

Yuxarıda göstərildiyi kimi metodun prinsipi ondan ibarətdir ki, BDU-nun iştirakı ilə iki replikasiya tsikli müd-dətində kultura olunan hüceyrənin xpomosom xromatidləri flyuroxromla *Hoechst* 33258 rənglənən zaman flyuressen-siya edir. Əgər belə xromosomları  $60^{\circ}\text{C}$ -də  $2\times\text{SSC}$  məh-lulu və yaxud distillə suyu ilə işləsək və 3-5 faizli Qimza rəng-ləyicisi ilə rəngləsək, onda xromatidlərdən biri tünd, digəri isə açıq rənglənmiş olacaq. Mitozun ikinci metafa-zasında tünd rənglənmiş xromatid o xromatiddir ki, burada DNT zəncirlərindən birini, açıq rənglənmiş xromatiddə isə hər iki DNT zəncirinə timidinin əvəzinə BDU daxil olmuşdur.

Müəlliflər hüceyrəni kultura edərkən qidalı mühit kimi Mak-Noyanı götürmüş və buraya 15 faizli öküz zərdabı daxil etmişlər.

Müxtəlif məməlilərin hüceyrələrində bacı xromatidlərin normal diferensial rənglənməsini təmin etmək üçün kultura I99 №-li qidalı mühitdə böyüyən zaman BDU-nun aşağı

qatılığı tələb olunur. Hazırda BXM-nin analizində kultura olunan hüceyrələr üçün qidalı mühit kimi I99 və İqla-dan, həmçinin onlarla birlikdə 10-15 faizli öküz və buzov zərdabından istifadə edilir.

Metod aşağıdakı ardıcıl mərhələlərdən ibarətdir:

1. Hüceyrələr dağıniq işıqda şüşə flakonda əkilir və  $37^{\circ}\text{C}$ -də qaranlıqda BDU daxil edilməklə iki replikasiya tsikli müddətində inkubasiya edilir.

Müxtəlif xətdən olan hüceyrələr üçün kultura olunan müddət subyektiv ola bilər: yumurtalıq və fibroblast hüceyrələri 24 saat, diafraqma və timus hüceyrələri 26-28 saat və i.a. Hər hüceyrə xətti üçün BDU-nun qatılığı empirik seçilir. Misal üçün keyfiyyətli diferensial rəngləmə almaq üçün yumurtalıq hüceyrələri üçün BDU-nun qatılığı 3 mkq/ml *Don* və 79/31 üçün 5 mkq/ml, CHO-K<sub>1</sub> və 79 (AP4-10) mkq/ml və i.a. götürülür.

2. Fiksasiyaya 2-4 saat qalmış mühitə kolxitsin (0,05 mkq/ml) yaxud  $2,10^{-7}$  m qatılıqda kolsemdir əlavə edilir.

3. Hüceyrələr tripsinizasiya olunmaqla şüşədən ayrıılır, hipatonizasiya, (0,075 M məhlulu fiksasiya) sirkə alkoqolu mərhələlərinə əməl etməklə, hüceyrə və toxuma kulturalarında xromosomun struktur dəyişmələrinin analizi üçün olan metoda uyğun olaraq, əşya şüşəsi üzərində quru-hava preparatı hazırlanır.

Tədqiqatın qarşıya qoyulan məqsədindən asılı olaraq ekstremal amilin genetik toksikliyini müəyyən etmək üçün kultura olan mühitə BDU daxil edilənə qədər və eyni zamanda hüceyrə BDU ilə inkubasiya olunan prosesdə, kolxitsinlə işlənənə qədər təsir etmək olar.

Preparat qurudulduğdan sonra onların keyfiyyətini yoxlamaq üçün kontrol olaraq seçmə yolu ilə bir-iki

paraparı asetokarminlə 10 dəqiqə rəngləyib mikroskopda metafaza hüceyrələrinin miqdarına və xromosomların yayılmasına baxmaq lazımdır.

4. Fiksasiya olunmuş materiallar 1-7 gün ərzində termostatda qalır və sonra ionsuzlaşdırılmış və yaxud distillə suyunda flyuroxrom Nyuxest 33258 məhlulu ilə rənglənir. Rəngləyicinin qatılığı 0,5 mq/ml, rəngləmə müddəti isə 12-15 dəqiqədir. Bir çox müəlliflər flyuroxromun daha zəif 0,5-5,0 mkq/ml məhlulundan istifadə edirlər.

5. Preparat ionsuzlaşdırılmış və yaxud distilə suyunda yaxalanır və havada qurudulur.

6. Preparat Mak-İlveyn buferinə (pH 8,0) salınır, örtücü şüşə ilə bağlanır, işıqda və yaxud da 10-15 sm məsafədən 5-15 dəqiqə civə lampasının köməkliyi ilə ultrabənövşəyi şüalarda şüalandırılır və çalışmaq lazımdır ki, preparat qurmasın. Bəzi hallarda preparat örtücü şüşə ilə örtülür. Mak-İlveyn buferinin tərkibi (pH 8,0) 19,45 ml 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 12  $\text{H}_2\text{O}$  – 0,55 ml 0,1 M  $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  limon turşusu 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . 12  $\text{H}_2\text{O}$  – 7,16 q 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ -da.

0,1 M  $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$  - 1,92 q 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ -da.

7. Örtücü şüşə kənar edilir və preparat 1-24 saat ərzində 60°C temperaturada 2×SS5 C və yaxud distillə suyunda inkubasiya edilir.

0,3 M natrium xlorid – 0,03 M natrium sitrat 7,5 q/l – 8,82 q/l natrium sitrat.

8. Preparat distillə suyu ilə yuyulur, havada qurudulur və təzə hazırlanmış 3-5 faizli Qimza rəngləyicisi məhlulu ilə Zerensen fosfat buferində (pH 6,8) 5-30 dəqiqə müddətinə rənglənir.

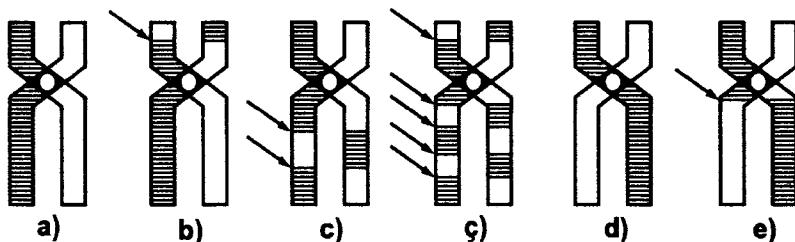
#### 4.7. Zerensen buferinin (pH 6,8) tərkibi

50 ml 1/15 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2 H<sub>2</sub>O – 50 ml 1/15 M K H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
11,876 q/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> .2 H<sub>2</sub>O – 9,078 q/l K H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

9. Rəng distillə suyu ilə yuyulur, qurudulur və ksiloldan keçirilir.

10. Mikroskopla metafaza xromosomlarında bacı xromatid mübadiləsinin analizi aparılır.

Müxtəlif tipli BXM-nin sxemi 4.5-ci şəkildə verilmişdir.



Şəkil 4.5. Müxtəlif tipli BXM (Poryadkov və Antoşınə görə, 1980):

a – mübadiləsiz xromosom; b – terminal mübadilə; c – katerkalyar mübadilə;  
ç – interkalıar və sentromer mübadilə; d – sentromer mübadilə nəzərə alınır, ona görə ki, preparat hazırlanın zamanı artefakt olaraq xromosomun çiyini də dəyişə bilər; e – sentromerin yaxın sahəsində mübadilə.

Bu metodla başqa laboratoriya heyvanlarının kultura olunan hüceyrələrində BXM-ni öyrənmək olar, lakin bunun üçün həmin obyekti mitotik tsiklinin müddətini və BDU-nun optimal effektli dozasını bilmək lazımdır. Metod paralel olaraq xromosom aberrasiyasının və bacı xromatid mübadiləsinin analizi ilə yanaşı ekstremal amilin mutagen və konserogen təsirini öyrənməyə imkan verir. Bunun üçün hər şeydən əvvəl iki tsikli replikasiya ərzində hüceyrəni BDU və mutagenlə inkubasiya edirlər, bir replikasiya tsikli keçən

materialın bir hissəsini isə xromosom aberrasiyalarının analizi üçün fiksə edirlər. Bundan əlavə çin dağ siçanının hüceyrə kulturaları üzərində mikronüvələrə görə eyni vaxtda bacı xromatid mübadiləsini və xromosom aberrasiyasının öyrənilməsi metodu işlənib hazırlanmışdır (*Heddie, Lay, 1979*). Müəlliflər göstərmmişlər ki, mutagenin təsirindən sonra ikinci mitozda BXM-nin analizi vaxtda paralel olaraq birinci mitozda asentrik fragmentlərdən əmələ gələn mikronüvələri saymaq olar.

Poryadkova və Antoşina (1980) tərəfindən fulyuroxrom istifadə olunmadan xromatidin diferensial rənglənməsinə görə dağ siçanının hüceyrələrində BXM-ni müəyyən etmək metodikası verilmişdir. Metod ondan ibarətdir ki, iki tsikl replikasiya ərzində 5 BDU – mühitində becərilən hüceyrə Xyuxst-33258 rəngləyicisi ilə rənglənmədən ultrabənövşəyi şüalarla işıqlandırılır və azur-eozinlə rənglənir.

Daha yaxşı nəticəyə təcrübəni aşağıdakı sxem üzrə apardıqda  $37^{\circ}\text{C}$ -də 28 saat ərzində İqla mühitinə qlyutamin turşusu, 15 faizli öküz zərdabı və  $10^{-5}$  M qatılıqda 5 BDU əlavə etməklə inkubasiya edilir. Fiksasiyaya 2 saat qalmış kolxitsin əlavə edilir. 0,075 M kalium xlor məhlulu ilə hipotonizasiya olunur və etanol sirkə turşusu (3:1) qarışığında fiksə edilir.

Preparat soyuq, nəmlı şüşə üzərində havada qurutma üsulu ilə hazırlanır, sonra onu bərabər qarışığı 0,3 M sodium xlorid və 0,03 M sodium sitrat ilə isladılır və Petri şüşədə civə lampası ilə (DPT-375) 15 SM məsafədən 15-20 dəqiqə müddətində işıqlandırılır. Preparat su ilə yuyulur, qurudulur və 0,05 M fosfat buferində (pH 6,8) hazırlanmış 0,1 faizli azur II və eozin sodium məhlulu qarışığında 5-6 dəqiqə müddətində rənglənir. Preparat rənglənməzdən əvvəl

rəng aşağıdakı qayda üzrə hazırlanır: 15 ml fosfat buferinə 0,05 Mp H 6,8/m eozin və 2,5 ml azur II əlavə edilir. Preparat rəngləndikdən sonra axar su ilə yuyulur və quru-dulur. İşlərin bu cür ardıcıl aparılmasından sonra müəlliflər ikinci mitozun metafaza xromosomlarında bacı xromatid-lərinin keyfiyyətli diferensial rənglənməsinə nail olmuşlar.

**Laboratoriya heyvanlarının limfosit kulturalarında BXM-nin analizi.** Kliqerman müəlliflərlə birlikdə (*Kügerman et al*, 1981) heyvanları öldürmədən BXM-ni analiz etmək üçün sadə, münasib metod işləyib hazırlamışlar.

Siçovulun/*Fischer*-344 xəttindən olan erkəklərə kimyəvi mutagen maddə ilə təsir edilir və sonra müxtəlif vaxtlarda punksiya ilə ürəkdən 1 və 2 ml qan alınır. Limfosit bir neçə dəfə fosfat buferində (pH 7,4) yuyulur və tərkibində 2-4 mkq/ml FQA olan RMU 1640 mühitində becərilir. Limfosit eyni zamanda I99 qidalı mühitdə və yaxud da FQA əlavə olunmuş 10-15 faiz öküz zərdabı olan İqla mühitində də kultura oluna bilər. Kulturanın 24-cü saatında, yəni S dövrünün başlangıç mərhələsində kulturaya 5-BDU (1,0 mkM) daxil edilir. Limfosit kulturasının 56-ci saatında kultura fiksə edilir, quru-hava preparatı hazırlanır. FPQ texnikası köməkliyi ilə rənglənir və metafaza lövhəsində BXM-si analiz olunur.

Metod aşağıdakı üstünlüklərə malikdir: hüceyrələrə *in vivo*-da təsir edilir və təsirin nəticəsini bir heyvanın müxtəlif dövrlərində qeydə almaq olar.

**Su heyvanlarında BXM-nin analizi.** Müasir dövrdə BXM-si testindən istifadə edərək suyun genotoksik çirkənməsini öyrənmək üçün sitogenetik metod işlənilər hazırlanmışdır. Bu məqsədlə obyekt olaraq baliqdan, kariotipində az xromosom olan midiyadan (*mytilus edulis*) və balığın (*Ameca splendens*)

ilkin embrional toxumasından alınmış somatik hüceyrənin dəyişdirilmiş xəttindən istifadə edilmişdir.

Bu üsul eyni zamanda suların təmizliyinin tədqiq edilməsində və induksiya olunmuş mutagenezdə öz əksini tapa bilər. Əlverişli münasib obyekt isə Midiya sayılır. Təcrübəni qarşıya qoyulan məqsəddən asılı olaraq iki üsulla aparmaq olar.

Birinci halda suyun təmizliyini müəyyən etmək üçün midiyanı tədqiqatçını maraqlandıran suda saxlayırlar, sonra isə 48 saat müddətində BDU-nun ( $6 \cdot 10^{-5}$ ) sulu məhlulunda saxlayırlar. Ekspozisiyanın axırına 6 saat qalmış kolxitsinlə ( $0,04$ ) təsir edilir, qəlsəmədən bir hissə kəsilir, sirkə alkoqollunda fiksə olunur. Xyuxset-Qimza üsulu ilə rənglənir və somatik hüceyrələrdə BXM-ni analiz edirlər.

İkinci halda isə midiya induksiya olunmuş mutagenezdə test-sistem kimi istifadə edərkən onu birinci halda olduğu kimi 48 saat müddətində BDU-nun ( $5 \cdot 10^{-5}$  M) sulu məhlulunda saxlanır və eyni zamanda bu müddət ərzində tədqiq olunan ekstremal amillə uzun və yaxud qısa müddətə təsir edilir. Preparatın hazırlanması isə yuxarıda qeyd olunan ardıcılıqla aparılır.

#### **4.8. İnsanların limfosit qan kulturalarında BXM-nin analizi**

Bu metodla müxtəlif mühit amilləri ilə temasda olan və ekstremal amillərin təsirinə məruz qalmış insanlarda (hansi ki, normal şəraitdə həmin amillərlə qarşılaşmayıblar) genetik dəyişilmələri müəyyən etmək olur. Sağlam donorlardan alınmış qanda induksiya olunmuş mutagenezdə bu üsulun köməyi ilə tədqiq olunacaq amilin çox kiçik miqdarda

genetik toksikliyini müəyyən etmək olur. Bu metodla alınan nəticələrin insanlara şamil edilməsi ilə insanları vaxtında mutagen amillərin təsirindən qorumaq olar.

BXM-nin analizi üçün makrometod sxemi üzrə insanda venoz qandan istifadə edilir. Kultura məhlulu aşağıdakı nisbətdə qeyd olunan qarşıqlardan hazırlanır. 40 ml I99 qida mühiti, 10 ml öküz zərdabı (və yaxud IV qrup) AB (insan zərdabı) – 100-200 vahid penisillin – 50-100 – vahid ml streptomitsin. Plazma kultura mühitində 1:3 nisbətdə qarışdırılır və 10 ml məhlula 0,2 ml FQA («Wellcome» və yaxud «Calbiochem») və BDU əlavə edilir. I99 qida mühitdə insanların limfosit qan hüceyrələrinin inkişafı üçün BDU-nun maksimum miqdarı 0,5 mkq/ml-dir, lakin müəyyən edilmişdir ki, onun qatılığının 100 mkq/ml-ə qədər artması BXM-nə zəif təsir göstərir.

Təcrubi olaraq müəyyən edilmişdir ki, insanların periferik limfosit qan hüceyrələrindən yüksək keyfiyyətli preparat almaq üçün BDU-nun qatılığı 1-10 mkq/ml daxilində olmalıdır. Hazır suspenziya 2-2,5 ml penisillin şüşələrinə töküür və 37°C-də termostatda 72 saat ərzində kultura olunur. Hüceyrələrin şüşələrin divarlarına yapışmaması üçün kultura olunan vaxt onu fasıləsiz olaraq silkələmək lazımdır. DNT olan mühitdə BDU-nun fotolizinin qarşısını almaq üçün mühitə BDU daxil edildikdən sonra penisillin şüşəsinin ağını qara qapaqla və yaxud qalın qara kağıza bükmək lazımdır. BDU olan mühitdə kultura olunan limfositlərin 72-ci saatda fiksə olunması, preparatlardan 1-3-cü mitozda olan, daha doğrusu bir, iki, üç replikasiya tsikli keçmiş hüceyrələri eyniləşdirməyə imkan verir. Preparatların rənglənməsindən sonra xromosomların 3 tip flüoressensiyasını müəyyən etmək olur (bax: şəkil 4.4).

Birinci halda hüceyrələr bir tsikl replikasiya müddətində BDU-nun iştirakı ilə kultura olunduqda halloidləşmiş əsaslar DNT-molekulunun bir zəncirinə daxil olduğu üçün xromosomun hər iki xromatidində flüorensensiya bərabər gedir. BDU olan mühitdə iki ardıcıl bölünmə tsiklini keçən hüceyrələrin metafaza xromosomlarındakı bacı xromatidləri, polinukleotid zəncirinə daxil olan BDU-nun miqdarnın müxtəlif olması nəticəsində qeyri-bərabər işıqlanma verir. BDU olan mühitdə xromosomların üç ardıcıl replikasiyasında xromosom yiğiminin təxminini yarısında diferensial rənglənmə müşahidə edilir, qalan xromosomlarda isə hər iki xromatid zəif flüorensensiya edir. Hüceyrələrin I-III bölünməsinin fiksasiyalarında – (42-dən 72-yə qədər) BDU-nun iştirakı ilə kultura olunan limfositlərdə müəyyən olunmuşdur ki, II bölünən hüceyrələr (diferensial rənglənən xromatidlər) 48-ci saatda 3% – 72-ci saatda isə belə hüceyrələrin miqdarı ümumi metafazanın 40%-ni təşkil etdiyi halda, III bölünən hüceyrələrin miqdarı isə 33% təşkil edir.

Mutagen amillərin sitogenetik toksikliyini BXM-nin tezliyini artırmaqla, hüceyrənin mitotik aktivliyini dəyişdirərək diferensial rənglənmiş metafaza hüceyrələrinin xromatidlərini modifikasiya edə bilər. Belə ki, benzen-katekolun və hidroxinonun 0,2 ml qatılıqda metabolitləri BXM-in 5 dəfə artırmaqla, hüceyrənin bölünmə tsiklini 24 saat yubada bilər. Belə olduqda fiksasiya vaxtını empirik yolla seçməklə, diferensial rənglənmiş xromatid hüceyrələrinin üzə çıxma vaxtını müəyyən etmək lazımdır.

