

**BAZI 2-SÜBSTİTÜE 1H-FENANTRO [9,10-d]  
İMİDAZOL BİLEŞİKLERİNİN MUTAJENİK  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**EMEL ERGENE**  
Yüksek Lisans Tezi

**Biyoloji Anabilim Dalı**  
**AĞUSTOS-1998**

**ANADOLU ÜNİVERSİTESİ**  
**MERKEZ KÜTÜPHANESİ**

Emel Ergene.....' in ... Yüksek Lisans .....Tezi olarak hazırladığı .....Bazı 2-süstitüe 1H-Fenantro [9,10-d] imidazol Bileşiklerinin Mutajenik Etkilerinin Araştırılması..... başlıklı tez 03./02./1998.....tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Lisansüstü Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Üye (Tez Danışmanı) : Yrd. Doç. Dr. Nülgen Zeytinöglü

Üye : Prof. Dr. Ahmet ÖZATA

Üye : Y. Doç. Dr. Ayşe MERCANER

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun 18..9..1998...tarih ve .....14./1.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

**ÖZET****Yüksek Lisans Tezi****BAZI 2-SÜBSTİTÜE 1H-FENANTRO [9,10-d] İMİDAZOL  
BİLEŞİKLERİNİN MUTAJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI****EMEL ERGENE****Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı****Danışman: Yard. Doç. Dr. Hülya ZEYTİNOĞLU  
1998, Sayfa 69**

Bu çalışmada, ilaç öncül maddesi olarak hazırlanan 2-Süstitüe 1H-Fenantro [9,10-d] imidazol' ün 5 ayrı türevinin mutajenik etkileri, *Salmonella typhimurium*' un çerçeve kayması mutasyonuna sahip iki suşu olan TA 97 ve TA 98' de, Ames / Salmonella / Mikrozom test yöntemiyle araştırılmıştır. Bunun için her iki suş mikrozomal enzimler içeren metabolik aktivasyon (S9) varlığında ve yokluğunda, her bir test maddesinin 5 ayrı dozu ile iki bağımsız paralel deneyde test edilmiştir. S9 yokluğunda pozitif kontrol olarak TA 97 için Sodyum azid, TA 98 için 4-nitro-o-fenilendiamin, S9 varlığında ise her iki suş için 2-Aminofluorene kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise çözücü DMSO ve spontan kontrol grupları kullanılmıştır. Test sonuçları iki deneyin ortalaması alınarak değerlendirilmiş ve pozitif ve negatif kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Buna göre test maddelerinden 2-metil-fenantroimidazol ve fenantroimidazol' ün yalnızca S9 varlığında mutajenik aktiviteye sahip olduğu, diğer 3 türevin ise mutajenik aktivite göstermediği bulunmuştur. Gözlenen mutajenik etkinin metabolik aktivasyona bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Ames Test, Mutajenite Testleri, Fenantroimidazol,

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

**AN INVESTIGATION ON THE MUTAGENIC EFFECTS OF SOME 2-SUBSTITUE 1H-FENANTRO [9,10-d] IMIDAZOLE COMPOUNDS.**

**EMEL ERGENE**

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

**Supervisor: Assoc. Proff. Hülya ZEYTİNOĞLU**  
**1998, Page 69**

In this study, mutagenic effects of five different derivatives of 2-Substitue 1H-fenantro [9,10-d] imidazoles prepared premise of drug were investigated using *Salmonella typhimurium* TA 97 and TA 98 containing frameshift mutation with Ames assay. Therefore, both test strains were tested in the absence or presence of S9 metabolic activation, for five different doses of each test substances in two parallel independent experiments. Results were evaluated by calculating average of two experiments. At the absence of S9, Sodyum Azid was used as a positive control for TA 97, 4-Nitro-o-Fenilendiamin was used for TA 98. At the presence of S9, 2-Aminofluorene was used as a positive control for both test strains. Solvent Dimetyl sulphoxyd (DMSO) and spontan control groups were used as a negative control. Results of experiments were compared with positive and negative control groups data. So that 2-Metil-Fenantroimidazole and Fenantroimidazole were found to have mutagenic activation only in the presence of S9 but other three derivatives show mutagenic effects. This mutagenic effect observed may be depend on the metabolic activation.