Hüceyrələrin fiksasiyasına 2-3 saat qalmış mühitə (Xenksin şəffaf məhluluna) 0,02-0,1 mkq/ml kolsemdir əlavə edilir, sonra isə hüceyrələri 15-20 dəqiqə ərzində 0,075 M KS-la hipotonizasiya olunur və metanol-sirkə fiksatoru (3:1) ilə

fiksə edilir. Preparatlar quru hava metodu ilə hazırlanır. Bir-iki preparat nümunə üçün asetokarmın ilə rənglənir və onların keyfiyyəti yoxlanılır. Bacı mübadilələrini qeyd etmək üçün preparat FPQ-texnika ilə rənglənir və dağ siçanlarının hüceyrələrinin diferensial rənglənməsi vasitəsilə BXM-nin analiz olunması metodu sxeminə uyğun aparılır.

Korenberq və Fridlender (*Korenberg, Freedlander, 1974*), sonralar isə Çeboṭarev əməkdaşlarla (1978) birlikdə dağ siçanı hüceyrələrinin kulturalarında bacı xromatidlərinin sabit diferensial rənglənməsini və Xyuxest 33258 flyuroxrom istifadə olunmadan, insanların periferik limfosit qan hüceyrələrinin qısa müddətdə kulturasının alınması metodunu işləyib hazırlamışlar. Bu sadə və yüksək effektli metod olmaqla o biri metodlardan əlverişli olmasına və az material sərf etməklə, geniş miqdarda reaktivlərdən istifadə olmasına imkan verir.

Quru-hava metodu ilə hazırlanmış xromosom preparatları rənglənməzdən əvvəl 24 saatdan az olmayıaraq  $37^{\circ}\text{C}$ -də termostatda saxlanır və sonra aşağıdakı qayda üzrə rənglənir. Preparat 5 dəqiqə müddətinə Zyarensenin pH 6,7 olan fosfat buferində 0,005-0,01%-li akridin narıncı məhluluna və yaxud 10 dəqiqə müddətinə  $10^{-5}$  M onun sulu məhluluna qoyulur, su ilə yuyulur və qurudulur. Sonra preparat həmin buferin və yaxud 0,07 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  məhlulunun nazik təbəqəsi ilə örtülür. Hüceyrə 30-40 sm məsafədən 10-20 dəqiqə ərzində ultrabənövşəyi şüa ilə işıqlandırılır (eksposisiya müddəti empirik yolla seçilir), axar suda yuyulur. İnsan limfositi 5 dəqiqə və dağ siçanının limfositi isə 30 dəqiqə otaq temperaturunda saxlanılır (barium hidroksinlə uzun müddət işlədikdə və temperatura yüksək olduqda) hər iki xromatid zəif rənglənir və diferensial rənglənmə nəzərə çarpmır.

#### 4.9. Bitki hüceyrələrində BXM-nin analizi

Hazırda müxtəlif növ bitkilərin meristem hüceyrələrində spontan və induksiya olunmuş BXM-nin qeydə alınması üçün preparatların hazırlanmasına dair bir neçə metod mövcuddur. Bu metodların bir qisminin əsasın isə məməlli-lərin hüceyrələrinin BDU ilə inkubasiyasından sonra BXM-nin analizi üçün yuxarıda təsvir olunmuş hüceyrələrin FPQ-texnika ilə rənglənməsi təşkil edilir. Fərqləndirici cəhət ondan ibarətdir ki, bitki toxumaları fiksasiyadan sonra pektinaza fermenti ilə işlənməli və spirtin tədricən zəif qatlıqlarından keçirilməlidir.

Bitki hüceyrələri xromatidlərinin diferensial rənglənmə metodu *Vicia faba* toxumlarının cürcətiləri üzərində işlənib hazırlanmışdır (*Kihlman, Kronberg* 1975). Sonralar isə *Vicia faba*, *Allium cepa* və başqa bitki test-obyektləri üçün bu metodun spontan və induksiya olunmuş mutagenezin tədqiqi üçün bir sıra modifikasiyası işlənib hazırlanmışdır (*Kihlman, Sturelid*, 1978); *Schvatuman et all* 1981; *Andersson* 1981; *Andersson et all* 1981; *Cortes et all* 1983).

Aşağıda bitki hüceyrələri xromatidlərinin diferensial rənglənməsi metodu verilir ki, bunun da əsasını başqa müəlliflər tərəfindən modifikasiya olunmuş Kilmən və Korenberq (*Kihlman, Kronberg* 1975) sxemi təşkil edir.

1. *Vicia faba*-nın yan cürcətiləri 16 saat (bir tsikl replikasiya) müddətində 100  $\mu\text{M}$  5-BDU, 0,1  $\mu\text{M}$  5-FDU (5-flordezoksiuridin) və 5  $\mu\text{M}$  uridin qarışığında adi suda cürcərdilir.

2. İkinci tsikl replikasiyada isə (sonuncu 16-ci saat) cürcəti 100  $\mu\text{M}$  timidin və 5  $\mu\text{M}$  uridin qarışığı olan sulu məhlulda cürcərdilir.

Əgər tədqiq olunan mutasiya indikatoru, hüceyrə proliferasiyasının vaxtını modifikasiya edirə, onda cücərtinin timidin və uridin mühitində qalma vaxtını 18-21 saat uzatmaq olur və fiksasiya müddəti isə empirik yolla seçilir.

3. Tədqiqat işlərinin məqsədindən asılı olaraq mutagenlə təsir, ikinci tsikl replikasiya müddətində və ya 16 saat ərzində və ya impulsiv olaraq 0,5-2 saat ərzində aparılır.

4. Fiksasiyada 3 saat qalmış cücərtilər 0,05%-li kolxitsin məhluluna keçirilir. Cücərtinin kökcük'ləri soyuq ( $4^{\circ}\text{C}$ ) metanolla sirkə turşusu qarışığında (3:1) fiksə olunur.

5. Cücərti fiksasiyadan sonra 0,001 M sitrat buferində (pH 4,7) yuyulur, limon turşusu ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) sitrat natrium ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) və bu buferdə həll olmuş 0,5%-li pektinaza ilə 75 dəqiqə  $27^{\circ}\text{C}$ -də inkubasiya edilir.

6. Kökcüyün meristem hissəsi əşya şüşəsinin üzərinə qoyulur, bir damla 45%-li sirkə turşusu əlavə edilir, əzilir və örtücü şüşə ilə örtülür. Sonra əşya şüşəsi quru buz üzərinə qoyulur, örtücü şüşə xaric edilir və preparat aşağıdakı ardıcılıqla etanol məhlullarından (100, 95, 85, 70, 50 və 30) keçirilir.

7. Preparat RNT-za məhlulunda nəm kamerada 60 dəqiqə inkubasiya edilir. RNT məhlulu aşağıdakı qayda üzrə hazırlanır. 1 mq RNT 10 ml 0,5×SSC-də həll edilir (0,075 M – 0,075 M sitrat natrium). Hazırlanmış bu məhluldan 0,2 ml götürüb preparatın üstünə qoyulur və örtücü şüşə ilə örtülür.

8. Preparat 0,5×SSC-də yaxalanır və 20 dəqiqə ərzində Xyuxst 33258 ilə rənglənir (rəngləyicinin qatılığı 0,5 mkq/ml 0,5×SSC).

**Flyuroxrom məhlulunun hazırlanması.** a) 1 mq Xyuxst 1

ml etil spirtində həll edilir; b) bu məhluldan 0,1 ml götürüb 200 ml 0,5×SSC-yə əlavə edilir.

9. Preparat distillə suyu daması içərisinə qoyulur, örtücü şüşə ilə örtülür və işıqda ekspozisiya olunur və yaxud da ultrabənövşəyi şüalarla şüalandırılır (preparat şüalandırılar kən örtücü şüşə ilə bağlanmır). Ekspozisiya müddəti təcrübi yolla seçilir.

10. 0,5×SSC – məhlulunda 55°C-də 60 dəqiqə inkubasiya olunur, 0,017 M, fosfat buferində (pH 6,8) yuyulur və həmin buferdə hazırlanmış 30 faizli Qimza məhlulu ilə 6-7 dəqiqə rənglənir.

11. Fosfat buferində, distillə suyunda yuyulur və havada qurudulur.

Standart Fyulgen reaktivisi ilə (*Tempelaar et all* 1982) rənglənmüş *Vicia faba*-nın meristem hüeyrələrində BXM-nin sitofotometrik analiz metodu özünün sadəliyi ilə fərqlənən metodlardan biridir.

Yuxarıda qeyd olunan metodikaya uyğun olaraq müəyyən mərhələdən və fiksasiyadan sonra cücertinin kökü 28°C-də 5n HCl-da 40-70 dəqiqə hidroliz olunur (hər bir obyekt üçün hidroliz müddəti fərdi seçilir). Sonra material 5-10 dəqiqə yuyulur və standart Fyulgen reaktivində rənglənir və əzilmiş preparat düzəldilir.

**Laboratoriya heyvanlarında *in vivo*-da BXM-nin analizi.** Ətraf mühitin mutagen amillərinin *in vivo*-da sitogenetik toksikiliyini analiz etmək üçün obyekt olaraq əksər hallarda məməlilərdən: Suriya və çin dağ siçanlarından, ev dovşanlarından, xətli və cins olmayan siçovul və siçanlardan, az hallarda isə itlərdən və meymunlardan istifadə edilir. Son illər isə tədqiqat məqsədi ilə daha bir obyektdən də (*Muntiacus muntjac*) geniş istifadə edilir. Bu obyektin

müsbət keyfiyyət göstəricilərindən biri onun hüceyrələrində xromosom sayının az olmasıdır. Bunlarda diploid xromosom yığımı 6-dır ( $2n=6$ ).

Ətraf mühitin amillərinin genetik təsirini öyrənmək üçün tədqiqatların, obyekt olaraq *in vivo* və *in vitro*-da məməlilər üzərində aparılması nəticəsində alınan məlumatları insanlara da şamil etmək olar. Ətraf mühitin mutagen faktorlarının *in vivo*-da məməlilər üzərində yoxlanmasının müsbət cəhətlərindən biri də ondan ibarətdir ki, burada mutagen faktorlarının optimal klassikliyi haqqında müəyyən məlumat əldə etmək olur. Əgər kultura olunan hüceyrələrdə mutagen və kanserogen amillərin təsiri hüceyrə səviyyəsində öyrənilərsə, məməlilərdə *in vivo*-da isə bu tam orqanizm səviyyəsində öyrənilir, hansı ki, onlar reperativ, immun və s. müdafiədici sistemə malikdirlər.

Fiziki, kimyəvi bioloji amillərlə induksə olunmuş mutagenezdə BXM-nin analizi, BDU heyvanlara daxil edildikdən sonra və eləcə də BDU daxil edilənə qədər aşağıdakı sxem üzrə aparılır.

1. Birinci halda BDU heyvanlara iki tsikl replikasiyaya bərabər vaxt dövründə daxil edilir. İkinci halda heyvanlara ilk anda tədqiq olunan maddə ilə təsir edilir və sonra isə BDU daxil edilir.

Bəzi hallarda maddə mutagen effektlə yanaşı mitodepressiv xüsusiyyətə malik olmaqla, mitotik tsiklədə hüceyrələrin ayrı-ayrı mitozun fazalarına daxil olma sürətini zəiflədir. Bu isə özünü mitotik tsiklin müvəqqəti parametrlərində göstərir. Bunları nəzərə alaraq empirik yolla hüceyrə bölünməsinin vaxta görə fərqini aşkar etmək və heyvan orqanizminə BDU-nun qalma müddətini uyğun olaraq artırmaq lazımdır.

Tədqiqatın məqsədindən və analiz olunan toxumadan asılı olaraq BDU heyvan orqanizminə birləşfəlik, fraksiyalarda (müəyyən dövr ərzində hissə-hissə) və uzun müddətli daxil edilir. BDU-nun orqanizmə daxiledilmə üsulları aşağıdakılardır: peroral, (qida borusu ilə), venadaxili, əzələdaxili, dəri altına həb və yaxud qranula implantasiyası və s., heyvanların növündən və qarşıya qoyulan məqsəddən asılı olaraq BDU-nun dozasi müxtəlif ola bilər. Təcrubi yolla müəyyən edilmişdir ki, BDU-nun siçanlar üçün minimum dozasi  $2,2 \text{ mkq/q}$  saatdan  $135 \text{ mkq/q}$  saat, çin dağ siçanı üçün  $2,5 \cdot 10^{-5} - 4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ -dır.

2. Tədqiq olunan maddənin məhlulu orqanizmə yuxarıda qeyd olunan üsullara uyğun aparılır (rentgen və yaxud ultrabənövşəyi şüalarla işləmək lazımlı gəldikdə isə bütün bədən və yaxud bədənin ayrı-ayrı hissələri şüalandırılır).

3. Heyvanların öldürülməsinə 2-3 saat qalmış metafazada xromomsların qütblərə çəkilməsinin qarşısını almaq üçün kolxitsindən ( $0,4 \text{ ml } 300 \text{ mkq/ml}$ ), kolsemindən ( $2,5-10 \text{ mkq/q}$ , vinblastdan ( $0,2 \text{ ml } 0,9992\%-li$  məhlul)) və yaxud da demokolisindən ( $1,4 \text{ mkq/q}$ ) istifadə edilir.

4. Heyvanlar öldürülür və əvvəlcədən qeyd etdiyimiz üsul üzrə lazımı orqanlardan quru-hava preparatı hazırlanır.

Qarşıya qoyulan məqsəddən və təcrübədən asılı olaraq analiz üçün aşağıdakı materiallardan istifadə edilə bilər: heyvanın sümük iliyi hüceyrələri, limfositləri, bağırısaq toxuması, qara ciyər, spermotoqoniyalar və s. Təcrübədə dişi heyvanların boğazlıq dövründə isə analiz üçün material ana və embrion orqanı götürülə bilər.

5. FPQ – texnika vasitəsi ilə diferensial rənglənmə aparılır və metafaza lövhələrində BXM-si analiz edilir.

Vaxta qənaət məqsədi ilə genotoksikliyi tədqiq olunan amilin orqanizmə BDU – daxil edildikdən sonra verilməsi Toriqo və onun əməkdaşları tərəfindən təklif edilmişdir (*Torigoe et al.*, 1980) BXM-nin analizi sümük iliyi hüceyrələrindən hazırlanmış preparatlarda aparılmışdır ki, həmin preparatlar aşağıdakı qayda üzrə hazırlanmışdır.

1. DNT-yə daxil olan BDU-nun miqdarını artırmaq üçün 6-9 həftəlik siçanlara bədən çəkilərinə görə 0,4 mq/q 5-flordezoksiudiedin verilir.
2. 3 saatdan sonra qarına avtomatik nasos vasitəsi ilə BDU daxil edilir (qatılıq 4 mq/ml, verilmə sürəti 2 ml c müddəti 6 saat).
3. Orqanizmə BDU daxil edildikdən 15 dəqiqə sonra, sitogenetik toksikliyə malik olan siklofosfamid daxil edilir.
4. 30 saatdan sonra kolxitsin daxil edilir, sonra isə 3 saatdan sonra siçan öldürülür və sümük iliyi götürülür.
5. Materiallar fosfat buferində pH 7,0 olmaqla 12 dəqiqə müddətində Xyuxst 33258 ilə rənglənir və quru hava preparati hazırlanır.
6. Preparat içərisində həmin bufer olan Petri qablara keçirilir və 10 sm məsafədən 200 vt-liq civə lampası ilə şüalandırılır (bu isə preparatın «yetişmsi» üçün tələb olunan dövrü təxirə salır).
7. Preparat 60°C-də 15-30 dəqiqə 2×SS°C məhlulunda inkubasiya edilir və 3%-li Qimza rəngləyicisi ilə (pH 6,8) 30 dəqiqə rənglənir.

Kram əməkdaşları ilə (*Kram et al.*, 1979) DNT-ni zədələyə bilən teratogenlə induksiya olunmuş dölün və ananın (*in vitro*) toxumalarında BXM-ni tez müəyyən etmək üçün metod işləyib hazırlamışlar. Bir çox teratogenlər öz təsirini müxtəlif orqanlara və hamiləliyin ayrı-ayrı

mərhələlərinə göstərir. Bu isə dölün inkişaf dövründə müxtəlif üzvlərin hüceyrələrinin kimyəvi mutagen maddələrə həssaslığını müəyyən etməyə imkan verir.

Müəlliflərin təklif etdikləri sxemə uyğun olaraq boğaz sıçanlara (metodika S 75 BL – 6J xəttindən olan sıçanlar üçün hazırlanmışdır) venadaxili 24 saat ərzində 50 mq/kq intensivlikdə BDU verilir. Tədqiq olunan birləşmə isə BDU orqanizmə daxil edildikdən 1 saat sonra venaya daxil edilir. Heyvanların öldürülməsinə 1 saat qalmış 2,5 mkq/q kolsemdir inyeksiya edilir.

Götürülmüş döl və müxtəlif üzvlərin toxumalarından götürülmüş hissəciklər 0,2%-li kollagenaza məhlulunda inkubasiya edilir.

Hüceyrənin alınmış suspenziyası 0,07 M HCl-məhlulu ilə işlənir və metanol sirkə fiksatoru (3:1) ilə fiksə olunur və quru hava preparati düzəldilir. Material 4-6 diamino-2-fenilindol (10 mkq/ml) ilə rənglənir və flüoressent mikroskopunda tədqiq olunur.

#### **4.10. Salmonellada gen mutasiyasının analizi**

Son zamanlar ətraf mühit amillərinin gen mutasiyası səviyyəsində mutagen aktivliyinin və genetik təsirinin öyrənilməsində qısa müddətli və yüksək həssaslığa malik testlərdən geniş istifadə edilir.

Genotoksiki amillərin təsiri ilə gen mutasiyalarının öyrənilməsində prokoriot orqanizmlərdən – bakteriyaLardan (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*), eukoriotlardan – maya göbələklərindən (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*), göbələklərdən (*Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*),

heyvanlardan (*Drosophila melanogaster*) istifadə edilir.

Biz aşağıdakı prokariot (*Salmonella typhimurium*) və eukariot (*Saccharomyces cerevisiae*) test-sistemlərdə gen mutasiyalarnın öyrənilməsində istifadə olunan metodlar üzərində dayanacaqıq. Bəzi texniki kənarlanmaları çıxmaqla birinci metodun tətbiqi bütün mikroorganizmlər üçün eynidir, ikinci metod isə ibtidai eukariotlar üçündür. Biz eyni zamanda dünyanın başqa elmi laboratoriyalarda geniş şöhrət tapmış və eyni zamanda kosmik uçuşların elmi tədqiqatlarında test-sistem kimi istifadə olunan *Arabidopsis thaliana*-da gen mutasiyalarının analizi metodu ilə tanış olacaqıq.

Ətraf mühit amillərinin genetik təsirinin öyrənilməsində test-sistem kimi götürülen drozofillə işləmə metodları haqqında ətraflı məlumatlar bir sıra dərsliklərdə, elmi əsərlərdə geniş şərh edilmişdir.

Qeyd etmək lazımdır ki, bakteriya kulturaları, maya göbələkləri ilə mikrobioloji işlər texnikasında və elcə də hər hansı bir kultura olunan hüceyrələrlə işləyən zaman maksimum təmizliyə xüsusi riayət etmək lazımdır. Daha doğrusu işin bütün mərhələləri üçün laboratoriya qabları, mühit məhlulları steril olmaqla, işlər steril bokslarda aparılır. Ştamm kulturaları ilə bütün manipulyasiyalar isə spirt lampasının alovu yaxınlığında aparılmalıdır.

Prokariot orqanizmlərlə tədqiqat işlərində amillərin ilkin genotoksikiliyini, onun mutagen aktivliyinin keyfiyyət və kəmiyyət xarakteristikasını öyrənmək üçün çox vaxt Eyms müəlliflərlə (*Ames et all*, 1973) aldığı bakteriya ştammından (*S. typhimurium*) istifadə olunur. Bu obyektin əsas üstünlüklerindən biri onunla işləmə metodunun sadəliyi və nəticələrin tez alınmasından ibarətdir. Eyni zamanda

bunlarda generasiya müddəti az yəni, 30-60 dəqiqə və mühitdə koloniyanın böyüməsi bir gün olduğu üçün vaxta qənaətə görə də çox əlverişlidir.

Eyms tərəfindən alınmış, mutagen amillərə qarşı super-həssas olan *S. typhimurium* ştammında DNT-nin zədələnməsi nəticəsi kimi histidin operonunda dörd mutasiyadan biri olur ki, bu da genetik kodda (*frameshift* – mutasiya) əks mutasiyaya görə mutageni testləşdirməyə və bir cüt əsasın əvəz olunmasına imkan verir:

Genomda delesiyanın, biotin operonu və *Uvr* genin olması nəticəsində DNT-nin ekssizion reparasiya sistemi öz əhəmiyyətini itirmiş və buna görə də ştammin mutagenin təsirinə qarşı həssaslığı yüksəlmişdir. Bakteriyanın qılıfında lipopolisaxaridin (*Jps*) miqdarnı aşağı salan *rfa* və *gal*-mutasiyası yaradılmışdır ki, bu da membrandan yüksək molekullu maddələrin daxil olmasına imkan verir. Genotoksiki amillərin tədqiqi üçün istifadə olunan ştammin TA-nın genotipi aşağıdakı cədvəldə verilmişdir.

Cədvəl 4.1

**Mutanatların tədqiqi üçün istifadə olunan  
TA-ştammının genotipi (*Ames et all*, 1973).**

Əlavə mutasiyalar		Ştammda histidin mutasiyaları			
<i>JPS</i>	<i>Repeir</i>	<i>his 46</i>	<i>his C207</i>	<i>his C3076</i>	<i>his 3052</i>
+	+	<i>his 46</i>	<i>his C207</i>	<i>his C3076</i>	<i>his 3052</i>
+	<i>Uvrβ</i>	TA 1950	TA 1951	TA 1952	TA 1534
<i>gal</i>	<i>Uvrβ</i>	TA 1930	TA 1931	TA 1932	TA 1964
<i>rfa</i>	<i>Uvrβ</i>	TA 1935	TA 1536	TA 1537	TA 1538
<i>rfa</i>	+	TA 1975	TA 1976	TA 1977	TA 1978

x/Bütün ştamlar Z T-2, *S. typhimurium* ştammından əmələ gəlmışdır. Başlanğıc gen «+» ilə işaret edilmişdir.

Delesiya (A) Uvr $\beta$  sahəsi nitratreduktaza (*Chl*) və biotin genlərini birləşdirir. Ştamlar *gal* (həmçinin *rfa uvrβ gal*, *chi*, *bio*, *uvrβ* sahələrində bir delesiyaya malik olur. Ştamm *rfa* ekssizion reparasiya sistemi ilə (*repair +*) *gal* sahəsində mutasiyaya tutulur.

TA1535 qrupunun ştamları (TA 1535, 1536, 1537, 1538) *rfa* və *uvrβ* tip mutasiyaya tutulmuşlar və mutagenezə həssas olmalarına görə Eyms bunları *in vitro*-da mutageni və kanserogeni müəyyən etmək üçün təklif etmişdir. TA 1575 qrup ştammları mutasiyaya və letallığa görə reparasiya effektini yoxlamaq üçün istifadə edilir. TA 1950 və TA 1530 qrup ştammları *in vitro*-da mutagenə az həssasdırlar, lakin *in vivo*-da isə əksinə.

TA 1535 və TA 1950 ştammlarında cüt əsasların əvəz edilməsi kimi mutasiyaların öyrənilməsində istifadə etmək olar, lakin TA 1538 və TA 1534 əks mutasiyaların öyrənilməsində istifadə edilə bilər.

Əksər mutasiyaların qeyd edilməsində histidin asılı ştammlardan istifadə etməklə Eyms testində histidin olan qidalı mühitdə mutant *S.typhimurium* inkişaf etməsindən istifadə edilir: histidin olmayan mühitdə isə onlar inkişaf etmirler. Histidin lokusunda əks mutasiya baş verdikdə ştamm histidin olmayan mühitdə inkişaf edir. Əks mutant koloniyanın sayına görə öyrənilən amilin mutagenliyi müəyyən edilir.

Tədqiqatın məqsədindən asılı olaraq amilin genotoksikiliyi öyrənilərkən, aşağıda qeyd olunan testlərdən biri və onların müxtəlif kombinasiyalardan istifadə edilir:

1) Tədqiq olunan amilin metabolizmini aktivləşdirmək və aktivləşdirməməklə *in vitro* yarımmiqdar testi.

2) Tədqiq olunan amilin metabolikliyini aktivləşdirmək

və aktivləşdirməməklə *in vitro* miqdar testi.

3) Aralıq sahibin (məməlilərin) iştirakı ilə *in vivo* testi.

Son zamanlar kimyəvi birləşmələrin mutagen aktivliyini aşkar etmək üçün Eymes ştammı ilə yanaşı Luria və Delbryuk (*Luzio, Delbrücl* 1943) fluktuasion test (*fluctuation* – kənarlanması) işləyib hazırlamışlar.

Fluktuasian testin əsas xüsusiyyəti ondan ibarətdir ki, cüzi miqdarda amin turşusu olan mühitdə indikator orqanizm və tədqiq olunan maddə qarşılıqlı əlaqədə olurlar, mutasiya baş verdikdə mühitdə olan şəkər sərf olunduğuna görə mühit turşulaşır ki, nəticədə sınaq şüşələrinin bəzilərində indikatorların rəngi dəyişir.

Qeyd etmək lazımdır ki, fluktuasion testin Eymes testinə nisbətən həssas olmasına baxmayaraq o çox zəhmət tələb edir.

Sadaladığımız testlərdən istifadə etməklə aşağıdakı təc-rübənin dəqiq sxemin və nəticələrin hesablanması üsulları verilir.

Testlərdən *in vivo* ştamm kimi TA 1950 və TA 1534-dən istifadə edilir. Hər iki ştamda *rfa* mutasiyası yoxdur, lakin buna baxmayaraq onlar ekzsion reparasiyaya malik deyildir.

**1. Metabolizmi aktivləşdirmədən preparatların qatı selektiv mühitdə gen mutasiyasının hesablanmasıın yarımi-miqdar metodu.** Metabolizmi aktivləşdirmədən preparatların qatı selektiv mühitdə tədqiqi metodu ilk dəfə olaraq Aerom və Şibalson tərəfindən (*Ayer, Szibalaki, 1958*), preparatların yarım-maye aqarın 4 st səthində tədqiqi isə Eyms əməkdaşları ilə (*Ames et all, 1973*) birlikdə təklif etmişlər. Sonralar bu metodlara müxtəlif alımlar tərəfindən bir sıra əlavələr edilmişdir. Belə metodlardan biri müəlliflərlə birlikdə Fensteynin (1977) təklif etdiyi metoddur.

Gen mutasiyasının yarımmiqli metoduna bakteriya ştamm kulturası 2%-li (20 q toz aqar 1000 ml ətli-pepton bulyonunda ətli-pepton aqarı ilə 10 ml ət-pepton bulyondan keçirilir və aerasiya edilməzdən 37°C-də 18 saat inkubasiya edilir. Təcrübənin başlandığı gün 1 ml gecə kulturası 19 ml ətli-pepton bulyonunda əkilir və sıxlığı  $4 \cdot 10^8$  hüceyrə/ml olana qədər silkələnir və 37°C-də termostatda inkubasiya olunur. Sonra kultura sentrifuqa şüşəsinə köçürürlür və 15 dəqiqə dövr etmə sürəti 5000 dövr dəqiqə olan sentrifuqadan keçirilir. Sıxlığı  $2,0 \cdot 10^9$  hüceyrə/ml olana qədər 4 dəfə həll edilmiş çöküntü maye mühitdə suspenziya edilir.

**Minimal mühit məhlulunun tərkibi (duzlu məhlul).** Komponentlər aşağıdakı göstərilən ardıcılıqla həll edilir: üç-valentli natrium sitrat –  $2,0_2$ ,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  – 42,0q,  $K_2HPO_4$  – 18,0 q,  $KN_4/SO_4$  – 4,0 q, 1 litr distillə suyu, pH 7,2.

Petri piyaləsinə 1,5%-li aşağı minimal aqar (25 ml) töküür və otaq temperaturunda 2 saat saxlanılır.

**1,5%-li alt minimal aqarın tərkibi.** Sulu aqar – 300 ml, minimal maye mühiti 100 ml. 20%-li qlukozanın sulu məhlulu, 1%-li  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ -nun 2 ml sulu məhlulu.

Sulu aqar avtoklavda və yaxud qaynar su hamamında əridilir və əridilmiş aqara yuxarıda sayılan komponentlər əlavə edilir. Petri piyaləsinə tökülməzdən əvvəl qarışığın temperaturu 50-60°C-yə qədər aşağı salınır.

Yarızənginləşmiş yarımmaye aqar sınaq şüşəsində 100°C-də su hamamında əridilir. Sınaq şüşəsi aqarla birlikdə 46°C temperaturu olan termostatlı su hamamına qoyulur, 10-15 dəqiqədən sonra yarızənginləşmiş aqar olan sınaq şüşəsinə 0,25 ml kultura əlavə edilir.

#### **4.11. Yarırəngləşmiş üst yarımmayə aqarın tərkibi**

80 ml 0,7%-li yarımmayə minimal aqar (toz halında 7 q aqar, 6 q NaCl, 1 l distilə suyunda) su hamamında əridilir. 10 sl 0,5 mM L-histidin, HCl (9,6 mq – histidin, xlorid turşusu 100 ml distilə suyunda) və 0,25 ml biotin (6,1 mq biotin 100 ml distilə suyunda) əlavə edilir. Kolbada olan qarışiq yüngül silkələnərək qarışdırılır və 2 ml-lik sınaq şüşələrinə töküür. Cüzi miqdarda əlavə edilmiş biotin və histidin selektiv mühitdə bakteriya bölünməsini bir neçə dəfə artırır.

Sınaq şüşəsində olan maddələr alt aqarın üzərinə töküür və Petri piyaləsində 30 dəqiqə otaq temperaturunda saxlanılır. Sonra Petri piyaləsində üst aqarın səthinin mərkəzinə sterilleşdirilmiş disk süzgəc kağız parçası qoyulur və onun üzərinə 0,5 ml 1 və 10 mq/ml tədqiq olunan preparatın məhlulu töküür və termostatda 37°C-də 48 saat inkubasiya edilir.

Təcrübənin variantında hər bir ştamm üçün iki qabdan istifadə olunur. Təcrübənin kontrolu təmiz və pozitiv olur. Təmiz kontrolda disk süzgəc kağız parçasının üzərinə 0,05 ml steril distilə suyu əlavə edilir (4 qabdan istifadə edilir).

Pozitiv kontrolda isə TA 1535 ştammında cüt əsasların yerdəyişmə tipli mutasiyasını yaradan nitrozametilsidikcövhəri və TA 1538 ştammında triplet çərçivəsinin sürüşməsi ilə mutasiya əmələ gətirən, dövlət qeydiyyat nömrəsi 012074 olan preparatdan istifadə edilir. Disk süzgəc kağız parçasının üzərinə qatılığı distilə suyunda 1 mq/ml olan 0,05 ml nitrozametilsidikcövhəri məhlulu əlavə edilir, 012074 preparatından isə həmin qatılıqda dimetilsulfoksiddə olan məhluldan istifadə edilir.

**2. Metabolizmi aktivləşdirmədən, yarımmaye aqarın üst səthinə eyni vaxtda preparatla birlikdə test-kultura əlavə etməklə gen mutasiyasının tədqiq edilməsinin yarımkəmiyyət metodu.** Bu metod suda həll olmayan mutagenlərə təcrübə aparıllarkən tətbiq edilir.

İçərisində 0,6%-li yarıränglənmiş aqar olan sinaq şüşəsinə (6 q aqar tozu 1 litr ətli-pepton bulyonunda həll edilir) 0,25 ml bakteriya suspenziyası və dimetilsulfoksiddə qatılığı 0,1.0; 10; 100 və hər Petri piyaləsində 1000 mkq olan tədqiq ediləcək preparatdan 0,1 ml töküür.

Sınaq şüşəsi ovucun arasında bir neçə dəfə çəvrilməklə, içərisində olanlar qarışdırılır, alt minimal aqarın üzərinə töküür və otaq temperaturunda bərkiməsi gözlənilir (30 dəq).

Təmiz kontrol kimi yarımmaye aqarın üst qatına daxil edilmiş 0,1 ml dimetilsulfoksiddən istifadə edilir (4 Petri piyaləsi). Təcrübənin qalan hər variantında isə 2 Petri piyaləsindən istifadə edilir. TA 1535 ştammında pozitiv kontrol kimi nitrozalı sidik cövhərindən TA 1538 ştammında isə qatılığı hər Petri piyaləsində 100 mkq olan 012074 preparatın məhlulundan istifadə edilir.

Yuxarıda qeyd olunan iki metodla aparılan təcrübələrin nəticəlerinin hesablanması, təcrübə və kontrol Petri piyaləsindən revertanın qeydə alınması ilə əks mutasiya induksiyasına və histidinə görə auksotrofdan prototrofa (his  $\rightarrow$  his) doğru aparılır.

Petri piyaləsində bərk selektiv mühitdə tədqiq olunan maddənin sitogenetik toksikiliyinin analizinə kontrol variantında spontan mutasiya ilə bağlı olan revertant koloniyası, aqar səthi boyunca bərabər paylanmışdır və adətən bu təcrübələrdə onların miqdarı 10-20 koloniyyadan

artıq olmur. Mutagenin təsiri ilə diskdən müəyyən məsafədə və yaxud bilavasitə onun yaxınlığında revertant koloniya həlqəsi əmələ gəlir. Bəzi hallarda induksiya mutasiyasında koloniyaları saymaq çətin olduğuna görə koloniyaların miqdarı sayılmır, təcrübənin nəticəsi isə vizual olaraq, təcrübə qatlarında revertant koloniyaların olub olmaması «effekt var» (indeks «+») və yaxud effekt yoxdur (indeks «-») ilə qeyd edilir.

Yarimmaye aqarın üst təbəqəsinə daxil edilmiş tədqiq olunan preparatin sitogenetik toksikliyinin analizində təcrübə və kontrol Petri piyaləsində revertant koloniyalar sayılır və onların say nisbətlərinə görə preparatin mutagen aktivliyi müəyyən edilir.

**3. Metabolizmi aktivləşdirməklə *in vitro*-da gen mutasiyasının hesablanmasıın yarımkəmiyyət metodu.** Mikrobioloji test-sistemlərdən istifadə etməklə, amillərin genotoksikiliyini müəyyən etmək üçün yuxarıda istifadə olunan metodun bir sıra çatışmazlıqları vardır ki, bu da başlıca olaraq məməlilərin orqanizmində olan bir sıra fermentlərin mikroorqanizmlərdə olmaması ilə əlaqədardır. Bunun nəticəsində mikroorqanizmlər yalnız «düzünə» mutagenlərin eyniləşdirilməsində test-kultura kimi istifadə olunur, daha doğrusu «düzünə» mutagenlər isə ilkin maddənin aktivliyi ilə bağlıdır və buna görə də aktivliyi müəyyən etmək üçün metabolik aktivləşmə tələb olunmur. Bu isə metabolik aktivləşmə metodun işlənib hazırlanmasına qədər, test-mikroorqanizmlərin analizlərində səhv-mənfi cavabların alınmasına səbəb olmuşdur və amillərin *in vivo* və *in vitro*-da metabolik aktivləşməsi analizlərində alınan nəticələr bir-birinə uyğun gəlmirdi.

«Düzünə» təsir tipli mutagenlərdən fərqli olaraq «düzü-

nə olmayan» təsir tipli mutagenlərin aktivliyini müəyyən etdikdə, metabolizm prosesində əmələ gələn aralıq və son məhsullar reaktiv olur, ona görə də aktivləşmənin müxtəlif metodları tələb olunur. Metabolik aktivləşmə promutagen effektli mutagenliyə transformasiyanı stimulə edir və başlıca olaraq oksidaz sisteminin induksiyasında iştirak edir.

Müasir dövrdə promutagenlərin skrininqi üçün *S. tephimurium* ştammından istifadə etməklə *in vivo* və *in vitro*-da indikator kimi test amillərin metabolik aktivləşmə metodu işlənib hazırlanmışdır.

Testlərdə *in vitro* qab kulturalarının inkubasiya qabağı metabolik aktivatorlarla modifikasiyası geniş yayılmışdır. Tədqiq olunan birləşmələrin mikrosomal oksidləşmə sisteminin fəaliyyəti üçün, metabolik aktivator kimi məməlilərin toxuma və üzvlərinin homogenatının və həmçinin məməlilərin hepatsit ilkin suspenziya kulturalarının koamillərlə birləşməsindən istifadə edirlər. Bundan başqa kimyəvi birləşmələrin mutagenliyi tədqiq edilərkən inkubasiya qabağı komutagen hormonla işləmə metodundan istifadə edilir.

Heyvanların orqanizmində metabolik aktivləşmə vaxtı ksenobiotiklərin maddələr mübadiləsinə bir çox amil təsir edir, buna görə də *in vitro* universal metabolik aktivləşdirmə sistemi təklif etmək mümkün deyildir. Bunu nəzərə alaraq Səhv-mənfi nəticələrin miqdarını aşağı salmaq üçün müxtəlif kompleks aktivləşdirmə sistemlərindən, daha doğrusu post-mitoxondri və mikrosom fraksiyalarından, təmizlənmiş fermentlərdən, məməlilərin müxtəlif hüceyrə xətlərindən və s. istifadə edilir.

Metabolik aktivləşdirmə vaxtı istifadə olunan hər bir bakteriyanın həssaslığı haqqında *Bridges* əməkdaşları ilə (*Bridges et al.*, 1981) məruzələrdə, Kerklaan müəllfilərlə

(Kerklaan et al, 1983) məlumat məcmuələrində vermişlər. Müəlliflər göstərmişlər ki, tədqiq olunan amillərin aktivləşməsində hepatosit və S<sub>9</sub> fraksiyasının rolü bütövlükdə qara ciyərin roluna nisbətən məhduddur. *In vitro*-da metabolik aktivləşdirmədə hepatositə nisbətən S<sub>9</sub> fraksiyasından istifadə edilməsi daha məqsədə uyğundur, belə ki, S<sub>9</sub> fraksiyası olan mühitdə kimyəvi induksiya nəticəsində mutant əmələ gəlməsi daha yüksək olur.