**Keywords: Ames Assays, Mutagenity Tests, Fenantroimidazole**

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesinde, değerli bilgilerini, yardım ve önerilerini benden esirgemeyen, yapıcı eleştirileri ile beni yönlendiren değerli danışman hocam Sayın **Yard. Doç. Dr. Hülya ZEYTİNOĞLU'** na, ve bölümün tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanı hocam Sayın **Prof. Dr. Ahmet ÖZATA'** ya, her zaman değerli fikir ve bilgilerinden yararlandığım hocam Sayın **Yard. Doç. Dr. Melih ZEYTİNOĞLU'** na, ayrıca yardımlarını gördüğüm Moleküler Biyoloji Anabilim dalı **Öğr. Gör. Berrin AYAZ TÜYLÜ'** ye, **Araş. Gör. A.Tansu KOPARAL'** a teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Çalışmamın laboratuvar aşamasında bana yardımcı olan Sayın **Uzman Hülya OCAK'** a, deney sonuçlarımızın yorumlanmasında yardımlarını gördüğüm Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Sayın **Prof. Dr. İlhan IŞIKDAĞ'** a, istatistiksel olarak değerlendirilmesinde yardımcı olan İstatistik Bölümü **Araş. Gör. Berna BALOĞLU'** na, çalışmamın her aşamasında bana yardım eden ve beni destekleyen sevgili arkadaşlarım **Biyolog Derya TÜYLÜ ÖNAL'** a, **Yüksek Biyolog Kamel SALEH'** e, Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü **Araş. Gör. Mustafa UYANOĞLU'** na ve tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Tüm yaşamım boyunca beni her konuda maddi ve manevi olarak destekleyen, beni yönlendiren ve her zaman yanımda olan sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>TABLO ve ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Mutasyon.....	6
1.1.1. Kromozom Sayısı Değişmeleri (Genom mutasyonları).....	8
1.1.2. Kromozom Yapısı Değişmeleri (Kromozom mutasyonları).....	9
1.1.3. Gen Mutasyonları (Nokta mutasyonu).....	10
1.2. Mutasyonların Genetik Çalışmalarda kullanımı.....	13
1.2.1. <i>Salmonella</i> 'nın genetik özellikleri.....	14
1.3. Mutasyon Oluşturan Faktörler (Mutajenler).....	17
1.4. Metabolik Aktivasyon.....	21
1.4.1. Mikrozomal enzimler.....	23
1.5. İmidazol ve Fenantroimidazol'ün Yapısı ve Aktivitesi.....	26
1.5.1. İmidazol' ün sentezi ve biyolojik aktivitesi.....	26
1.5.2. Fenantroimidazol' ün sentezi ve genel özellikleri.....	30
<b>2. MATERYAL VE METOD</b> .....	<b>33</b>
2.1. Materyal.....	33.
2.1.1. Kimyasal maddeler.....	33
2.1.2. <i>Salmonella typhimurium</i> test suşları.....	33
2.1.3. Test Maddeleri (dozları ve hazırlanışı).....	33
2.1.4. Deneyde Kullanılan Ortamların İçerikleri.....	34
2.2. Metod.....	40
2.2.1. <i>Salmonella</i> suşları' nın kültürlerinin ve master plaklarının hazırlanması ...	40
2.2.2. <i>Salmonella</i> suşları' nın stoklanması ve stok kültürlerin açılması.....	41.
2.2.3. <i>Salmonella</i> suşları' nın kontrol testlerinin yapılması.....	41
2.2.3.1. Bakterilerin genotiplerinin kontrol edilmesi.....	41
2.2.3.2. Sıvı kültürün ml' sindeki bakteri sayısının belirlenmesi.....	44
2.2.4. Test bakterilerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi.....	44
2.2.5. Memeli karaciğer mikrosomlarının hazırlanması.....	45
2.2.6. Metabolik aktivasyon için mikrosom miktar tespiti.....	46
2.2.7. Ames mutajenite testinin yapılışı.....	46
2.2.7.1. S9'suz (-) deneyler.....	47
2.2.7.2. S9'lu (+) deneyler.....	47
2.2.7.3. Sonuçların değerlendirilmesi.....	48

<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>49</b>
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>55</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>61</b>

## TABLO VE ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	Sayfa
Şekil 1.1. <i>Salmonella typhimurium</i> ' un çembersel gen bağlantı haritası (75).....	15
Tablo 1.1. Mutajenite testinde kullanılan <i>Salmonella typhimurium</i> ' un mutant suşlarının taşıdıkları genotip özellikleri.....	16
Şekil 1.2. Sitokrom P450 tarafından substratın hidroksilasyonu (86).....	25
Şekil 1.3. İmidazol' ün genel formülü (22).....	26
Şekil 1.3. 2-Süstitüe fenantroimidazol' ün genel formülü (95).....	30
Tablo 1.2. Mutajenitesi araştırılan kimyasal test maddelerinin isimlendirilmesi ve kimyasal formülleri (95).....	31
Tablo 3.1. Mikrozomal fraksiyonun miktar tespiti.....	49
Tablo 3.2. Fenantroimidazol' ün beş ayrı türevinin TA 97 ile verdikleri revertant koloni sayıları.....	51
Tablo 3.3. Fenantroimidazol' ün beş ayrı türevinin TA 98 ile verdikleri revertant koloni sayıları.....	52