Beləliklə, amillərin metabolik aktivləşmə metodlarının müqayisəli analizi göstərdi ki, mühitə aktivator kimi S<sub>9</sub> fraksiyasının daxil edilməsi daha əhəmiyyətlidir.

Metabolik aktivləşdirmə ilə gen mutasiyalarının *in vitro*-da yarımkəmiyyət metodu ilə hesablanmasından ardıcıl mərhələləri, yuxarıda qeyd olunan metabolizmi aktivləşdirmədən nəticələrin yarımkəmiyyət metodu ilə analizinin təcrübəsində verilmişdir.

Burada fərq yalnız ondan ibarətdir ki, tərkibində preparatın məhlulu və bakteriya kulturası olan yarımmaye aqarın üst səthinə mikrosom aktivləşmə qarışığı S<sub>9</sub> əlavə edilir.

Tam mikrosom aktivləşmə qarışığı S<sub>9</sub> fraksiyasından və koamillərdən, qeyri-tam mikrosom aktivləşmə qarışığı isə S<sub>9</sub> fraksiyasından və koamillərin həllədicisindən ibarətdir. Tam mikrosom aktivləşmə qarışığının bir millimetrində 0,3 ml S<sub>9</sub> fraksiyası, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 33 mM KCl, 5 mM qlükoza-6-fosfat, 4 mM NADF və 100 mM natrium fosfat (pH 7,4) olur. Sınaq şüşəsinə 45°S-də yumşaldılmış 2 ml üst aqarla birlikdə 0,1 ml bakteriya suspenziya kulturası (2-3.10<sup>9</sup> hüceyrə ml) əlavə edilir.

Sonra təcrübə sınaq şüşəsinə tədqiq olunacaq preparatdan 0,1 ml məhlul əlavə edilir, kontrola isə həmin

həcmidə həllədici və 0,5 ml tam və qeyri-tam mikrosom aktivləşmə qarışığı əlavə edilir. Hər bir sınaq şüşəsi ovucun içərisində fırladılmaqla qarışdırılır və Petri piyaləsində alt minimal aqarın üzərinə tökülür. İki elə aparmaq lazımdır ki, mikrosom aktivləşmə qarışığının sınaq şüşəsinə daxil edilməsi və sınaq şüşəsindəki qarışqların Petri qabına tökülmə müddəti bir dəqiqədən artıq olmasın.

37°C temperaturada 2 saatlıq inkubasiyadan sonra qablarda *his<sup>+</sup>* revertant koloniylar sayılır.

Pozitiv kontrol olaraq metabolik aktivləşmə təsiri məlum olan preparatdan istifadə edilir. Xüsusən, Fonsteyn əməkdaşları ilə birlikdə (1977) belə preparatlardan TA 1535 ştammında nitrozamorfolindən (100 və 1000 mkq (Petri piyaləsi), TA 1538 ştammında isə benzidindən (100 və 1000 mkq) Petri piyaləsi istifadə edilməsini təklif edirlər.

**4. Metabolizmi aktivləşdirilmədən gen mutasiyasının hesablanması kəmiyyət metodu.** Aşağıda təsvir olunan kəmiyyət metodunun yuxarıda təsvir olunan metoddan fərqi ondadır ki, mutantların miqdalarını hesablamaqla yanaşı, preparatın təsirindən sonra sağ qalan hüceyrələrin miqdarı da hesablanır, bu da induksion mutasiyaların hesablanmasına imkan verir.

Metabolik aktivləşməsiz testlərdə tədqiq olunan birləşmələrin mutagen aktivliyini müəyyən etmək üçün bakteriya-nın gecə kulturasından 0,5% ml götürüb 50 ml ətli-pepton bulyonuna əlavə edilir və 2,5 saat 37°C-də qatılığı  $2 \cdot 10^8$  hüceyrə/ml olana qədər becərilir. Sonra 15 dəqiqə 5000 dövr/dəqiqə olan sentrifuqada fırladılır, çöküntü dörd dəfə duzlu məhlulda həll edilməklə (pH 7,2) qatılığı  $2 \cdot 10^9$  hüceyrə/ml olana qədər suspensiziyalasdırılır. Sınaq şüşəsində bir-birindən 0,5-1,0 ardıcılıqla fərqlənən minimum 5 qatılıqda

0,2 ml tədqiq edilən birləşmədən və 0,4 ml test kulturadan ibarət sınaq qarışığı düzəldilir. Qarışq 37°C-də su hamamında 30 dəqiqə inkubasiya edilir, sonra 10 dəqiqə 5000 dövr/dəqiqə olan sentrifuqada fırladılır və alınan çöküntü həmin həcm həll edilmiş duzlu məhlulda suspenziya edilir.

Yaşamaq qabiliyyəti olan hüceyrələri müəyyən etmək üçün yarı rənglənmiş, yarımmaye aqarın üst səthində olan suspenziya, 15%-li ətli-peptonlu aqara (15 qr aqar tozu 1000 ml ətə-pepton bulyonunda) və prototrof revertant koloniyaları saymaq üçün 2%-li minimal zəif aqar olan (900 ml 2%-li sulu aqar, 300 ml duz məhlulu, 12 ml 1%-li MgSO<sub>4</sub> və 30 ml 20%-li qlükoza) Petri qablarına əkilir. Ətli-pepton aqar olan Petri piyaləsi 18 saat, zəif minimal aqar olan Petri piyaləsi isə 48 saat inkubasiya edilir.

Təcrübə və kontrol variantlarında yaşamaq qabiliyyəti olan bütün hüceyrələrin miqdardından revertant kimi müəyyən edilən mutasiyaların hesablanması aşağıda qeyd olunmuş *in vitro* metabolik aktivləşmə kəmiyyət metodu sxemi üzrə aparılır.

**5. *In vitro*-da metabolizmi aktivləşdirməklə gen mutasiyası hesablanması kəmiyyət metodu.** *In vivo* və *in vitro*-da metabolizmi aktivləşdirməklə kəmiyyət testlərində mutagen aktivliyin təyin edilməsi metodu Fonsteynlə müəlliflər tərəfindən verilmişdir.

Obyektlərdə *in vitro* metabolik aktivləşmə ilə təcrübələrin aparılması üçün homogen buferində qatılığı 1,2·10<sup>9</sup> hüceyrə/ml olan bakteriya suspenziyası hazırlamaq lazımdır: 0,5 Mm NADFQ məhlulu homogen buferində; 160 Mm MgCl<sub>2</sub> məhlulu homogen buferində; siçan və yaxud siçovulların qara ciyərindən homogen supernatnat.

**Homogen buferinin hazırlanması.** Tris-bufer: 01 M, pH

7,5 olan 0,4 M tris məhlulu hazırlanır (12,16 q tris, 250 ml distillə suyu). Bu məhlulun 50 ml-nə 80 ml 0,2%-li *HCl* məhlulu əlavə edilir, pH 7,5-ə çatdırılır və 400 ml su əlavə edilir.

0,5M saxaroza məhlulu: 42,8 q saxaroza 250 ml distillə suyunda.

Tris-bufer və saxaroza məhlulu su hamamında 100°C-də 30 dəqiqə sterilizasiya edilir və sonra soyuducuda saxlanılır. İstifadə etməzdən əvvəl lazımi həcmində 1:1 nisbətində qarışdırılır.

Homogenin alınması üçün ilkin əməliyyatlar yuxarıda verilmişdir. Ayrılmış qara ciyərin çəkisi müəyyən edilir. O, ehtiyatla soyuq saxaroza məhlulunda yuyulur, florlövhəli dəstəklə şüşə homogenezatora keçirilir və 3 qat həcmində homogen buferində homogenezasiya olunur. Homogen 0-4°C-də 15 dəqiqə 9000 dövr/dəqiqə olan sentrifuqada fırladılır. İşdə 2 saatdan artıq olmayıaraq soyuducuda saxlanılan supernatantdan istifadə edilir.

Təcrübənin aparılması üçün termostatda saxlanılan kyuvetin gözcüklərində olan penisillin şüşəsinə ardıcıl olaraq 0,7 ml bakteriya suspenziyası, 0,1 ml maqnezium xlorid məhlulu, 0,2 ml NADFN və 0,3 ml homogen buferi əlavə edilir. Qarışığın həmişə qarışdırılması üçün kyuvet fırıldıcının üstünə qoyulur. Qarışığa tədqiq olunan mad-dənin məhlulundan 0,2 ml əlavə edilir və onu daima qarışdırmaqla 37°C-də 30 dəqiqə inkubasiya edirlər. Tədqiq olunan birləşmənin məhlulu əlavə edilməklə gedən reaksiyanı, inkubasiya qarışığına 2 ml soyuq homogen buferi əlavə edilməklə dayandırılır.

Selektiv revertantı müəyyən etmək üçün 0,25 ml təmiz bakteriya suspenziyası, termostatlı su hamamında içərisində

0,6 faizli yarızenginlenmiş maye aqarı olan sınaq şüşesinə əlavə edilir. Təmiz kontrol variantında isə 0,25 ml həll edilməmiş bakteriya suspenziyası paralel olaraq üst minimal yarımmaye aqar olan sınaq şüşesinə keçirilir.

#### **4.12. Üst minimal yarımmaye aqarın tərkibi**

80 ml yarımmaye minimal aqar (7q aqar tozu; 6 q NaCl; 1000 ml-ə qədər distillə suyu) su hamamında əridilir, 10 ml 0,5 biotin və 10 ml distillə suyu əlavə edilir.

Sınaq şüşesində olanlar təbəqəli 1,5 faizli alt minimal aqar olan Petri piyalələrinə tökülür və 48 saat 37°C-də termostatda inkubasiya olunur.

Yaşamaq qabiliyyəti olan bakteriyaların miqdarının hesablanması petri qablarda iki layda alt 1,5 faizli ətli-pepton aqardan və üst yarımmaye 0,5 faizli ət pepton aqardan ibarət tam qidalı mühitdə aparılır. Sonuncu 3 ml sınaq şüşesində 100°C su hamamında əridilir və temperaturu 46°C olan termostatlı su hamamına qoyulur. Yuxarıda qeyd olunmuş üsulla hazırlanmış bakteriya suspenziyası yarımminimal maye mühitində dörd dəfə həll edilmiş və hər birindən 0,25 ml götürməklə içərisində 0,6 faizli ət pepton aqarı olan sınaq şüşesinə əlavə edilir.

Qarışiq 1,5 faizli alt lay ətli-pepton aqar olan Petri piyaləsinə tökülür, 30-40 dəqiqə otaq temperaturunda saxlanılır və sonra isə 18 saat müddətinə temperaturu 37°C olan termostata qoyulur.

Preparatın mutagen aktivliyini müəyyən edərkən, təcrübəyə başlamazdan əvvəl onun bakteriosidliyi haqqında məlumat almaq lazımdır, bunun üçün müəlliflər 0,1; 1,0; 10; 100 və 1000 mkq/ml qatılıqda inkubasiya mühitindən

istifadə edilməsini təklif edirlər.

Paralel olaraq indikator mikroorganizmlərin yaşama qabiliyyətlərini tam (homogen NADFN məhlulu) və qeyri-tam (homogen NADFN həllədicisi) tədqiq olunan preparatla mikrosom aktivləşmə qarışığında inkubasiya etdikdə müəyyən etmək olur. Təmiz kontrol kimi, tədqiq olunan preparat daxil edilmədən tam və qeyri-tam mikrosom aktivləşmə qarışığının inkubasiyasından istifadə edilir (qarışığa tədqiq olunan maddənin həllədicisi daxil edilir).

Həllədici kimi diometilsulfoksiddən istifadə edərkən qarışığa distillə suyunda 20 dəfə durulaşdırılmış reaktivdən 0,2 ml əlavə edilir. Pozitiv kontrol kimi təcrübənin modifikasiyasından istifadə etməklə metabolik aktivləşmə ilə mutagen aktivliyi məlum olan birləşmələrdən istifadə edilir. Fasiləsiz olaraq qarışdırılmış inkubasiya qarışığında bakteriyaların miqdarını hesablamaq üçün bakteriya suspenziyalarından müxtəlif qatılıqlar hazırlanır və içərisində ətli-pepton aqarı olan Petri piyalələrində əkilir (hər variantda 2 Petri piyaləsi). Kontrol və eləcə də preparatin qatılığı 0,1 və 1 mkq/ml olan variantlar həll edilmiş  $10^{-6}$  qatılığı 10 və 100 mkq/ml olan variantlar  $10^{-6}$  və  $10^{-5}$ , qatılığı 1000 mkq/ml olan variantlar isə  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  olan tam qidalı mühitə əkilir. Pozitiv kontrol variantında isə (TA 1535 ştammi üçün nitrozamorfolin) tam və qeyri-tam mikrosom aktivləşmə qarışığının inkubasiyadan sonra minimal mühitə (həll edilmədən) və  $10^{-6}$  tam qidalı mühitə əkilir.

İndikator mikroorganizmlərin yaşamasını müəyyən etmək üçün təmiz kontrol olan Petri piyalələrində koloniyaların miqdarı sayılır, cəm ikiyə vurulur və beləliklə bir ml-də olan canlı hüceyrələrin miqdarı müəyyən edilir. Alınan miqdarın həll olunma əmsalına vurulması ilə kontrol variantında, ilkin suspenziyada həyatilik qabiliyy-

yətinə malik olan hüceyrələrin miqdarı  $l_k$  tapılır. Beləliklə təcrübə variantında preparatın təsirindən sonra yaşamaq qabiliyyəti olan hüceyrələrin miqdarı  $d_0$  tapılır. Əgər  $l_k$ -ni 100 faiz hesab etsək,  $d_0/l_k$  nisbəti həmin qatılıqda olan preparatın təsirindən sonra sağ qalmış hüceyrələrin faizini xarakterizə edir.

Tədqiq olunan maddənin antibakterial aktivliyi məlum olduqdan sonra onun mutagen aktivliyi tədqiq edilir. Əgər tədqiq olunan qatılıqlarda (1-100 mkq/ml) bakteriyalar məhv olmurlarsa, onda preparatın mutagenliliyi inkubasiya qarışığının tam və qeyri-tam mikrosom aktivləşmə qarışığından istifadə etməklə üç qatılıqda 10:100 və 1000 mkq/ml yoxlanılır. Selektiv revertantların miqdarını 0,25 ml tam bakteriya suspenziyasını 0,6 faiz yarıräenglənmiş aqar olan iki Petri piyalələrində əkməklə müəyyən edirlər. Petri piyaləsində olan koloniyanın sayı hesablanır, alınan rəqəm ikiyə vurulur və beləliklə bir ml-də olan mutantın miqdarı tapılır. Təcrübə pozitiv kontrolla və eyni zamanda spontan mutasiya, müəyyən edilən variantda preparat olmayan tam və qeyri-tam mikrosom aktivləşmə qarışıqlı indikator kulturasından istifadə edilməklə aparılır. Son mərhələdə həll olunmamış inkubasiya qarışığının paralel olaraq iki ayrı ayri Petri piyalələrində 0,25 ml götürülmüş minimal və yarıräenglənmiş yarımmaye üst aqardan sınaq şüəsində əlavə edilir. Təcrübənin bütün variantlarında tam qidalı mühitə əkmə 10<sup>6</sup> həll olunmuşla aparılır.

İnduksiya olunmuş mutasiya tezliyinin hesablanması aşağıdakı formula üzrə (*Bridges, 1972; Skavronskaya, Smirnov, 1974, Fonsteyn müəlliflərlə, 1977*) aparılır:

$$M = \frac{\left[ a - (b - c) - \frac{cd}{l} \right] - 4}{d}.$$

Burada: M – sağ qalmış hycəyrlərdə induksiya olunmuş mutasiya tezliyi; a – təcrübə variantında yarızənginləşmiş mühitə 0,25 ml inkubasiya qarışığı əkilən vaxt mutantların sayı; b – kontrol variantında yarırənglənmiş mühitə 0,25 ml inkubasiya qarışığı əkilən vaxt mutantların sayı; c – kontrol variantında minimal mühitə 0,25 ml inkubasiya qarışığı əkilən vaxt mutantların sayı; d – təcrübə variantında 1 ml inkubasiya qarışığında yaşamaq qabiliyyətinə malik olan bakteriyaların miqdarı; l – kontrol variantında 1 ml inkubasiya qarışığında yaşamaq qabiliyyətinə malik olan bakteriyaların miqdarı.

Əgər statistik hesablamalara görə təcrübə və kontrol arasında fərq yoxdursa təcrübə dayandırılır, əks halda təcrübə davam etdirilir və tədqiq olunan preparatin mutagen aktivliyi, onun kinetikası (dozadan asılılığı və s.) öyrənilir.

Bunun üçün əlverişli təcrübələrin nəticələrindən asılı olaraq, preparat bir-birindən bərabər fərqlənən 5 qatılıqda mutagen effektliyi məlum olan test kultura üzərində yoxlanılır.

Əgər preparat bakteresidliyə malikdirse, uyğun olaraq o vaxt onun mutagenliyi öyrənilir. Fərq ondan ibarətdir ki, əvvəlcədən indikator mikroorqanizmlərə öldürücü təsir göstərən dozalar müəyyən edilir. Sonra iki test ştamda mikroorqanizmlərin 10, 50 və 90 faiz məhvini səbəb olan preparatin mutagen qatılığı tədqiq olunur. Əgər mutagenez yoxdursa, təcrübə dayandırılır. Əks tədqirdə, hansı ştamda preparatin effekti varsa götürülən dozalar həmin ştammada baş təcrübə nöqtəsində yoxlanılır.

Təcrübənin sxemi və onun nəticələrinin hesablanması ilə bağlı olan bütün işlər yuxarıda təsvir olunan qaydada aparılır.

## Fəsil 5

### METABOLİZMİ AKTİVLƏŞDİRƏKLƏ *in vivo*-DA GEN MUTASIYASININ HESABLANMASININ KƏMİYYƏT METODU

İnkubasiyadan əvvəl test preparat canlı orqanizmdə metabolik fermentlərin təsirinə məruz qalır. Bunun nəticəsində kimyəvi maddələrlə təsir edilmiş məməlilərin orqanizminə daxil edilmiş mikroorqanizmlərin test-kulturaları ilə yanaşı onların metabolitləri məməlilərə təsir edir. Bu halda maddə mutagen xassəyə malik olarsa, gen mutasiyası, mikroorqanizm selektiv mühitdə kultura olunduqda qeyd olunur.

Müəlliflər aralıq sahib kimi birinci nəslin 2-4 aylıq xətlərarası hibridlərin erkəklərindən istifadə etməyi təklif edirlər (hər variant təcrübəyə 4 heyvan). Preparatlar heyvanlara su və yaxud fizioloji məhlullarda verilir. Suda həll olmayan birləşmələr isə suspenziya halında 1 faizli kraxmalla verilir. Hər bir təcrübənin sxeminə həlledicilər kontrol kimi daxil edilir. Təcrübə üçün lazım olan maddələrin məhlulları bilavasitə təcrübədən əvvəl hazırlanır.

Test-ştam kimi cüt əsasların əvəzedilməsi yolu ilə prototrofluğa doğru revertir olan TA 1950 və triplet çərçivəsinnin yerdəyişmə tipinə uyğun revertir edən TA 1534 ştammından istifadə edilməsi təklif edilir. Bakteriya kulturası yuxarıda qeyd edilən üsullara uyğun hazırlanır.