## 1. GİRİŞ

Günümüzde yaşadığımız çevre, insanoğlunun bir takım olumsuz etkileri sonucu giderek bozulmaktadır. Son yıllarda hızlı nüfus artışı ve aşırı kentleşme ile teknolojik gelişmeler ve bunlara bağlı olarak yaşam düzeyinin yükselişi doğal kaynakları olumsuz yönlerde etkiler olmuş ve canlıların yaşam ortamlarında bozulmalara ve dengesizliklere sebep olmuştur. Sonuçta bu bozulma ve kirlenmeler canlıların sağlığını tehdit edici boyutlara ulaşmıştır. Bu sebeple çevre sorunları günlük yaşamın en önemli sorunu haline gelmiştir. Ciddi sorunlar oluşturabilen birçok hastalığın ortaya çıkmasına yol açan etmenlerin başında günlük yaşamda sık sık kullanılan sentetik yada doğal kimyasal bileşikler gelmektedir.

Bu bileşiklerin bir çoğu canlıların DNA' sında değişikliklere yol açarak genotoksik ve kanserojenik etkilere sahip olmaktadır. Kimyasalların oldukça büyük bir kısmına, özellikle laboratuvar koşullarında yüksek dozda maruz kalınması sonucu mutajenik veya teratojenik olduğu bilinmektedir (1-5). İnsan popülasyonunun çevredeki kanserojen ve mutajen maddelerin etkisinden korunması için çevremizdeki bu özelliğe sahip bileşiklerin tespit edilmesi ve etkilerinin değerlendirilmesi öncelikle gerekli ve önemlidir (1,4,6,7).

Kanserojen ve mutajen maddelerin araştırılması çeşitli testlerle tespit edilebilir (4,5,8-18). Bunlardan bazıları DNA hasarlarına sebep olan kimyasal mutajen ve kanserojenlerin test edildiği sitogenetik metodlardır. Bu testler; kardeş kromatid değişimi (SCE = Sister chromatid exchange) (8-11,19-26), mikronükleus testi (MN) (4,8-13), kromozom bozulma testi (CA = chromosome aberration) (15), comet testi (gen konversiyonları ve DNA kırılmaları) (20,27), programlanmamış DNA sentezi

(UDS=Uncheduled DNA synthesis) (14,16,17), SOS kromotest (18,19), transformasyon yöntemi (4), umu test (18), ve Ames/Salmonella/Mikrosom yöntemi (4,5,8-20) şeklinde sıralanabilir. Tüm bu mutajenite test yöntemleri *Salmonella* test suşları, çeşitli *E.coli* suşları, rat, primat ve tavşan türleri kullanılarak hazırlanmış memeli hücre kültürleri ve memelilerin kan ve kemik iliği hücreleri, *Saccharomyces cerevisia* suşları vb. farklı organizmalar kullanılarak uygulanmaktadır (2-9,12-20,25). Bu testlere kısa zamanlı (short term ) testler de denir (8,9,15,21). Bu kısa zamanlı testlerle, kimyasal maddelerin belirli genetik sistemlerde belirli sonuçlar verip vermedikleri ölçülmekte ve elde edilen sonuçlarla maddelerin kanserojenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmaktadır. Kısa zamanlı *in vitro* çalışmalar, kimyasal maddenin bakterilerde mutajenik etkilerini, hücrelerde değişmeye sebep olup olmadığını, DNA değişim ve tamiri üzerindeki etkisini ve memelilerdeki mutajenik etkisinin araştırılmasını kapsar. Uzun süreli çalışmalar, uygun hayvan türleri seçilerek kimyasal maddenin uygulanmasını takiben yapılan otopside patolojik ve histolojik çalışmalara dayanır (21). Memelilerde *in vivo* mutajenite testlerinin en önemli zorluğu, memelilerin mutajen maddelere oldukça az duyarlı olmalarıdır. Ayrıca, deney hayvanlarının bakımı ve çoğaltılması oldukça zor, zaman alıcı ve pahalıdır. Bunun yanında mikroorganizmalar mutajenlere karşı çok daha fazla duyarlıdır. Kısa zamanda çok sayıda jenerasyon geçirdiklerinden dolayı çalışılmaları daha kolay ve daha ucuzdur (21).