Bakteriya suspenziyasını  $5 \cdot 10^8$  hycəyrə/ml ət-pepton bulyonunda 5000 dövr/dəqiqə olan sentrifuqada 15 dəqiqə fırladılır və təzə ət-pepton bulyonunda həmin qatılığa qədər suspensizləşdirilir. 1 ml bulyon kulturu test ştammından qarın nahiyyəsinə daxil edilir. Dərhal bundan sonra tədqiq

olunan preparatdan 0,2 ml əzələyə və yaxud dəri altına və yaxud 0,5 ml peroral yolla orqanizmə daxil edilir. 3 saatdan sonra heyvan öldürülür və distilə suyunda dörd dəfə zəifləşdirilmiş 2 ml minimal mühit məhlulu əzələyə daxil edilir. Qarın boşluğunundan maksimum həcmdə steril şəraitdə götürülmüş bakteriya suspenziyası sınaq şüşəsinə tökülür. Revertantın hesablanması üçün 0,25 ml bakteriya suspenziyası 46°C hamam termostatında içərisində 0,6% yarızənginləşmiş aqar olan sınaq şüşəsinə əlavə edilir. Sınaq şüşəsinin içərisində olanlar qarışdırıldıqdan sonra üst lay kimi Petri piyaləsinə 1,5 faizli minimal aqarlayın üstünə tökülür. Petri piyaləsi 37°C-də termostatda 48 saat müddətinə inkubasiya edilir.

İndikator mikroorqanizmin yaşama müddətini təyin etmək üçün, preparatın dozasının müəyyən edilməsi yalnız onun bakteristiliyinə görə deyil, eyni zamanda onun heyvanlara göstərdiyi toksiki təsirə görə də müəyyən edilməlidir. Müəlliflər preparatın bakterisid aktivliyinin tədqiqində aşağıdakı dozalardan istifadə edilməsini təklif edirlər: Zd 50, 1/10 Zd 50, 1/100, Zd 50 və 1-1000 Zd 50.

Heyvanın qarın boşluğunundan götürülmüş bakteriya suspenziyası müvafiq durulaşdırılmalardan sonra tam qidalı mühitə əkilir. Aşağı doza variantlarında və həmçinin kontrolda əkin  $10^{-6}$ , qalan variantlarda isə  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  və  $10^{-4}$  məhlullarından istifadə edilir. Hüceyrələrin həyatılık faizinin müəyyən edilməsi  $d/\alpha_k$  nisbətinə görə hesablanır.

Preparatın potensial mutagenliyinin aşkar edilməsi üçün təcrübələr təmiz və pozitiv kontrolla aparılır. Hər bir təcrübənin variantında selektivə tam qidalı mühitdə hesablama apardıqda iki Petri piyaləsindən istifadə edilir. Selektiv mühitdə revertantın hesablanmasında bakteriya

suspenziyası durulaşdırılmır, lakin tam qidalı mühitə əkildikdə isə müxtəlif durulaşdırılmış məhlullardan istifadə edilir. Təmiz kontrol variantında bakteriya suspenziyasının nümunələri durulaşdırılmadan, minimal və yarızənginləşmiş aqarla paralel olaraq sınaq şüşəsinə töküür. Təmiz kontrol variantında tam qidalı mühitdə əkmə apardıqda  $10^{-6}$  durulaşdırılmış məhlulundan istifadə edilir.

Əgər preparat bakterisid xassəyə malik deyilsə, bu mərhələdə  $Zd$  50 və sonrakı zəifləşmiş 2 dozadan istifadə edilir. Əks təqdirdə təxminən 10, 50 və 90 faiz öldürücü təsir göstərən dozalar götürülür.

Bəsliliklə, alınmış nəticələrin statistik hesablanması aparılır. Həmcinin əvvəlki hallarda olduğu kimi əgər həqiqi qiymət alınarsa, onda işlər bu mərhələdə dayandırılmır. Son halda hansı ştamda effekt alınıbsa, mutagen aktivliyinin mövcudluğunu təsdiq etmək, onun kinetikasını öyrənmək və mutagen aktivliyinin dərəcəsi haqqında məlumat almaq məqsədi ilə işlər davam etdirilir. Bu mərhələdə preparat beş qatılıqda tədqiq olunur. Bu halda da preparatın bakterii-sidliyi aşkar edilmirsə, onda əvvəlki işlərin nəticəsindən asılı olaraq preparatın qatılığı müəyyən edilir. Preparatın antibakterial aktivliyi olduqda, onun məhvədici dozası beş bərabər təcrübə nöqtəsinə ayrıılır.

## 5.1. Maya göbələyində gen mutasiyasının analizi

Gen mutasiyası səviyyəsində mutagenezi öyrənmək üçün obyekt kimi istifadə edilən ibtidai bir hüceyrəli eukariot orqanizmlərdən – maya göbələkləri (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosac pombe*) aşağıdakı üstünlük'lərə malikdir: maya göbələyi ilə təcrübənin sxemi sadədir, çoxalma

sürəti yüksəkdir, təcrübələr vaxta görə əlverişli olmaqla, həmçinin müxtəlif tipli mutagen amillərin təsiri ilə əmələ gələn dəyişilmələrin kəmiyyət xarakteristikasını müəyyən etməyə imkan verir.

Mutant maya göbələyi – saxaromisetin fiziki və kimyəvi mutagenlərə qarşı yüksək həssas olması onun münasib və əlverişli obyekt olmasını göstərir. Bu obyekt üzərində genotoksiki amillərin təsiri ilə baş verən bir sıra dəyişilmələri: reversiyani, düzüñə mutasiyanı, nöqtəvi mutasiyanı, mitotik və meyotik gendaxili və genarası rekombinasiyaları, xromosom çəkilmələrini, aneupolidiyani və s. öyrənmək olur. Maya göbələyindən (*Saccharomyces cerevisiae*) eyni zamanda eksperimental spontan, induksion və nəhayət mitoxondrial mutagenezdə geniş istifadə edilir.

Maya göbələyinin genomu başqa eukariotların genomuna nisbətən azdır: haploid hüceyrələrində  $1\cdot2\cdot10^{10}$ -a yaxın dalton DNT vardır ki, onun 80-90 faizi nüvə materialına daxildir, qalanları isə mitoxondri ilə əlaqədardır (Xeyis və b., 1981).

Maya göbələyinin – saxaromisetin genetikasına dair daha ətraflı məlumatlarla Saxarov və başqları (1976) tərəfindən yazılmış metodikalarda tanış olmaq olar. Burada isə biz auksotrof ştamm *Saccharomyces cerevisiae*-in marker əlamətlərindən istifadə etməklə spontan və induksiyon mutagenezin analizinin metodları ilə tanış olacaqıq. Mетодun əsasında başqa tədqiqatçılar tərəfindən işlənmiş, tamlanmış və təklif olunmuş təcrübənin sxemindən istifadə edilmişdir.

Spontan və induksiya olunmuş mutasiyanın qeydə alınması mutant maya göbələyindən alınmış marker əlamətlərinin köməkliyi ilə aparılır. Belə əlamətlərdən biri ştammın

auksotrofluğudur, daha doğrusu qidalı mühitdə müayyən metabolitin mövcudluğunun zəruriliyidir. Qidalı mühitdə metabolit olmadıqda isə hüceyrədə maddələr mübadiləsi dəyişir və beləliklə auksotrof mutant hüceyrələr koloni-yaların inkişafına maneçilik törədir. Auksotrof düzünə mutasiya və yaxud normal genin dəyişməsi nəticəsində baş verir.

Mutasiyalar morfoloji, (ölçü, forma, koloniyaların rənginə və s.) fizioloji (zəhərli maddələrə, antibiotiklərə, müxtəlif növ maddələrə qarşı davamlılığı və yaxud həssashlığı, biokimyəvi) selektiv mühitdə kultura olunan vaxt (böyümə qabiliyyəti) əlamətlərə görə aşkar edilir. Belə ki, maya göbələyi koloniyalarında *ade*<sub>1</sub> və yaxud *ade*<sub>2</sub> lokuslarındakı adenin asılılıq mutasiyası onu göstərir ki, həmin hüceyrələrdə 5-imina-imidazol-ribohidin adeninə çevrilməsində iştirak edən fermentlərdən biri qeyri normal olduğu üçün purpur pigmentlər toplanır və kalonyiaların rəngi qırmızı olur. Bu maya göbələyi ştammlarında koloniyaların saflığını asanlıqla təyin etmək olur. Kultura əkilən vaxt tələb olunan mikrobioloji təmizliyə riayət olunmayıbsa, adı gözlə koloniyanın sarı (tənəffüs çatışmamazlığı ilə mutantlar) və yaxud adenin sintezi gedən lokusların vəziyyətinə görə, auksotroflarda prototrofluğa görə (yabanı tip) ağ rəngdə olduğunu görmək olur. Auksotrofluqdan (əks mutasiya) reversiya nəticəsində əmələ gələn prototrof hüceyrələr, fermentlərin sintezinin qabiliyyətini bərpa etməklə onlar qidalı mühitdə əlavələr olunmadan böyüyürələr. Ona görə də auksotrofluqdan prototrofluğa olan mutantların seçiləməsi, auksotrof ştammların metabolitlər əlavə olunmayan mühitdə becərilməsinə və əmələ gələn koloniyaların hesablanmasına görə aparılır.

## **5.2. Spontan mutasiyaların başvermə tezliyinin analizi**

Hüceyrə suspenziyalarını mutagenlərlə işlədikdə, mutasiya səviyyəsini mutantların miqdarına görə müəyyən etmək olur.

Selektiv mühitdə bitən kulturalarda mutasiyaların aşkar edilməsi vaxtı bir sıra çətinliklər qarşıya çıxır. Bu çətinliklər onunla əlaqədardır ki, görəsən baş vermiş mutasiya adaptasiyadırı, həqiqi mutasiyadırı və yaxud da kultura selektiv mühitlə təmasda olarkən əmələ gəlmışdır. Bu şübhələri xüsusi metodların (*Zuria, Delbrück, 1943; Lederberg Rederberg, 1952*) köməkliyi ilə aradan qaldırmaq olar.

Spontan mutasiyanı maya göbələyi ştamlarında müəyyən metabolitlərə görə inkişaf edən yalnız auksotrofların selektiv mühitdəki mutasiyaların miqdarının hesablanmasına görə və yaxud ilkin mutant gendəki ikinci koloniyanın əmələ gəlməsinə görə müəyyən etmək olar.

Birinci halda spontan mutasiya prosesinin analiz metodu selektiv mühitdə hüceyrə populyasiyaları əkildikdə mutantların konsentrasiyasının hesablanmasına əsaslanır.

Spontan və induksiyon mutagenezdə selektiv mühitdə mutant hüceyrələrin seçilməsi, auksotrof mutantardan istifadə etməklə onların başqa metabolitlərə – amin turşularına, vitaminlərə və digər azot əsaslarına və s. tələbatını nəzərə almaqla aparılır. Lakin bu halda qidalı mühitə azlıq edən metabolit daxil edilməklə əsas məsələ hər bir maya göbələyi ştamminin fizioloji və morfoloji marker əlamətlərinin öyrənilməsidir.

Adeninasılıq ştamların hüceyrə suspenziyalarını hazırlamaq üçün adı qayda ilə rənglənmiş hüceyrə kolonialarının 5 günlük kulturasından götürülərək içərisində 1 ml su

olan sınaq şüşəsinə keçirilir. Mükəmməl pipetləşdirilməklə alınmış suspenziyanın qatılığı Qoryayev kamerasının köməkliyi ilə müəyyən edilir. Bunun üçün örtücü şüşə Qoryayev kamerasına qəfəsə uyğunlaşdırılır və suspenziyadan bir damla götürüb örtücü şüşənin altına qoyub mikroskopla beş böyük kvadrat qəfəsdə olan hüceyrələr sayılır. 1 ml suspenziyada olan hüceyrələrin miqdarı aşağıdakı formula görə hesablanır.

$$A \frac{n}{20} \cdot 10^6,$$

*n* – 5 kvadratdakı hüceyrələrin miqdarı

Suspenziya əkin üçün elə durulaşdırılmışdır ki, tam qidalı mühit üçün son qatılıq  $10^4$  hüceyrə/ml, minimal qidalı mühit üçün isə  $10^7$  hüceyrə/ml olsun. Alınmış hüceyrə suspenziyasından 0,5 ml götürüb tam və minimal qidalı mühiti olan Petri piyalələrində əkilir (hər birində 3 Petri piyaləsi).

### Qidalı mühitin tərkibi (q/l H<sub>2</sub>O-da)

Komponentlər	Tam	Minimal
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	2
MgSO <sub>4</sub>	1	1
NH <sub>4</sub> / <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	1
Qlükoza	2	2
Maya göbələyi avtolizatı	20	20
Tiamin	–	200 mkq/l
Biotin	–	2 mkq/l
Aqar-aqar	25	25

Termostatda 7-8 gün 30°C temperaturda inkubasiyadan sonra hesablayıcı vasitəsi ilə koloniyaların cəm miqdarı hesablanır:

1) Üç Petri piyaləsində tam qidalı mühitdə böyümüşlər;

2) Üç Petri piyaləsində minimal qidalı mühitdə ağ prototrof koloniyaların miqdarı.

Prototrof mutant hüceyrələrin konsentrasiyasının hesablanması qeyd olunan formul üzrə aparılır.

$$r = \frac{M}{N \cdot 1000},$$

burada,  $M$  – minimal qidalı mühitdə olan mutant koloniyalarının sayı,  $N$  – isə tam qidalı mühitdə olan koloniyalarının sayı.

Spontan mutasiyaların başvermə tezliyini ziyillərin əmələ gəlmə üsulu ilə analiz etdikdə, adenizinasilliq stamm hüceyrə suspenziyalarının hazırlanması və onun qatılığının təyin edilməsi yuxarıda təsvir olunan təcrübənin sxemində uyğun aparılır, lakin əkilən suspenziyanın son qatılığı  $2 \cdot 10^3$  hüceyrə/ml olmalıdır. Suspenziyadan 0,05 ml götürməklə qalın layla tökülmüş yarızənginləşmə qida mühiti olan beş Petri piyaləsinə əkilir. Yarızənginləşmiş qida mühitinin tərkibi yuxarıda qeyd olunan komponentlərdən təşkil olunur, lakin maya göbələyi avtolizatı isə 1 ml/l hesabı ilə götürülür.

25 gündən sonra termostatda Petri piyalələrində kultura edilən maya göbələyinin koloniyalarının və ziyillərin miqdarı hesablanır. İləgək və yaxud cərrah bıçağı ilə 10 tipik koloniya götürülür və sınaq şüşəsində 5 ml su ilə suspenziyalasdırılır və Qoryayev kamerası ilə suspenziyanın

konsentrasiyası hesablanır. Prototrofluğa görə mutasiya tezliyinin əmələ gəlməsi və yaxud bir hüceyrə bölünməsində mutasiyanın baş vermə ehtimallığının hesablanması aşağıdakı formulla müəyyən edilir:

$$L = \frac{m}{n},$$

burada m – koloniyada ziyllərin orta miqdarı, n – öyrənilən koloniyaların formalasmasında bölünmənin orta qiyməti, koloniyada bərabər olan hüceyrənin orta qiyməti.

### **5.3. Fiziki və kimyəvi amillərin mutagen və letal təsirinin kəmiyyətcə hesablanması**

İnduksiyon mutagenezin analizi zamanı aparılan təcrübələrdə onun tezliyini və orqanizmlərin yaşamasını müəyyən etmək məqsədi ilə əlavə olaraq bir neçə optimal dozalar yoxlanılır. Fiziki (şüalanma dozası) və kimyəvi (müəyyən qatılıqda mutagenlər və onlarla işləmə vaxtı) mutasiya induktorlarının tədqiqatı vaxtı orqanizmlərin yaşamasını 50,10 və 1% təmin edən ekspozisiyalardan istifadə edilir. Bu halda 100% olaraq intakt suspenziyadakı hüceyrələrin yaşaması qəbul olunur.

İnduksiyon mutasiyaların yaşama və tezliyinin təyin olunma təcrübələrində maya göbələyi *Saccharomyces cerevisiae*, prototorf ştamm 15V-P4-dən istifadə olunması təklif olunur. Təcrübənin məqsədindən asılı olaraq ilkin kultura kimi DNT reparasiyası pozulmuş, zəhərli maddələrə, antibiotiklərə və müxtəlif şüa növlərinə qarşı davamlı və yaxud həssas olan maya göbələyi ştammından istifadə etmək olar.

Fiziki amillərin (*L*, UB – rentgen və başqa şüa növləri) mutagen və metal təsirini müəyyən etmək üçün:

1. Üç günlük kultura ştammı 15V-P4-dən suda  $5 \cdot 10^6$  hüceyrə/ml qatılıqda 5 ml suspenziya, (ilkin suspenziya) və ondan isə  $10^4$  və  $10^5$  hüceyrə/ml durulaşdırılmış 3 ml suspenziya hazırlanır. Spontan adeninasılıq mutantın tezliyini müəyyən etmək üçün  $10^4$  hüceyrə/ml suspenziyadan 0,05 ml götürüb hər birində tam qidalı mühit olan 20 Petri piyaləsinə əkilir.

2. Şüalandırmaq üçün ilkin suspenziya Petri piyaləsində maqnit qarışdırıcısının üstünə qoyulur və hüceyrələrin 50% yaşamasını təmin edən ekspozisiyada şüalandırılır (cədvəl 3-ə bax).

Cədvəl 3-də induktor kimi tədqiq olunan UB şüalarla təcrübədə mutasiyaların yaşamasını və tezliyini qeydə almaq üçün ilkin suspenziyalardan təklif olunan məhlulların hazırlanması verilmişdir.

UB-şüalarla təsir edərkən qabın qapağını götürmək lazımdır, suspenziyanın əkilməsi (aşağıya bax) və şüalandırılmış hüceyrələrin fotoreaktivasiyasının qarşısını almaq üçün bütün işlər qırmızı işqda aparılmalıdır.

3. Birinci ekspozisiyanın müddəti qurtardıqdan sonra şüalandırılmış suspenziyadan damcıladıcıda 0,1 ml götürüb həmin dozanın birinci durulaşdırılmasını almaq üçün içərisində 2,4 ml su olan sınaq şüşəsinə töküür. İkinci durulaşdırma hazırlanır və həmin durulaşdırmadan içərisində tam qidalı mühit olan 5 Petri piyaləsində, birinci durulaşdırmadan isə içərisində tam qidalı mühit olan 20 Petri piyaləsində əkilir.

4. İçərisində ilkin suspenziya olan Petri piyaləsi maqnit qarışdırıcısının üstünə qoyulur, qapaq götürülür və ikinci

şüalandırma aparılır. Bu vaxtı ekspozisiyanın müddəti və dozanın miqdarı elə götürülür ki, hüceyrələrin yaşamasının 10 faizi təmin edilsin. Suspenziyadan 0,4 ml götürülür və müvafiq durulaşdırıcılar hazırlanır (cədvəl 5-ə bax). Hüceyrələrin yaşamasını müəyyən etmək üçün ikinci durulaşdırıcıdan içərisində tam qida mühiti olan 5 Petri piyaləsi və mutasiyani müəyyən etmək üçün birinci durulaşdırıcıdan 20 Petri piyaləsinə əkilir.

5. Yuxarıdakılara uyğun olaraq 3-cü şüalandırma aparılır və hüceyrələrin yaşamasının 1 faizini təşkil edən ekspozisiyadan istifadə edilir. Bu halda da suspenziya 2-ci cədvəldə göstərildiyi kimi 5 və 20 Petri piyaləsinə əkilir və uyğun olaraq hüceyrələrin yaşaması və mutasiya müəyyən edilir.

6. Fiziki amillərin mutagen və letal təsirinin öyrənilməsindən alınan nəticələrin statistik hesablanması üçün, təcrübəni bir-birindən asılı olmayaraq 5 təkrarlamada aparmaq lazımdır. Təkrarlamalarda əkin olan 5 Petri piyaləsindən kontrol və hər bir şüalanma dozası üçün 3 Petri piyaləsi götürülür. Üç Petri piyaləsində bitmiş koloniyaların miqdarı hesablanır.

7. Əkin üçün ilkin durulaşdırmanın nəzərə almaqla və kontrol əkinlərində hüceyrələrin yaşamasını 100 faiz qəbul etməklə, hər təkrarlanma üçün ayrı-ayrı dozalarda hüceyrələrin yaşama faizinin hesablanması aşağıdakı formulla aparılır:

$$S = \frac{P \cdot 100}{K \cdot N} .$$

Burada N – kontrol variantında 3 Petri piyaləsində bitən koloniyaların sayı, P – şüalandırma variantında 3 Petri

piyaləsində bitən koloniyaların sayı, K – durulaşdırıcının kontrola nisbətən əmsalıdır.

8. Mutasiya səviyyəsi, mutasiya tezliyinin əkilmiş hüceyrələrin miqdarına olan nisbətinə və yaxud da mutasiya tezliyinin yaşamağa qabil olan hüceyrələrin miqdarına olan nisbətinə görə təyin edilir. Əgər kontrolda hüceyrələrin yaşamasını 100 faiz qəbul etsək, onda induksiya olunmuş mutasiya dərəcəsini müəyyən etmək üçün hər bir şüalanma dozasında və kontrolda əkilmiş bütün 20 Petri piyaləsində koloniyaları saymaqla hər bir şüalanma dozası üçün mutasiya tezliyi qeyd olunan formul üzrə hesablanır.

$$C = \frac{M}{N},$$

burada M – mutant koloniyaların miqdari, N – Petri piyaləsindəki koloniyaların sayı.

Kimyəvi maddələrin mutagen və letal təsirinin qeydə alınması üçün:

1. Üçgündük haploid ştammı kulturası Petri piyaləsindən 8 ml asetat buferi (pH 4,4) ilə yuyularaq sentrifuqa sınaq şüşəsinə keçirilir və qatlaşdırma üsulu ilə 3,4 ml suspenziya hazırlanır ki, bunun da qatılığı  $10^7$  hüceyrə/ml olur (ilkin suspenziya).

Asetat buferin tərkibi pH 4,4

A 0,2 MCH <sub>3</sub> COOH (12,01 q/l və yaxud 11,4 ml/l)	126 ml
B 0,2 MCH <sub>3</sub> COONa (27,2 q/l) – natrium asetat	+200 ml
	74 ml

2. Kontrol olaraq Petri piyalələrində əkmək üçün ilkin suspenziyadan götürülür və fosfat buferindən pH 7,0 istifadə etməklə 2-ci cədvəldə göstərildiyi kimi kontrol üçün müvafiq durulaşdırıcı hazırlanır və hüceyrələrin yaşamasını müəyyən etmək üçün II durulaşdırıcıdan içərisində tam qida mühiti olan 5 Petri piyaləsinə, mutasiyanı hesablamaq üçün isə I durulaşdırıcıdan 20 Petri piyaləsinə əkilir.

Fosfat buferin tərkibi pH 7,0

A 1/15M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (9,78 q/l) 40 ml + 100 ml  
B 1/15M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (11,88 q/l) 60 ml

3. Tədqiq edilən kimyəvi maddələrlə işləmək üçün qalan suspenziyaya hüceyrələrin yaşamasını 50,10 və 1 faizini təmin edən əvvəlcədən qatılığı və vaxt parametri məlum olan məhluldan 0,1 ml əlavə edilir. Maddənin mutagen təsirini aradan qaldırmaq üçün məhlulun pH-nı 7-yə çatdırmaq və suspenziyanı fosfat buferi ilə 10 dəfə durulaşdırmaq lazımdır. Birinci ekspozisiyanın vaxtı qurtardıqdan sonra pipetka ilə suspenziyadan 0,1 ml götürülür və içərisində 0,9 fosfat buferi olan sınaq şüşəsinə tökülr. Bu prosedura ikinci və üçüncü ekspoziyadan sonra təkrar edilir. Letal effekt nəzərə alınmadan hər götürülmüş nümunədə hüceyrə qatılığı  $10^6$  hüceyrə/ml-ə bərabər olacaq.

4. Petri piyalələrində tam qidalı mühitdə əkmək üçün suspenziyanın durulaşdırılması 2-ci cədvəldə təklif olunan qaydaya uyğun aparılır.

5. İnkubasiyadan 6-7 gün sonra həyatilik qabiliyyəti olan hüceyrələr sayılır və mutantların baş vermə tezliyinin təyini, fiziki amillərin mutagen və letal təsirinin öyrənilməsində tətbiq edilən formuldan istifadə edilir.

#### **5.4. Arabidopsisdə gen mutasiyasının analizi**

Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana* L) xaćçıçəklilər fəsiləsindən olub, ölçüsünə görə çox böyük olmayan bitkidir. Bu bitki ətraf mühit amillərinin genetik toksikiliyini qısa müddətdə tədqiq etmək üçün əlverişli obyektdir. Bu bitkinin həyat tsikli qısa 5-6 həftə olan çoxlu miqdarda efemer irqləri vardır: Enkxaym, Dijan Estland, Limburq, Kolumbiya və başqaları.

Arabidopsis, xromosom miqdarı ( $2n=10$ ) çox olmayan autoqam diploid ali bitkidir. Burada cəmi beş ilişikli qrup vardır ki, bu da genetik analizləri xeyli asanlaşdırır. Lakin xromosomların ölçüsü çox kiçik (1,4-1,4 mkm) olduğu üçün xromosom dəyişilmələri ilə əlaqədar olan mutasiyaların analizi çox çətindir (Steinitz – Sears, 1966). Eyni zamanda bu bitki geniş diapazonda düzünə genetik amillərə çox həssas olmaqla, onun metabolik mexanizmi promutageni mutagenə qədər aktivləşdirir, bu da gen mutasiyası səviyyəsində qeyd edilir.

Ətraf mühit amillərinin genetoksikiliyini öyrənmək üçün geniş istifadə edilən bitki obyektlərindən fərqli olaraq arabidopsis Q.Redinin (*Redee*, 1982) işlərində göstərildiyi kimi bir sıra üstünlüklərə malikdir: qısa müddətdə çox miqdarda lokuslarda istiqamətləndirilmiş mutasiyaların qeydə alınması; qısamüddətli testlərdən fərqli olaraq eukariot orqanizmlərdə klassik testlərin köməkliyi ilə nəsillərdə müşahidə edilən resessiv mutasiyaların genetik mənşəyini bilavasitə müəyyən etmək mümkündür. Bitkinin böyük ölçüyə malik olmaması, həyat tsiklinin qısa olması və praktiki olaraq embrional diapauzanın olmaması, onun bir çox fərdinin üzərində bütün il ərzində təcrübə aparılmasına imkan verir.

Tədqiq edilən maddənin arabidopsisdə mutagen, heyvanlarda isə kanserogen effektliyi arasında müəyyən edilmiş yüksək korrelyasiya (*Muller*, 1982) arabidopsisin genetik təcrübələrin aparılması üçün əlverişli obyekt olduğunu göstərir.

Arabidopsis ali bitkilər içərisində yeganə bitkidir ki, onu bütün həyatı dövründə aseptik kulturada yetişdirmək olur. Bu bitkinin üstünlüyü bir də ondan ibarətdir ki, onun üzərində onlarla qın formalaşır ki, onlarda da 30-60 toxum olur. Başqa bitkilərdə olduğu kimi, arabidopsisdə də xlorofil və yaxud piqment mutasiyası – *Albina* (ağ), *Xantha* (sarı), *Clorina* (sarı-yaşıl) və s. vardır.

Mutasiyanı çiçək açıldıqdan 10-14 gün sonra ana bitkinin yetişməmiş qınından hazırlanmış preparatda binokulyarla analiz etmək olur. Bu embrion-test adlanan metod ilk dəfə Müller tərəfindən 1963-cü ildə (*Müller*, 1963) irəli sürülmüş və çoxlu miqdarda lokuslarda düzənə mutasiyaları aşkar etmək üçün istifadə olunması təklif edilmişdir.

Müller tərəfindən təklif edilən embryo-test metodunun üstünlüyü ondan ibarətdir ki, mutagenlə işlənmiş toxumadan əmələ gələn  $M_1$  – bitkilərində  $M_2$  meyvələrinin dissekasiyasından sonra yetişməmiş embrionda resessiv mutasiyanı almaq olur. Bunun sayəsində bitkinin generativ toxumalarında mutasiya olduğunu müəyyən etmək olur ki, bu da somatik hüceyrələr hələ sağ ikən onlarda mutasiya olduğunu müəyyən etməyə imkan verir. Bitkinin analizi aşağıdakı qayda üzrə aparılır: binokulyar mikroskop altında qın üst tərəfdən kəsilir və embrionu normal və yaxud normadan az olan meyvə kəsiklərində piqment mutasiyaları qeydə alınır. Meyvəsində dörd embriondan az olmayan, ardıcıl yerləşmiş beş qının uc hissəsi analiz edilir.

Xlorofil mutasiyasını ləpəyarpağı mərhələsində də qeyd etmək olar. Bunun üçün *M*<sub>1</sub> bitkisindən yiğilmiş toxumlar etil spirti və hidrogen peroksid (1:1) qarışığında sterilizasiya edilir. Petri piyalələrində qablarda aseptik şəraitdə aqarlı mühitə əkilir, 24-25°C-də yuxarıdan işıqlandırılmaqla cürcədirilir və müxtəlif inkişaf mərhələsində mutantlar vizual müşahidə yolu ilə təsnifləşdirilir.

**Aseptik kultura.** Arabidopsisin aseptik cürcədilmə metodu Laybax (*Laibach*, 1943) tərəfindən hazırlanmış və sonralar bu metod Lenqric (*Longridge*, 1957) tərəfindən təkmirləşdirilmişdir. Bitki adı sinaq şüşələrində lüminissens lampası LB 40 (işıqlanma 10 minə yaxın lyuks) olan xüsusi qurğuda fasıləsiz olaraq təbii işıqlanmada cürcədirilir. Bitkinin cürcədilməsi üçün Velemin və Hixner qidalı mühitindən (*Veleminsky, Gichner*, 1964) istifadə edilir.

Əsas məhlullar qramla (distillə suyunda hazırlanan hər litr məhlulu görə): A) KNO<sub>3</sub>-20; B) MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O-3; C) Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4 H<sub>2</sub>O-10; Ç) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-3; D) FeSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O-1,41; E) EDT A (xörək düzü)-10; Θ) Mikroelement məhlulu – K<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>-1,5; MgSO<sup>4</sup> 7H<sub>2</sub>O-0,91; ZnSO<sub>4</sub>-0,31 CuSO<sub>4</sub>5H<sub>2</sub>O-0,05; (NH<sub>4</sub>)S MC 7 0 24-0,5. D məhlulu bilavasitə istifadə olunan vaxt hazırlanmalıdır, qalan məhlullar isə soyuducuda bir neçə ay saxlanılır. Tam qarışıçı hazırlamaq üçün məhlulları aşağıdakı nisbətdə və ardıcılıqla qarışdırmaq lazımdır; A, B, V, Q. D-nin hər birindən 50 ml/5ml E+1 ml J) alınmış məhlula 8 q əzilmiş aqar əlavə edilir, distilə suyu əlavə edilməklə qarışq 1 l-ə çatdırılır, aqar həll olunana qədər avtoklavda (1,5-2,5 atmosferdə 15-30 dəqiqə) qızdırılır və aseptik qaydalara riayət etməklə isti halda steril qablara töküür. Toxum spirt və hidrogen peroksid qarışığında sterilizə edilir. Əkini spirt lampası alovunda

mikrobioloji ilgæk ilə, hər dəfə közərmış ilgəyi steril qidalı mühitdə soyutmaqla aparmaq lazımdır. Sonra sınaq şüşələri xüsusi hazırlanmış bloka yerləşdirilir və bütün təcrübə müddətində işıqlandırıcı qurğuda qalır. Bitki cürcərdilən otağın nəmliyi və temperaturu sabit olmalıdır.

**Torpaq kulturası.** Bir neçə yan və rozet zoqlarla zəngin olan qüvvətli bitki almaq üçün torpaq kulturasından istifadə edilir. *Arabidopsis* 13x18 sm və yaxud 18x24 sm ölçündə olan küvetlərdə optimal temperaturda işıq qurğusunda cürcərdilir. *Arabidopsis* üçün yüngül və qidalı torpaq lazımdır. Əksər hallarda kompost və qum qarışığından istifadə edilir. Torpağı alaq otlarından və zərərvericilərdən mühafizə etmək üçün sterilizə edirlər. Torpaq hər gün durulaşdırılmış su ilə nəmləşdirilir, bəzi hallarda *KMnO<sub>4</sub>*-un zəif məhlulundan istifadə edilir.

Toxumu əl ilə tək-tək və yaxud qidalı mühitdə əvvəlcədən cürcərdilmiş cürcətilərini əkirələr. Bitkinin torpaq mühitində yaşama dövrü 40-45 gündür. Torpaq kulturasının çatışmazlığı ondan ibarətdir ki, burada bir cür bitki almaq çətindir. Bu metod ən çox toxum materialı almaq üçün istifadə edilir, başqa təcrübələrin aparılması üçün aseptik kultura daha məqsədə uyğundur.

**Yarpaq toxuma kulturası.** Yarpaq toxuma kulturası üçün Qamburq (*Gamborg*, 1968) qidalı mühitinə 80 mq/ml mezoinozit, 400 mq/l kazein hidrolizat, 3 faizli saxaroza və vitaminlər əlavə edilməklə istifadə olunur. Auksin kimi IUK (1 mq/l) və kinetik (1 mq/l) istifadə olunur. İşlər aşağıdakı qayda üzrə aparılır:

1. Yarpaq distillə suyunda yuyulur;
2. Yarpaq 70°-li spirtdə 10 saniyə yuyulur;
3. 3-5 dəqiqə (yarpağın ölçüsündən asılı olaraq) diasid

məhlulunda sterilizə edilir;

4. Distillə suyunda 3 dəfə (hər biri bir dəqiqə olmaqla) yuyulur;

5. Yarpağın uc həssas hissəsi kəsilməklə, alt tərəfdən damarı çıxardılır və iri yarpaqlar iki hissəyə kəsilir;

6. Yarpaq sınaq şüşəsinə qidalı mühitə qoyulur;

7. Sınaq şüşəsi 24-25°C olan termostata qoyulur və yarpağın üzərində kallus əmələ gələnə qədər saxlanılır.

2-4 həftədən sonra onlar işığa qoyulur və gövdə tumurcuqları formalaşmağa başlayır. Tumurcuqlar saxarozanın miqdarı az olmaqla (2 faiz) Qamburq V5 qida mühitinə bir-bir əkilir və mezoinozid, kazsin hidrolizat və auksin əlavə edilir. Gövdə tumurcuğundan bitki inkişaf etməyə başlayır. Qın Müllerin embrion-testindən istifadə olunmaqla analiz edilir.

Təcrübələrdə ətraf mühit amillərinin mutagenliyi öyrənilərkən test obyekt kimi istifadə edilən arabidopsisla işləyən vaxt aşağıda qeyd olunan işin texniki təfsilatını nəzərə almaq lazımdır (*Redei*, 1982).

1. Tədqiq edilən maddə ilə quru toxumları və eyni zamanda cürcərən toxumları işləmək olar. Kiçik bitkiləri istənilən inkişaf fazasında şüalandırmaq olar. Kimyəvi mutagen maddələri arabidopsis becərilən qidalı mühitə əlavə etmək olar, bir şərtlə ki, bu maddə avtoklavda parçalanmasın.

2. Tədqiq edilən mutagen maddələrin yüksək və aşağı dozasından istifadə etməklə çox vaxt istənilən nəticələr alınmır, ona görə də çoxlu yoxlamalarla optimal dozani tapmaq lazımdır.

3. Toxumun basdırılması, cürcəmiş toxumun basdırılmasına nisbətən sadədir, çünkü cürcəmiş toxum

basdırılar kən onun çox hissəsi mexaniki zədələnə bilər.

4. Fiziki amillərin mutagenliyini tədqiq etdikdə təcrübənin sxemində, gen mutasiyasının spontan fonunu müəyyən edən variant daxil edilməlidir. Kimyəvi mutagen maddələrlə işləyən vaxt isə həllədicilərə görə kontrol qoymaq lazımdır.

5. Arabidopsisdə spontan mutasiyanın sürəti hələlik tam müəyyən olmayıb. Mutasiya tezliyi istifadə edilən metodlardan da asılıdır və onların qeydə alınması vaxtı çox ehtiyatlı olmaq lazımdır ki, fiziki zədələnmələrdən əmələ gələn dəyişilmələr mutasiya kimi qeyd edilməsin. Müşahidələrə görə spontan mutasiyanın tezliyi genom əsasında 1 faizdən aşağıdır.

6. Nəticələrin dəqiqliyi üçün təcrübənin aparıldığı şərait (nəmlik, vaxt, temperatur, işıqlanma və s.) sabit olmalıdır.

7. Kontrol və təcrübə variantlarından alınan nəticələrin müqayisəsi üçün qida mühitinin tərkibi və həllədicilərin pH-ları bütün hallarda eyni olmalıdır.

## Fəsil 6

# ƏLAVƏLƏR

Dərs vəsaitində tez-tez müxtəlif fiksatorlardan və rəng-ləyicilərdən istifadə olunması göstərilir. Bunları nəzərə alaraq 1-ci və 2-ci əlavələrdə bunlar haqqında məlumat verilir.

### Əlavə 1. NÜVƏ FİKSATORLARI

**Karnua fiksatoru** (6:3:1) – 6 hissə 100 faizli və yaxud 96 faizli etil spirti 3 hissə xloroform; 1 hissə buzlu sirkə turşusu. Bu universal spirt qarışqlı fiksatordur ki, daimi mikrotom və əzilmiş preparatların hazırlanmasında istifadə olunur. Fiksator obyektə tez daxil olur və hüceyrənin strukturunu yaxşı saxlayır; lakin Navaşın fiksatoruna nisbətən zəif təsir edir.

Materiallar fikstorda 2 saatdan 12 saata qədər saxlanıla bilər. Fiksatordan sonra materialların suda yuyulması tələb olunmur.