**SCE yöntemi**'nin prensibi; kardeş kromatidlerin birbirine kontrast sağlayacak şekilde boyanmasına dayanır. Kardeş kromatidlerde meydana gelen parça değişimi, boyanma farklılığından hemen anlaşılır. Bu yöntemle sadece kromozomlarda oluşan

yapısal değişimler gözleendiğinden dolayı SCE yöntemi sınırlı amaçlar için kullanılabilir (4,5,8-11,15,16,22-26).

**Mikronükleus testi** bölünme yeteneğine sahip tüm hücrelerde yapılabilen bir testdir ve temel prensibi, bazı mitoz anomalileri ve kromozom kaybı gibi durumların ortaya çıkarılmasına yöneliktir. Çekirdek boyanması ile incelenir. Bu amaçla en çok memelilerin polikromotofil (PCE) ve normokromotofil (NCE) eritrositlerinde çalışmalar yapılmaktadır (4,8-13,20,27-30).

**CA ve Comet yöntemi'** nde ise hücreler metafaz safhasında incelenerek kromozom hatalarının ortaya çıkarıldığı sitogenetik bir yöntemdir (8,12,15,22,31,32).

**UDS yöntemi,** 'programlanmamış DNA sentezi' testi olarak adlandırılır. Bu yöntemin prensibi, primer rat hepatositlerinde DNA tamirinin uyarılmasına dayanmaktadır. UV ile pozitif kontrol deneyleri yapıp otoradyografik olarak değerlendirilmektedir (8,14,16,17).

**S.O.S. kromotest'** in temeli, *E.coli'* de hasarlı DNA da S.O.S. cevabının uyarılmasına yöneliktir. *E.coli'* de SOS sisteminin genel reseptörleri ile gen kontrol edildiğinden dolayı S.O.S. kromotest, DNA hasarlarını tespit etme olanağı sağlar (18,19).

**Transformasyon yöntemi'** nde, M2-C3H fare fibroblast hücrelerinde malignant transformasyonun uyarılmasıyla kimyasal maddelerin mutajenik ve tümorojenik etkileri ölçülür. Kanserojenik maddelerin tespiti için daha uygun bir testtir (4).

**Umu test yöntemi,** DNA hasarları için bir kromojenik testtir. Bu test için sadece tek bir bakteri suşu gereklidir. Yüksek bakteriyotoksik etkilere sahip olan kimyasalların teşhisinde kullanılabilir. Umu test suşu olan TA 1535 / pSK1002' ye eklenen çok

kopyalı plazmidler, *NR* (nitroaren) geni, *NAT* (N-asetil transferaz) geni yada her ikisini bakteriye aktarmaktadır. Sonuç olarak bu bakteri suşu DNA hasarına sebep olan 'nitroantren' ve 'aromatik aminler' e karşı hassasiyet kazanır (18).

**Ames / Salmonella / Mikrosom test yöntemi** 1975 yılında Prf. Dr. Ames ve Dr. Maron tarafından geliştirilen ve daha sonra yaygın olarak uygulanmaya başlanan bir mutajenite testidir (6,10,11,16,33-43). Bu test, gerek çevre kirlenmesine neden olan kimyasal maddelerin (2,12,16,17,22,35,36,40-42,44-55), gerekse diğer fiziksel, kimyasal (2-7,9-11,14,15,18,19,55-73) ve biyolojik maddelerin (52,64,68) mutajenik etkilerinin araştırılmasında kullanılabilir. Bu testin temeli, yapay mutasyon oluşturulmuş olan *Salmonella typhymurium*' un histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş (His<sup>-</sup> = oksotrof) olan suşlarının test bileşeni ile muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyon geçirip his<sup>+</sup> hale geri dönüşmesi temeline dayanır. Geri dönüşen (revertant) bakteri kolonileri sayılarak değerlendirilir. Fakat normalde de mutajenlere maruz kalmadan spontan olarak geri dönüşebilen bakteriler olmaktadır. Mutajenik etkiden bahsetmek için spontan revertant sayısından daha fazla sayıda revertant koloni sayılması gerekir (6,38,39). Bu test ile birçok mutajenik madde teşhis edilmiştir (6). Bu test *Salmonella typhymurium*' un TA ve YG suşları ile uygulanmaktadır. En çok kullanılan bakteri suşları, TA 97, TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535, TA 1538 suşlarıdır. (51,52,60,68,70).