**Modilevski fiksatoru** (9:2:2:2) – 9 hissə 1 faizli xrom turşusu; 2 hissə 16 faizli formalin (40 faizli satışdan); 2 hissə 5 faizli sirkə turşusu.

Zəif təsir edən sulu fikstaorlar.

Fiksasiyanın müddəti 24 saat, axar suda yuyulma müddəti isə 2-4 saatdır.

**Navaşın fiksatoru** (10:4:1) – 10 hissə 1 faizli xrom turşusu; 4 hissə 16 faizli formalin (40 faizli satışdan); 1 hissə buzlu sirkə turşusu.

Sulu fiksator xüsusən bitki toxumalarının fiksasiyası üçün tez-tez istifadə olunur, zəif təsir edir və xromosom

strukturunu yaxşı saxlayır. Qarışığın təşkil edən komponentləri bilavasitə fiksasiyadan əvvəl qarışdırmaq lazımdır, çünki fiksator hazır halda qaldıqda tez xarab olur.

Fiksasiyanın müddəti 12-24 saatdır, axar suda yuyulma müddəti isə 2 saatdan 24 saatə qədərdir.

**Sanfeliç fiksatoru** – 100 ml 2 faizli xrom turşusu, 60 ml 20 faizli sirkə turşusu, 100 ml 40 faizli formaldehidi, 50 ml distillə suyu.

İki məhlul hazırlanır:

*A məhlulu*: 2 faizli – 100 ml xrom turşusu, 20 faizli – 60 ml sirkə turşusu.

*B məhlulu*: 100 ml – 40 faizli formaldehid, 60 ml distillə suyu.

Məhlullar bilavasitə istifadə olunmazdan əvvəl 1:1 nisbətində qarışdırılır.

Sulu fiksator çox hallarda Heydenheynə görə dəmir hematoksilinlə rənglənən heyvan toxuma və hüceyrələrinin fiksasiyası üçün istifadə edilir.

«Sirkə alkoqolu» və yaxud **Klark fiksatoru** (3:1) 3 hissə 100 faizli və yaxud 96 faizli etil spirti: 1 hissə buzlu sirkə turşusu.

Karnua fiksatorunun modifikasiyası olub, universal spirt fiksatorudur.

Əsasən əzilmiş müvəqqəti preparatların hazırlanmasında istifadə edilir.

**Brodks fiksatoru FSU** (Formalin – spirt sirkə turşusu) (3:1:0,5) – 3 hissə durulaşdırılmış neytral formalin; 1 hissə 96 faizli etil spirti, 0,5 hissə sirkə turşusu. Təklif olunan spirt fiksatoru daimi preparat hazırlamada istifadə olunur.

Fiksasiyadan sonra 1,5-5 saat müddətində su ilə (12 saat) təmiz yumaq və tez spirtdən keçirib parafinə qoymaq

lazımdır.

### **Çemberlen fiksatoru – 90:5:5**

90 hissə 50-70 faizli etil spirti;

50 hissə 40 faizli formalin (satışda olan);

5 hissə buzlu sirkə turşusu.

Universal fiksator olub, iri obyektlərə tez daxil olur və öz təsirinə görə Navaşın və Karnua fiksatorları arasında aralıq forma təşkil edir.

Fiksasiya müddəti 12-16 saatdır. Materialı bu fiksator-da uzun müddət saxlamaq olar.

### **Yakovlev fiksatoru – 8:4:1;**

8 hissə 100 faizli etil spirti;

4 hissə xloroform: 1 hissə buzlu sirkə turşusu.

Karnua fiksatorunun modifikasiyasıdır. Karnua fiksatorundan fərqli olaraq materialı burada uzun müddət saxlamaq olar.

## **Əlavə 2. NÜVƏ RƏNGLƏYİCİLƏRİ**

### **Azur II – eozin**

Azur-eozinlə rəngləmə çoxrənglik metoduna daxildir və adətən məməlilərin toxuma kulturalarından hüceyrə xromosomlarını rəngləmək üçün istifadə olunur. Ayrı-ayrı qablarda rəngləyicinin ilkin məhlulları hazırlanır. 1) 100 mq quru azur – II 100 ml distillə suyunda və 2) 100 mq quru eozin 100 ml suda həll edilir.

Bu məhlullar qaldıqca onların rəngləmə keyfiyyəti çox yüksək olur, ona görə də əvvəlcədən hazırlanmış rəngləyici təzə hazırlanmış rəngləyiciyə nisbətən yaxşı rəngləyir.

Rəngləmədən bilavasitə qabaq işçi məhlul hazırlanır, bunun üçün: 2 hissə eozin məhlulu: 3 hissə ilkin azur

məhlulu və 5 hissə distillə suyu götürüb qarışdırılır. Ob-ek-  
tin yaxşı rənglənməsi üçün hazır rəngləyiciyə 0,5-1 ml/100ml  
rəngləyiciyə 0,1 faizli  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  məhlulu əlavə edilir ki, bu da  
rəngləyicinin reaksiyasını neytral vəziyyətə yaxınlaşdırır.  
Əşya şüşəsi içərisində rəng olan stəkana qoyulur və  
rəngləyicinin keyfiyyətindən asılı olaraq 5-20 dəqiqə sax-  
lanılır. Rəngləyicinin keyfiyyəti mikroskopla yoxlanılır.  
Preparat distillə suyunda yuyulur və havada qurudulur.

## **ASETOKARMİN**

Asetokarmindən adətən bitki toxumunun cücedilmiş  
köklərinin meristem hüceyrələrini rəngləmək üçün istifadə  
edilir.

Rəngləyicini hazırlamaq üçün 1 q (bəzi hallarda 2 q və  
çox) narın karmin su hamamında əks tərəfli soyuducudan  
istifadə etməklə 45 ml buzlu sirkə turşusunda və 55 ml  
distillə suyunda həll edilir. Qarışq su hamamında qaynama  
dərəcəsinə çatdırılır və 1 saat qaynadılır. Bir saatdan sonra  
məhlul möhkəm qarışdırılır, soyudulur, süzülür və açıq rəng  
olmayan ağızı kip bağlı qablarda  $4^{\circ}\text{C}$ -də saxlanılır. Məh-  
lulun şəffaf qaramtil-qırmızı rəngi olmalıdır. Rəngləyicidən  
istifadə edərkən o yenə sinaq və yaxud penisillin şüşələrinə  
süzülür, həmin qablara cücertinin kökcükleri qoyulur və su  
hamamında qızdırmaqla qaynadılır (qaynama müddəti  
bitkinin növündən asılı olaraq təcrubi yolla müəyyən edilir).  
Qaynama müddəti qurtardıqdan sonra material 45 faizli  
sirkə turşusu ilə yuyulur. Kökcüyün qara rəngə çalan uc  
hissəsindən müvəqqəti və daimi preparatlar hazırlanır.  
Asetokarminin saxlanma rejiminə düzgün riayət edildikdə,  
ondan rəngləyici kimi təkrarən bir neçə dəfə istifadə etmək  
olar.

## **ASETOLAKMOİD (Mavi rezorsin)**

Asetolakmoid rəngləyicisindən sirkə alkoqolu (3:1) ilə fiksə olunmuş bitki toxumalarından əzilmiş preparat hazırlayan zaman istifadə edilir.

2 q lakkoid 100 ml 45 faizli sirkə turşusunda həll edilir və əks soyuducusu olan kolbada 1,5-2 saat müddətində zəif qaynadılır, sonra 45 faizli sirkə turşusundan əlavə etməklə ilkin həcmə çatdırılır, soyudulur və süzülür.

Material saat şüşəsi üzərinə bir neçə dəmlə tökülmüş rəngləyicinin içərisinə qoyulur, qaynama dərəcəsinə çatdırılmadan spirt lampası üzərində qızdırılır. Material 5-10 dəqiqə rəngləyicidə qalır, sonra material 45 faizli sirkə turşusuna və yaxud da xloralhidrata keçirilir və əzilmiş preparat hazırlanır.

## **ASETOORSEİN LƏ RƏNGLƏMƏ**

Asetoorseindən adətən hər şeydən əvvəl məməlilərin toxuma kulturalarında qısa müddətli təcrübələrdə hüceyrələri rəngləmək üçün istifadə edilir.

Rəngləyicini hazırlamaq üçün 1 q arsein 45 ml isti sirkə turşusunda həll edilir və soyudulduqdan sonra 55 ml distillə suyu əlavə edilir. Möhkəm qarışdırılır, soyudulur, süzülür və ağızı kip bağlı qablarda 4°C-də saxlanılır.

Istifadə etməzdən əvvəl rəngləyici penisillin şüşəsinə süzülür, material rəngləyicinin içərisinə qoyulur və 0,5-2,0 saatdan sonra rənglənir. Qatı xloralhidrat məhlulunda və yaxud 45 faizli sirkə turşusunda material əzilməklə, əzilmiş preparat hazırlanır.

## HEYDENHAYN HEMATOKSİLİNİ

Hemotoksilin özü-özlüyündə rəngləyici deyil, o oksidləşdikdə hemateinə çevrilir. Hemotein isə xüsusi maddələrlə mis, dəmir duzu və s. ilə birləşib duz tipli birləşmələr əmələ gətirdikdən sonra hüceyrələri rəngləyə bilir.

Sitoloji texnikada hemotoksilin hazırlamaq üçün bir neçə üsullardan istifadə edilir: heydenhayn dəmir hematoksilin, Veyhert, Yasvoine, Erlix hematoksilin zəyi, Delafild, Karaççi, Meyer, Bemer və s.

Hematoksilinlə rəngləmə iki üsulla aparıla bilər – proqressiv və regressiv. Birinci halda hemotoksilin yuxarıda qeyd edilən xüsusi maddələrlə qarışdırılır və rəng lazımı intensivliyə çatdırılır. Belə rənglərə Karaççi, Bemer, Erlix, Delafild hematoksilin zəyi və s. daxildir. İkinci halda isə əlavə olaraq zəylə işlənir və yuyulduqdan sonra hematoksilinlə rənglənir. Belə rəngləyicilərdən biri heydenhayn dəmir hematoksilindir.

Dəmir hematoksilinlə bitki və heyvan xromosomları, bitki materialları Navaşın (6:3:1), heyvan toxumaları isə Sanfeliç fiksatoru ilə fiksə olunduqdan sonra yaxşı rənglənir.

Rəngləyici iki üsulla hazırlanır.

*Birinci halda* – sürətli üsul – 1 q hematoksilin 100 ml distillə suyunda, su hamamında 30-60 dəqiqə qızdırılmaqla həll edilir, soyudulur, sonra 3-4 dəfə süzülür və hematoksilinin oksidləşməsi üçün antiseptik (timol kristalı) əlavə olunur. Rəngləyicinin rəngi açıq-qırmızı və yaxud qırmızı-qonur olmalıdır. Rəngləyicidən istifadə edərkən, götürülen rəngləyici həcmində distillə suyu götürülür.

*İkinci halda* (uzun müddətli vaxt) 1 q hematoksilin –

bəzi hallarda 4 q-a qədər 96 faizli 10 ml etil spirtində həll edilir. Tam həll olunduqdan sonra məhlula 90 ml distillə suyu əlavə edilir, 3-4 həftə müddətinə işqda saxlanılmaqla məhlul yetişir. Sonra o süzülür və ağızı kip qablara tökülür. Belə rəng 2-3 ay öz keyfiyyətini saxlaya bilir. İstifadə edilən vaxt rəngləyici distillə suyunda iki dəfə durulaşdırılır.

Dəmir hemotoksilinlə rəngləmə aşağıdakı ardıcıl mərhələlərdən ibarətdir:

1. Kəsiklər parafindən təmizləndikdən sonra, spirtə qoyulur və sonra distillə suyunda yuyulur (mikrotom preparatların hazırlanması qaydasına bax) 2,5-4 faizli dəmir zəyi məhlulu ilə 12-24 və yaxud uyğun olaraq 4-6 saat işlənir.

2. Rəngin zəylə çırklənməsinin qarşısını almaq üçün kəsiklər 5-10 dəqiqə 2-3 dəfə distillə suyunda yuyulur.

3. Hemotoksilin məhlulu ilə rəngləmə 10-16 saat davam edir. Rəngləmə prosesini sürətləndirmək üçün preparat 40-60°C temperaturda termostata qoyulur, 40-60 dəqiqə saxlanır.

4. Preparat ardıcıl olaraq əvvəlcə axar suda, sonra isə distillə suyunda yuyulur.

5. Preparatlar 1,25-2,0 faizli dəmir zəyində saxlanılır, mikroskopla sitoplazmadan rəngin itməsi və nüvə strukturunun intensiv rənglənməsi yoxlanılır.

6. Preparat axar suda yuyulur və xromosom göy rəngə malik olur.

7. Sonralar preparat kanada balzamina keçirilənə qədər bütün ardıcıl mərhələlərə riayət etməklə daimi preparat hazırlanır.

8. Hüceyrə strukturunun kontrast olması üçün, preparat hemotoksilinlə rəngləndikdən və distillə suyu ilə yuyulduqdan sonra 5-10 dəqiqə 0,1-1 faizli eozin

məhlulunda saxlanılır.

Bu halda sitoplazma, qılf və nüvəcik çəhrayı rənglənmiş olur.

## BEMER HEMOTOKSİLİ

Bemerin hemotoksilin zəyi proqressiv rəngləyici olub iki məhluldan ibarətdir:

*Məhlul A:* 1 q hemotoksilin, 10 ml mütləq spirtdə həll edilir.

*Məhlul B:* 20 q kalium zəyi 200 ml distillə suyunda qızdırılmaqla həll edilir. Tam həll olunduqdan sonra məhlul soyudulur və süzülür.

Məhlullar hazırlanıqdan 24 saat sonra bir-biri ilə qarışdırılır və hazır olmaq üçün 1-2 ay saxlanır. Rəngləmə çox tez, bir neçə saniyə müddətində gedir, ona görə də mikroskopda diqqətlə baxmaq lazımdır.

## DELAFİLD HEMOTOKSİLİ

Kəsikləri proqressiv üsulla rəngləyə bilən rəngləyicinin hazırlanması üçün, 1 q hemotoksilin 6 ml mütləq spirtdə həll edilir, sonra damcı ilə alyuminammonium zeyinin doymuş sulu məhluluna (100 ml-ə) tökülür və kolbanın kip bağlı olmayan ağızından hava daxil olmaqla işıqda saxlanır. Bir həftədən sonra süzülür, qarışığa 25 ml qliserin və metil spirti əlavə edib, ağızı kip bağlı olmayan qabda məhlulun rəngi qaralana qədər saxlanır, 24 saatdan sonra süzülür və ağızı kip bağlı olan qabda «yetişməsi» üçün 1-2 ay saxlanır.

Qabaqcadan 3-4 dəfə zəiflədilmiş rəngləyici məhlul preparatı 5-10 dəqiqə müddətində rəngləyir. Preparat axar

və distillə suyunda yuyulur, yüngülçə xlorid turşusu ilə turşulaşdırılmış 70 faizli spirtdə diferensiasiya olunur, sitoplazma və nüvəcik azca olaraq 1 faizli eozinlə (su və yaxud spirt məhlulunda) 1 q eozin 70 faizli 100 ml spirtdə rənglənir. 96 faizli spirtdə diferensiasiya olunur və kanada balzamı ilə örtülənə qədər müxtəlif qatılıqlı spirt məhlullarından keçirilir. Yadda saxlamaq lazımdır ki, preparatın intensiv rənglənməsi üçün spirtdən keçirmə müddətini 3-5 dəqiqə qısaltmaq lazımdır.

Hemotoksilinlə rəngləndikdən və eozinlə kontrastlaşdıqdan sonra nüvə və xromosom göy, sitoplazma və nüvəcik isə tünd qırmızı rəngə boyanır.

## KARAÇÇI HEMOTOKSİLİ

Proqressiv Karaççi zəy rəngləyicisi aşağıdakı ardıcılıqla hazırlanır: 25 q kalium zəyi 400 ml distillə suyunda həll edilərək, bura 0,5 q hemotoksilin, 100 ml qliserin və 0,01 q KJO əlavə edilir. Bu qarışıqla hüceyrənin nüvə strukturunu, preparat düzəldikdən sonra dərhal rəngləmək olar. Preparat 3-10 dəqiqə rənglənir və 10-30 dəqiqə axar suda yuyulur.

Lazım gələrsə kəsikləri eozinin 1 faizli sulu məhlulu ilə kontrastlaşdırmaq olar.

## ERLİX HEMOTOKSİLİ

Turş hemotoksilinlə rəngləmə metodu, proqressiv üsulla aparılır.

Rəngləyicini hazırlamaq üçün 2 q hematoksilin 96 faizli 100 ml etil spirtində həll edilir və buraya 100 ml distillə suyu, 10 ml buzlu sirkə turşusu və 3 q kalium zəyi əlavə

edilir. Qarışq «yetişmək» üçün, vaxtaşırı qarışdırmaqla 2 həftə işiqda saxlanılır. Hazır süzülmüş məhlulu ağız kip bağlı qabda qaranlıqda uzun müddət saxlamaq olar.

Preparat kəsiklərlə 3-10 dəqiqə müddətində 3-4 dəfə zəiflədilmiş rəngləyici məhlulu ilə rənglənir. Distillə suyunda yuyulur və xlorid turşusu spirtində (1 ml 1 faizli NS məhlulu 70 faizli 100 ml etil spirtində) mikroskopla diferensiasiya edilir.

Preparat axar suda, sonra isə distillə suyunda yuyulur və daimi preparat hazırlanan vaxt tələb olunan mərhələlərə riayət etməklə kanada balzamı ilə örtülür.

Bu rəngləmə üsulu ilə nüvə və xromosomun keyfiyyətli rənglənməsinə nail olmaq olar.

Əzilmiş preparatlar hazırlamaq üçün ayrılmış materialları rənglədikdə, xlorid turşusunda hidrolizdən (Fyulgenə görə rəngləməyə bax) axar suda və distillə suyunda yuduqdan sonra 10-30 dəqiqə rəngləyici məhlulunda saxlanır. Sonrakı işlər yuma, diferensiasiya və kanada balzamına keçirməsi əvvəlcədən qeyd olunan qaydalara uyğun aparılır.

### Karbon – fuksin

Məhlul «A» fuksin sulfid turşusu üçün 30 q əsas fuksin 70 faizli 100 ml etil spirtində həll edilir (qaranlıqda saxlanır).

Məhlul «B» 10 q karbol turşusu (fenol) 200 ml distillə suyunda həll edilir. (Saxlanma müddəti iki həftə).

Sonra məhlullardan aşağıdakı miqdarda götürülür və bir-birinə qarışdırılır.

10 ml «A» məhlulu 90 ml «B» məhlulu 10 ml buzlu sirkə turşusu 10 ml həlleddilməmiş neytral formalin.

Qarışiq qarışdırılır və bir gün otaq temperaturunda saxlanır.

İstifadə etməzdən əvvəl spirtlə isladılmış süzgəcdən süzülür. Rəngləmə müddəti empirik yolla seçilir (adətən 5-20 dəqiqə). Diferensiasiya 96 faizli etanolla aparılır. Bu metod Karnua və yaxud sirkə alkoqolu və fiksə edilmiş materiallardan əzilmiş preparatların rənglənməsi üçün də təklif edilir.

## NYÜTONUN ULTRABƏNÖVŞƏYİ KRİSTALI

Bu metodu sulu fiksatoru ilə fiksə edilmiş mikrotom kəsiklərin rənglənməsində istifadə edilir. Metod aşağıdakı ardıcıl mərhələlərdən ibarətdir. Bunun üçün 2 məhlul hazırlanır.

*Məhlul A* – 1 faizli ultrabənövşəyi kristalın sulu məhlulu qaynadılır, süzülür və soyudulur.

*Məhlul B* – yodun 1 faizli məhlulu – spirtdə 1 faizli kalium yodun məhlulu.

Parafinsizləşdirilmiş preparatlar, obyektdən asılı olaraq 3-10 dəqiqə müddətinə A məhlulunda saxlanır. Sonra distillə suyunda yuyulur və 30-45 saniyə müddətinə B məhluluna keçirilir. 96 faizli spirtlə yuyulur, 5-10 saniyə mütləq spirtdə saxlanır və mixək yağında ksiloldan keçirilməklə kanada balzamı ilə örtülür. Rəngləmə prosesinə düzgün riayət etdikdə və keyfiyyətlə diferensiasiya apardıqda xromosomlar bənövşəyi rənglənməklə yarım-şəffaf olur.

## YAŞIL METİL PİRONİNİ

Rəngləyicidən Karnua və yaxud sirkə alkoqolu ilə fiksə olunmuş materialların rənglənməsində istifadə edilir.

Ultrabənövşəyi metildən istifadə etməzdən əvvəl, onun

məhlulundan ultrabənövşəyi kristal qarışığını ayırməq lazımdır, çünki o preparatın keyfiyyətli rənglənməsinə maneçilik törədir. Bunun üçün ultrabənövşəyi metilin 2 faizli sulu məhlulu hazırlanır və bura bərabər həcmdə xloroform əlavə edilir, möhkəm çalxalanır və 1-2 gün çöküntü üçün saxlanılır. Məhlulun üst yaşıł metil təbəqəsi bölgü qılı ilə alt təbəqədən ayrılır. Bu iş bir neçə dəfə təkrar edilir. Adətən ardıcıl olaraq 4 dəfədən az olmayıaraq təzə xloroformla ayrılma aparılır.

Rəngləyici qarışq hazırladıqda adətən iki məhlul düzəldilir.

A. Rəngləyici məhlul: 17,5 ml 5 faizli pironinin sulu məhlulu 10 ml 2 faizli yaşıł metilin təmizlənmiş sulu məhlulu; 250 ml distillə suyu.

B. Asetat buferi (pH - 4,8) aşağıdakı qayda üzrə hazırlanır.

1. Ölçü kolbasına 1,2 ml buzlu sirkə turşusu tökülür və distillə suyu ilə 100 ml-lik həcmə çatdırılır.

2. 2,72 q natrium sirkə turşusu 100 ml distillə suyunda həll edilir.

3. 74 ml sirkə turşusu məhlulu ilə 100 ml natrium sirkə turşusu məhlulu qarışdırılır.

A və B məhlulları ayrılıqda soyuducuda saxlanır və istifadə edilən vaxt 1:1 nisbətində qarışdırılır. Hazır yaşıł metil pironin məhlulu ağızı kip kolbada soyuducuda saxlandıqda öz rəngləyici xassəsini uzun müddət saxlayır.

Parafinsizləşdirilmiş kəsiklər yaşıł metil pironinin bufer məhlulu ilə 20 dəqiqə müddətinə rənglənir. Preparat dərhal distillə suyu ilə yuyulur və aşağıdakı məhlullardan keçirməklə nəmsizləşdirilir və kanada balzamı ilə örtülürlər.

1. Aseton 100 faiz,
2. 90 faiz – aseton – 90 faiz ksilol,
3. 50 faiz – aseton – 50 faiz ksilol,
4. 100 faiz ksilol.

## **GÖY TOLUIDİN VƏ GÖY METİLEN AYRILIQDA**

Rəngləyici adətən radioavtoqrafiyada bitki və heyvan toxumalarından müvəqqəti preparat hazırlayan zaman aydınlaşdırımdan sonra xromosomların rənglənməsi üçün istifadə edilir.

Birinci halda Sak-İlveyinin buferində (limon turşusu –  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )·pH 4, göy toluidinin 0,05 faizli məhlulundan, ikinci halda isə rəngin 0,5 faizli sulu məhlulundan istifadə edilir.

Rəngləməzdən əvvəl material 20-40 dəqiqə müddətinə  $60^{\circ}\text{C}$ -də 1 n HCl məhlulunda və yaxud  $20^{\circ}\text{C}$ -də 5 n HCl-məhlulunda hidroliz olunur. Preparat 30-60 saniyə müddətində yuyulur və rənglənir.

Nüvənin strukturu materialın sirkə alkoqolu ilə (3:1) fiksasiyasından sonra daha keyfiyyətli rənglənir.

Əzilmiş preparatlar hazırladıqda da material 5 faizli göy metilen məhlulu ilə rənglənir.

## **GÖY TOLUIDİN VƏ UNNA GÖY METİLENİ BİRLİKDƏ İSTİFADƏ ETDİKDƏ**

Quru boyaq maddələri qarışığına (0,5 q göy toluidin və 0,5 q göy metilen) kalium karbonatın 1 faizli 100 ml sulu məhlulu və 5 ml 75 faizli etil spiriti əlavə edilir və 5 dəqiqə

qaynadılır. Məhlul soyudulur və süzülür.

Hidroliz və rəngləmə əvvəlki metoda uyğun aparılır.

## ŞİFF REAKTİVİNİN KÖMƏYİ İLƏ FYULGENƏ GÖRƏ RƏNGLƏMƏ

Fyulgen reaksiyasından istifadə etməklə DNT-nin rənglənməsi metodu (Darlington və La Kurdan sitat 1980) şiffin aldehid reaksiyasına əsaslanır və güclü olmayan çox davamlı rənglənmə verir. Rənglənmə iki mərhələdən ibarətdir:

- Nuklein turşusunun aldehid qrupunun  $60^{\circ}\text{C}$ -də 1 n  $\text{HCl}$  məhlulunda hidroliz etməklə azad olunması.
- Xromosomun bənövşəyi rənglənməsinə səbəb olan azad olmuş aldehid qrupu ilə əsas fuksinin leykoforması arasındaki kimyəvi reaksiya.

Şiff reaksiyasının köməkliyi ilə əzilmiş preparatların hazırlanması üçün ayrılmış materialları və parafin örtüyündən sonra alınmış kəsikləri rəngləmək olar.

Materialların xlorid turşusunda hidrolizi isti və soyuq halda ola bilər. Təcrübələrdə əsasən isti hidrolizdən daha çox istifadə edilir. Bunun üçün şiff reaktivi aşağıdakı qaydada hazırlanır. Fuksin sulfid turşusu almaq üçün 1 q əzilmiş əsashı fuksin 200 ml qaynayan distillə suyunda həll edilir və tez-tez çalxalamaqla 5-15 dəqiqə qaynadılır.  $50^{\circ}\text{C}$ -yə qədər soyudulur, süzülür və 20 ml 1 n  $\text{HCl}$  (1 n  $\text{HCl}$  məhlulu 82,5 ml  $\text{HCl}$  (sixlığı 1,19) 1 l-ə qədər distillə suyu əlavə edilir) tökülür:  $25^{\circ}\text{C}$ -yə qədər soyudulur, 1 q susuzlaşdırılmış natrium metabisulfit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) və yaxud daha davamlı kalium metabisulfit ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) əlavə edilir. Alınmış tünd-qırmızı rəngli məhlul ağızı kip bağlı qablar tökülür və

məhlulun tünd-qırmızı rəngi şəffaflaşana qədər  $25^{\circ}\text{C}$ -də soyuducuda 24 saatə qədər saxlanır. Yaxşı keyfiyyətli fuksin məhlulu rəngsizləşir və yaxud da zəif sarı rəngə çevrilir. Soyuducuda qaralıq yerdə saxlamaqla o öz keyfiyyətini bir neçə ay saxlaya bilir.

Məhlulun rənginin qızarması fuksin sulfid turşusunun parçalandığını və Şiff reaktivinin istifadə edilməsinin yararsız olduğunu göstərir.

Mikrotom kəsiklərin və əzilmiş preparatların hazırlanması üçün materialların rənglənmə üsulu ayrı-ayrı manipulyasiyalara görə bir qədər fərqlənir.

Əzilmiş preparatların hazırlanmasında istifadə edilən materialların Fyulgen reaksiyası ilə işlənməsi aşağıdakı ardıcılıqla aparılır:

1. Materiallar  $70^{\circ}$  spirtdən bir neçə saniyə müddətinə 1 n HCl məhluluna, sonra isə bir neçə dəqiqə  $60^{\circ}$ -li 1 n HCl-a keçirilir. Hidroliz, temperatur şəraitinə ciddi riayət etməklə aparılır. Ona görə də  $60^{\circ}$ -yə qədər qızdırılmış 1 n HCl su hamamına qoyulur və temperatur termometr ilə yoxlanır.

On yaxşı Fyulgen reaksiyası ilə nəticə o vaxt alınır ki, fiksator kimi Karnaudan istifadə edilsin (bu halda materialın yaxşı rənglənməsi üçün hidrolizin müddəti 8 dəqiqə), sirkə alkoqolu fiksatoru (hidroliz 6 dəqiqə), Navaşın fiksatoru (hidroliz 5-10 dəqiqə).

2. Materiallar bir neçə saniyə müddətinə soyuq 1 n HCl məhluluna keçirilir, sonra material şiff reaktivində 0,5-1,5 saat (vaxt empirik yolla seçilir) müddətində rənglənir.

3. Materiallar 3 növbədə 5-10 dəqiqə sulfidli su ilə yuyulur. Sulfidli suyun tərkibi – 5 ml 1 n HCl, 5 ml 10 faizli  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , 100 ml distillə suyu.

4. Materiallar 5-10 dəqiqə axar suda yuyulur, 40-45

faizli sirkə turşusu ilə yaxalanır və sonra 45 faizli sirkə turşusunda əzilmiş preparat hazırlanır.

Mikrotom kəsiklərin Şiff reaktivini ilə rənglənməsi aşağıdakı sxem üzrə aparılır.

1. Əşya şüşəsi kəsiklərlə adi üsulla suya çatdırılır, soyuq 1 n HCl məhlulu olan qaba qoyulur və 60°C-yə qədər qızdırılır. Hidrolizin müddəti istifadə olunan fiksatorдан asılı olaraq aparılmalıdır (yuxarıda qeyd olunduğu kimi).

2. Əşya şüşəsi kəsiklə birlikdə soyuq 1 n HCl-la yaxalanır və 1-2 saathöyük şiff reaktivində saxlanır.

3. Əşya şüşəsi kəsiklə birlikdə üç növbədə sulfidli suda 5 dəqiqə, axar suda 5-10 dəqiqə sonra isə distillə suyunda yuyulur.

4. Tünd rənglənmiş kəsiklər 1-2 dəqiqə müddətinə su və yaxud spirtin 1-2 faizli məhlulu ilə açıq yaşıllı rənglənir.

5. Kəsiklər, əşya şüşəsi 1-2 dəqiqə spirtdən (96 faizli, 10 faizli), 5-10 dəqiqə əsaslı III, IV-dən keçirilməklə nəmsizləşdirilir və kanada balzamı ilə örtülür.

Preparatların boyanması bu ardıcılıqla aparıldığda xromosom al qırmızı bənövşəyi, sitoplazma və nüvəcik isə yaşıllı rənglənir.

## ӘДӘВІЙАТ

*Трошин А.С., Браун А.Д., Бахтин Ю.Б., Жинкин Л.Н., Суханова К.М.* Цитология. М.: Просвещение, 1970, 304с.

*Малый практикум по цитологии. Под ред. Ю.С. Ченцова.* Из-во Московского Университета, 1977, 288с.

*Атабекова А.И., Устинова Е.И.* Цитология растений. М.: Колос, 1967, 232с.

*Ауэрбах Ш.* Проблемы мутагенеза. М.: Мир, 1978, 463с.

*Дубinin Н.П.* Потенциальные изменения в ДНК и мутации. Молекулярная генетика. М.: Наука, 1978, 246с.

*Чеботарев А.Н., Селезнova Т.Г., Платонова В.И.* Модифицированный метод дифференциальной окраски сестринских хроматид. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. М.: Медицина, 1978, 2, с. 242-243.

*Ватти К.В., Тихомирова М.М.* Руководство к практическим занятиям по генетике. М.: Просвещение, 1979, 189с.

*Чеботарев А.Н., Селезнova Т.Г.* Использование 5-бромдезоаксиуридина для определения фаз митотического цикла // Цитология и генетика, 1979, 13, №3. с. 163-167.

*Дарлингтон С.Д., Ла Кур Л.Ф.* Хромосомы. Методы работы. М.: Атомиздат, 1980, 216с.

*Стент Г., Кэлиндар Р.* Молекулярная генетика. М.: Мир, 1981, 646с.

*Гершензон С.М.* Основы современной генетики. Киев, Наукова думка, 1983

*Айала Ф., Кајгер Дж.* Современная генетика. В трех томах. М.: Мир, 1987

*Инге-Вечмотов С.Г.* Генетика с основами селекции. М.: Высшая школа, 1989

*Жимулев И.Ф.* Общая и молекулярная генетика. Новосибирск, 2003

*Babayev Məspun, Məcidov Məcid.* Genetikadan praktikum. Bakı, Çaşıoğlu, 2006

*Babayev Məspun.* Molekulyar genetikadan mühazirələr. Bakı, BDU, 2006

*Клаг У., Каммингс М.* Мир биологии и медицины. Основы генетики. М.: 2009

# MÜNDƏRİCAT

Ön söz .....	3
Giriş.....	6
<b>Fəsil 1. Mutagenez .....</b>	<b>10</b>
1.1. Bitkilərdə spontan mutagenez.....	10
1.2. Bitkilərdə sünü mutagenezin tarixi .....	12
1.3. Kimyəvi mutagenlərin təbiəti və onların təsir mexanizmi ...	19
1.4. Ali bitkilərdə mutagenlərin təsirinin analizi .....	24
1.5. Ali bitkilərdə kimyəvi mutagenlərin effekti .....	28
1.6. Bitkilərdə sünü mutasiyanın təbiəti .....	29
1.7. Kimyəvi mutagenlərin bitkilərdə spesifik təsiri haqqında...	35
1.8. Sünü mutagenezdə genotipin rolu .....	43
<b>Fəsil 2. Eukariot orqanizmlərin hüceyrə tsikli.....</b>	<b>62</b>
2.1. Spontan və induksiya mutasiyaları .....	76
2.2. Mutasiyaların təsnifatı.....	77
2.3. Xromosom aberrasiyaları, onun mexanizmi və təsnifatı....	83
2.4. Xromosom tipli dəyişilmələr .....	89
2.5. Xromatid tipli dəyişilmələr .....	101
2.6. Gen mutasiyası .....	109
2.7. Əsasların əvəz olunması.....	113
2.8. Əsaslarınitməsi və əlavə olunması ilə əmələ gələn mutasiyalar .....	117
2.9. Mitotik indeks .....	118
<b>Fəsil 3. Xromosom və gen mutasiyalarının struktur dəyişilmələrinin tədqiqat üsulları.....</b>	<b>126</b>
3.1. Fiksasiyadan əvvəl materialların hazırlanması .....	127
3.2. Fiksasiya.....	128
3.3. Müvəqqəti preparatların hazırlanması .....	130
3.4. Müvəqqəti preparatların daimi preparatlara keçirilməsi ..	132
3.5. Daimi mikrotom preparatlarının hazırlanması .....	133

3.6. Parafin həllədiciinin materiala həpdurulması .....	135
3.7. Parafin bloklarının və onlardan kəsiklərin hazırlanması ..	137
3.8. Kəsiyin əşya şüşələri üzərinə yapışdırılması .....	138
3.9. Kəsiklərin parafinsizləşdirilməsi və rənglənməsi.....	139
3.10. Quru-hava preparatlarının hazırlanması.....	140
3.11. Yarpaqların meristem hüceyrəlerinin sitogenetik analizi ..	142
3.12. Toxumalarda və hüceyrə kulturalarında xromosom dəyişilmələrinin analiz metodu.....	144
3.13. Kultura olunmamış sümük iliyi hüceyrələrindən xromosom preparatlarının alınma üsulu.....	148
3.14. Tam və yarı tam köçürülmüş hüceyrə xətlərin sitogenetik analizi .....	150
3.15. Leykosit hüceyrəlerinin sitogenetik analiz üçün kultura olunması .....	155
<b>Fəsil 4. Mitotik tsiklin müvəqqəti parametrlərinin və onun faza- larının təyin edilmə üsulları.....</b>	<b>161</b>
4.1. Radioavtoqrafiya.....	161
4.2. İzotopların bitki hüceyrələrinə daxil edilməsi .....	166
4.3. İzotop kimi 5-bromdezoksiuridindən istifadə olunması ..	167
4.4. Sitogenetik analiz üçün metafaza hüceyrəlerinin alınma üsulu .....	171
4.5. Bacı-xromatid mübadiləsinin (BXM) analiz üsulu.....	175
4.6. Çin dağ siçanının hüceyrəlerinin diferensial rənglənməsi üsulu ilə BXM-nin analizi .....	179
4.7. Zerrensen buferinin (pH 6,8) tərkibi.....	182
4.8. İnsanların limfosit qan kulturalarında BXM-nin analizi .	185
4.9. Bitki hüceyrələrində BXM-nin analizi .....	189
4.10. Salmonellada gen mutasiyasının analizi .....	195
4.11. Yarızənginləşmiş üst yarımmaye aqarın tərkibi .....	201
4.12. Üst minimal yarımmaye aqarın tərkibi .....	209
<b>Fəsil 5. Metabolizmi aktivləşdirməklə <i>in vitro</i>-da gen mutasiyasının hesablanmasına kəmiyyət metodu.....</b>	<b>213</b>

5.1. Maya göbələyində gen mutasiyasının analizi .....	215
5.2. Spontan mutasiyaların başvermə tezliyinin analizi .....	218
5.3. Fiziki və kimyəvi amillərin mutagen və letal təsirinin kəmiyyətcə hesablanması .....	221
5.4. Arabidopsisdə gen mutasiyasının analizi .....	226
<b>Fəsil 6. Əlavələr .....</b>	<b>232</b>
Əlavə 1. Nüvə fiksatorları .....	232
Əlavə 2. Nüvə rəngləyiciləri .....	234
<b>Ədəbiyyat .....</b>	<b>248</b>

BABAYEV Məcnun Şıxbaba oğlu  
MƏCIDOV Məcid Məhəmməd oğlu  
ƏSGƏROV İdris Teymur oğlu  
ƏLİYEV Əli AĞABALA oğlu

# MUTAGENEZ

## MUTASIYANIN ANALİZ ÜSULLARI

(dərs vəsaiti)

---

Yığılmağa verilib: 26.08.11. Çapa imzalanıb: 06.09.11  
Format 60x84 1/16. F.ç.v.15,75. Sifariş № 92.  
Kağız əla növ. Tiraj 200 nüsxə. Qiyməti müqavilə ilə

---

*“Tİ-MEDİA” şirkətinin mətbəəsi*