Son yıllarda, tıp ve farmakoloji alanlarında yeni ilaçların gelişiminde üretilen ilaç hammaddelerinin biyolojik sistemlerdeki toksik ve mutajenik etkilerinin araştırılmasında kısa zamanlı testler kullanılmaktadır. Yukarıda sayılan test yöntemleri kullanılarak ilaç hammaddesi olması düşünülen test maddelerinin toksik, mutajenik-

karsinojenik etkilerini incelemek için daha çok Ames testi kullanılmaktadır. Ames testinde, mutajenik etkilerin diğer canlı gruplarına göre daha fazla duyarlı olan bakteriler üzerindeki etkilerinin araştırılmasının yanı sıra, bu test ile aynı zamanda ortama ilave edilen memeli metabolik aktivasyon enzimleri ile, test bakterilerinin memeli metabolizmaları sonucunda oluşabilecek metabolitlerinin de mutajenik etkileri araştırılmaktadır (3,6,58,61,62,66).

Hayvansal organizmalarla yapılan uzun zamanlı testlerle kanserojen ve mutajen olduğu belirlenmiş 300 kimyasal madde Ames / Salmonella / mikrozom yöntemiyle 'Tokyo Merkez Kanser Enstitüsü', 'Imperial Kimyasal Endüstrileri' ve 'Uluslararası Kanser Araştırma Merkezleri' nde test edilmiş ve testin geçerliliği onaylanmıştır. Bu mutajen kimyasalların içinde en çok bilinenleri; saç boyası aminleri, dizel eksozunda bulunan 1-nitropirenler, alev önleyiciler, tris (2,3-dibromopropil) fosfat ve besinlerin pişirilmesiyle oluşan prolije ürünler olarak sayılabilir (6,68).

Kanserojenik maddelerin %90' ının mutajenik olduğu teşhis edilmiştir (6,21,38,69). Ames (1983)' in bildirdiğine göre Rinkus ve Legator (1978-1981) çalışmalarında kanserojenite ve mutajenite arasındaki ilişkiyi incelemişler ve bu iki etki arasındaki korelasyon değerini yaklaşık olarak %83 olarak bulmuşlardır (6,21,38,69), yine Ames (1983)' de bahsedilen, Mc. Cann ve arkadaşları tarafından 1975' de yapılan bir çalışmada, denenen 179 kanserojenik maddenin 156' sının, yani %87' sinin mutajenik etki gösterdiği ve kanserojen olmayan 117 çeşit diğer bir grup maddenin %66' lık kısmının mutajenik etki göstermediği bulunmuştur (6,21). Bu sebeple kimyasal maddeleri 'mutajenler' ve kanserojenler' olarak iki grupta incelemek yerine 'mutajen / kanserojen' olarak bir grupta incelemek daha doğru olduğu kabul edilmektedir (22).

## 1.1 Mutasyon

Bilindiği gibi, DNA kalıtsal bir materyal olduğu için gelecek nesillere değişmez bir formda aktarılması gerekir (74). Fakat, zaman zaman doğal ve yapay koşullar altında mutasyon denen değişiklikler gözlenebilir. DNA' nın türe özgü kalıtsal kombinasyonu değişmeksizin, taşıdığı bilgi içeriğinde meydana gelen değişmeye 'mutasyon' denir (75,76).

Bir genin baz dizisindeki bir değişim bazen o gen tarafından kodlanmış olan üründe de değişime sebep olabilir. Böyle mutant bir genin mutant enzimi, aminoasit dizisinde meydana gelen değişme sebebiyle inaktif yada daha az aktif olabilmektedir. Eğer hücre, mutasyon sonucu ihtiyaç duyduğu bir fenotipik özelliği yitirirse genotipteki bu değişiklik zararlı yada öldürücü olabilir. Bununla birlikte bir mutasyon faydalı da olabilir. Örneğin mutant bir gen tarafından kodlanan enzim, hücreye avantaj sağlayan yeni bir aktiviteye sahip olursa bu mutasyon çeşidi nadir de olsa canlıya doğal seleksiyonda avantaj kazandırır. Mutasyonlar; popülasyondaki çeşitliliği sağladığından, yeni türlerin oluşumuna katkıda bulunduğundan dolayı evrimsel öneme sahiptir (22,38,74-79).

Basit mutasyonların birçoğu nötraldir. DNA baz dizisindeki değişme, bu gen tarafından kodlanan ürünün aktivitesinde herhangi bir değişmeye yol açmaz. Nötral mutasyonlar genellikle DNA üzerinde, özellikle de mRNA' nın üçlü bazına karşılık gelen bir nükleotid' in yerine farklı bir nükleotid geçtiğinde meydana gelir. Genetik kodun bozulması sebebiyle sonuçlanan yeni kodonda bir aminoasit için olan kod sessiz kalabilir. Bu aminoasit düzenli olarak değişmesine rağmen protein fonksiyonunda bir değişme olmuyorsa, bu aminoasit, ya proteinin aktivitesini etkilemeyen kısımdadır

yada değişen kısım orjinal aminoasite çok yakın (onun fonksiyonu görebilen) bir yapıdadır denilebilir (38).

Mutasyonlar doğada kendiliğinden olabildiği gibi 'mutajen' denen fiziksel ve kimyasal etkenlerle de olabilir. DNA' da; bilinen bir mutajenik etki uygulanmaksızın oluşan mutasyonlara 'kendiliğinden (spontan) mutasyon' denir. Normal koşullarda spontan mutasyon frekansı  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  gibi düşük bir orandadır. Ayrıca iki ayrı gende aynı anda mutasyon olma frekansı  $10^{-14}$  gibi çok daha düşük bir değerdedir (22,38,39,75). Fiziksel yada kimyasal maddelerle meydana gelen mutasyonlara ise 'uyarılmış (inducer) mutasyon' denir. Bu mutajenlerin bir kısmı; örneğin nitroz asidi ( $HNO_2$ ), bir bazın diğer bir baza dönüşmesini sağlar (C,U). Yapı benzerleri denen kimyasal mutajenler (baz analogları ) ise DNA yapısına katılarak genetik kodun değişmesine sebep olur. U.V ışığı timin bazları arasında anormal eşleşmeye (dimerizasyon) sebep olduğundan dolayı DNA' da lokal bükülmeye sebep olurken (Xeroderma hastalığı), X ışınları da DNA da kırılmalara sebep olur (38,39,74,77-79).

Mutasyon vücut hücrelerinde yada üreme hücrelerinde olabilir. Vücut hücrelerinde olan mutasyonlara 'somatik mutasyonlar' denir ve bu mutasyonlar hastalıklara ve dejenerasyonlara yol açarak gelişmeyi ve metabolizmayı olumsuz etkileyebilirler. Birçok kanser türünün somatik hücrelerde genellikle bir mutasyon nedeni ile ortaya çıktığı bilinmektedir. Üreme hücrelerinde görülen mutasyonlara ise 'germinal mutasyonlar' denir. Üreme hücrelerin DNA' sında görülen değişmeler genetik içeriğın farklılığına yol açar ve bu mutasyon kalıtsal olarak yeni nesillere aktarılır (74,78,79).

Mutasyonlar 2 temel grupta incelenebilir. Bunları 'kromozom mutasyonları' ve 'gen mutasyonları' olarak sıralayabiliriz. Kromozom mutasyonları da 'kromozom sayı değişimleri' ve 'kromozom yapı değişimleri' şeklinde iki gruba ayrılabilir (74-79).

### 1.1.1. Kromozom sayı değişimleri (genom mutasyonları)

Organizmaların hem doğal hem de laboratuvar popülasyonlarında kendiliğinden meydana gelen kromozom sayısındaki değişimlerdir. Alternatif olarak, izole edilmiş hücre yada dokulara belirli standart mutajenik ajanların uygulanmasıyla deneysel olarak da bu mutasyonlar uyarılabilir (76-79). Kromozomlar bazen mitoz ve mayoz sırasında düzenli olarak ayrılmayabilir ve farklı kromozom sayısına sahip hücreler oluşabilir. Bu şekilde birçok genin oranı değişeceğinden dolayı kalıtsal açıdan birçok sorun (Mongolizm, Turner Sendromu, Klinefelter Sendromu vb.) oluşur (76,79,80). Bu olayda kromozomun bir parçası değil tümü yok olur yada sayıca artar. Öploidi ve anöploidi olarak iki şekli vardır (81).Eğer tüm kromozom takımının sayısında bir değişme oluyorsa, bu 'öploidi' adını alır. Kromozom takımının yarısı kadar (haploid) kromozom içeren bireyler 'monoploid', 2' den fazla katlarını içerenler ise 'poliploid' bireyler olarak isimlendirilirler. Poliploidi daha çok bitkilerde bulunur. Birçok bitki doğadaki diploid kökenli diğer bitkilerden türemiştir. Aynı gen lokusunda meydana gelecek öldürücü bir mutasyon bu şekilde diğer normal genleri taşıyan poliploid kromozomlar tarafından korunabilir (76,79-81).

Kromozomlardan birinin veya birkaçının sayıca değişmesine ise 'anöploidi' denir. Kromozom sayılarının farklı şekilde kalıtımı fenotipte birçok değişikliğe sebep olur. Bir hücredeki kromozom sayısı fenotipte büyük bir değişiklik meydana getirmeden



iki kromozomun sentromerlerde birleşmesiyle tek bir kromozoma çevrilmesi şeklinde meydana gelebilir. Anöploidinin değişik şekilleri vardır, bunlar monosomi, nullusomi ve polisomidir. Polisomi' nin ayrıca trisomi (insanda  $2n+1$  kromozomda mongolizm) ve tetrasomi (insanda  $2n+2$  kromozom) olarak iki şekli vardır (76,79-81).

Somatik anöploidi, somatik doku yada doku kültürlerinde kendiliğinden meydana gelebilir (79). Somatik hücrelerin mitozu sırasında bazı kromozomlar birbirinden ayrılmayabilir. Yavru hücrelerin birisi monosomik diğeri de trisomik oluşur. Eğer bu bozukluk erken embriyo döneminde oluşursa, ergin bireyde büyük bir bölgeyi kapsayacak şekilde anormal kromozom sayısı görülür. Embriyonun geç dönemlerine rastlarsa, etkilediği vücut bölgesi çok küçük olacağından dolayı ya hiç görülmez yada önemsiz bir şekilde kendini gösterebilir (76,79-81).

### 1.1.2. Kromozom Yapı Değişimleri

Bazen kromatitler, crossing over olmadan da parça değişimine (kazanılması yada kaybedilmesi) uğrarlar (76,79). Kromozom kırılmaları ve tekrar eşleşmeleri sonucu kromozomlar yapısal olarak tekrar organize olurlar. Bunun gibi değişimler kromozomların düzeninin değişmesine sebep olur. Bu değişimde kromozomların yapılarında farklılığa yol açar. Kromozomlardaki bu değişiklikler çeşitli şekillerde meydana gelebilir (80). Bunlar, delesyon (kromozomlarda uçtan yada aradan parça yitirilmesi), duplikasyon (kromozomun belirli bir bölgesinin çift olması), inversiyon (Kromozomun bir parçasının kopması ve  $180^0$  dönerek aynı yere eklenmesi), translokasyon (bir kromozom parçasının koparak homolog olmayan başka bir kromozoma eklenmesi) dir. Diğer bir durumda izokromozomlardır. İzokromozomlar,

mitoz sırasında bazen sentromerler enine bölündükleri için her yavru sentromer homolog kromozomların aynı taraftaki parçalarını alıp kutuplara çekilirler. Dolayısıyla kutupların bir tarafındaki genler diğer taraftakilerden farklı olmaktadır. Bunlara izokromozomlar denir (76-82).

### 1.1.3. Gen mutasyonları

Gen mutasyonları veya diğer bir deyişle 'Nokta Mutasyonları' kromozomların yapısında herhangi bir değişikliğe sebep olmaz ve mikroskopla da görülmezler. DNA da bulunan nükleotit dizisinin yada bazlarının değişmesinden ileri gelir. Baz sırasının veya AT / GC oranının değişmesi, o gene özgü enzimin tamamen kaybolmasına ya da etkisinin azalmasına neden olur. Bir gen, binlerce baz çiftinden meydana gelmiş bir birim olduğundan ve kuramsal olarak her bazda mutasyon olabileceğinden dolayı, bir genin en azından baz çifti kadar mutasyon çeşiti olabilir (76). Çok değişik biçimlerde meydana gelebilen DNA baz sıralanmasında oluşan bozukluklar birkaç grupta incelenebilir.

**1) Bir gen üzerinde tek bir baz çiftini etkileyen değişiklikler:** Bu tip mutasyonlara 'nokta mutasyonları' (point mutation ) denir. Tek bir baz çiftini etkileyen bu mutasyonlar da farklı sınıflara ayrılabilir (38,39,75-79,81):

#### **a) Bir baz çiftinin yerine başka bir baz çiftinin girmesi (base substitution):**

Bu tip değişiklikte, gen yapısındaki bir pürin yerine diğer bir pürinin (A yerine G yada G yerine A) veya bir pirimidin yerine diğer bir pirimidinin (T yerine C veya C yerine T) girmesi söz konusu olabilir. Nokta mutasyonlarının bu tipine 'geçiş' (transisyon) denir. DNA yapısında bir pürin yerine bir pirimidin (A veya G yerine T veya C' nin geçmesi

yada bunun tersi) geçmesi de mümkündür. Bu tip mutasyonlara da 'çapraz geçiş' (transversiyon) denir (38,39,75-81).

Nokta mutasyonu oluşturan bromüraçil, nitrikasit, formalin, hardal gazı gibi kimyasal maddeler, DNA' daki özel bazlarla tepkimeye girer ve onların yapısını değiştirir. Bromüraçil (BU), DNA' da timin yerine geçer; fakat adeninden çok guaninle bağ yapma eğilimindedir. Daha sonraki DNA replikasyonlarında normal timinin bulunması gereken yerin karşısında adenin yerine guanin bulunduğundan dolayı G-C ikizi meydana gelir ve A-T yerine G-C geçer ve bir mutasyon meydana gelmiş olur. DNA' da bazların yerine geçen bu kimyasallara (BU gibi) 'baz analogları' denir. Ayrıca nadir de olsa iki pirimidinin ve pürinin birleşerek A-G ve C-T baz çiftlerini meydana getirmesi; daha sonraki DNA replikasyonlarında A-T ve G-C ye dönüşmesine neden olur (75,76). DNA kalıp olarak görev yaptığı sırada bazların herhangi birinde oluşabilecek 'tautomerik' bir değişikliğin, (örneğin, timin'nin 'keto' formundan 'enol' formuna yada adenin'in 'amino' formundan 'imino' formuna değişmesi) moleküllerin hidrojen bağı oluşturma özelliklerini de değiştirmesi nedeniyle, timinin guaninle veya adeninin sitozinle çiftler oluşturması olanağı daima vardır (75-76).

DNA molekülünün, bir protein için olan kodlarının bir parçasında eğer bir bazın yerine bir başka baz geçerse, bu genin transkripsiyonu sonucu oluşacak mRNA' nın yapısına hatalı bir baz katılacaktır ve sonuçta DNA' da yer değiştiren bazlar protein sentezinde yer değiştiren aminoasitlerle sonlanır. Bu mutasyona 'yanlış anlamlı mutasyon' denir. Bazende yer değiştiren bazların etkisi sonucu mRNA molekülünün ortasında bir stop (anlamsız) kodonun meydana gelmesiyle fonksiyonel bir proteinin

sentezi engellenebilir ve proteinin yalnızca bir fragmenti sentezlenmiş olur. böyle mutasyonlara 'anlamsız mutasyon' denir (38,39).

**b) Gendeki bir bazın aradan çıkması veya yeni bir baz çiftinin yapıya girmesi:** DNA molekülü içinde bir nükleotid' in yapıdan ayrılmasına 'delesyon', yapıya katılmasına 'insersiyon' denir. Örneğin; benzopiren, endüstriyel baca kurumları, sigara katranı ve aflatoksin, besinlerde ve hayvansal ürünlerde bulunmuştur. Bu maddeler DNA' dan baz çıkarır yada DNA' ya baz ekleyerek nokta mutasyonuna sebep olurlar. Nokta mutasyonu geçirmiş bir genin kontrolünde olan bir polipeptit zincirindeki aminoasit sıralanması, söz konusu bölgeden sonra tamamen değişecektir. Böyle bir değişiklik, sentezlenen protein molekülünün yapısının ve bazı fonksiyonlarının tümüyle bozulması sonucunu doğurur (75).

**2) Gende birden fazla baz çiftini ilgilendiren değişiklikler:** Bir başka baz çifti mutasyonları da 'çerçeve kayması mutasyonları' (frameshift mutation) dır. Burada bir yada birden çok nükleotit çiftleri DNA' dan kopar (delesyon) yada DNA' ya eklenir. (insersiyon). Bu durum ise okunan çerçevenin translasyonunu değiştirir. Böylece translasyon sırasında tRNA' ların tanıdığı üçlü baz dizileri değişir. Örneğin, bir genin ortasına bir nükleotit çifti' nin girmesi, bu bölgeden aşağıda (down stream) birçok aminoasitte değişikliğe yol açar. Çerçeve kayması mutasyonlarında hemen hemen her zaman uzun mesafede yanlış anlamlı ve inaktif protein üretilir yada en sonunda bir anlamsız kodonun translasyonu sonlandırması ile protein sentezi durdurulabilir (38,39,78,79).

## 1.2. Mutasyonların Genetik Çalışmalarda Kullanımı

Mutasyonlar, genetik analizler için çok faydalıdır (79), dolayısıyla biyolojik proseslerin oluşum mekanizmalarının açıklanabilmesi için mutasyonlar yoğun biçimde kullanılmışlardır. Metabolizma, çok sayıda enzimin katalize ettiği reaksiyon zincirleri aracılığı ile gerçekleşir. Söz konusu enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar, DNA izole edilerek ve inceleyerek, oluşum yolundaki aşamalar zinciri genellikle belirlenebilir. Uygun bir mutasyon, tek bir polipeptidin aktivitesini elemine ettiği için mutasyonlar biyolojik proseslerin ayrıntılı bir biçimde incelenmesi için son derece güçlü bir araçtır (83).

Mutasyonlarla ilgili herhangi bir ayırımın ilk evresi mutant izolasyonudur. Belirli bir organizmanın bilinen bir karakteri ile ilgili çalışmada, bu karakter bakımından seçici ortam oluşturularak mutantların ayrılması sağlanır ve mutant karakterlerin fonksiyonu besi ortamına ilave edilerek biyolojik süreçte özgül hücrel etkiler gözlenebilir (84).

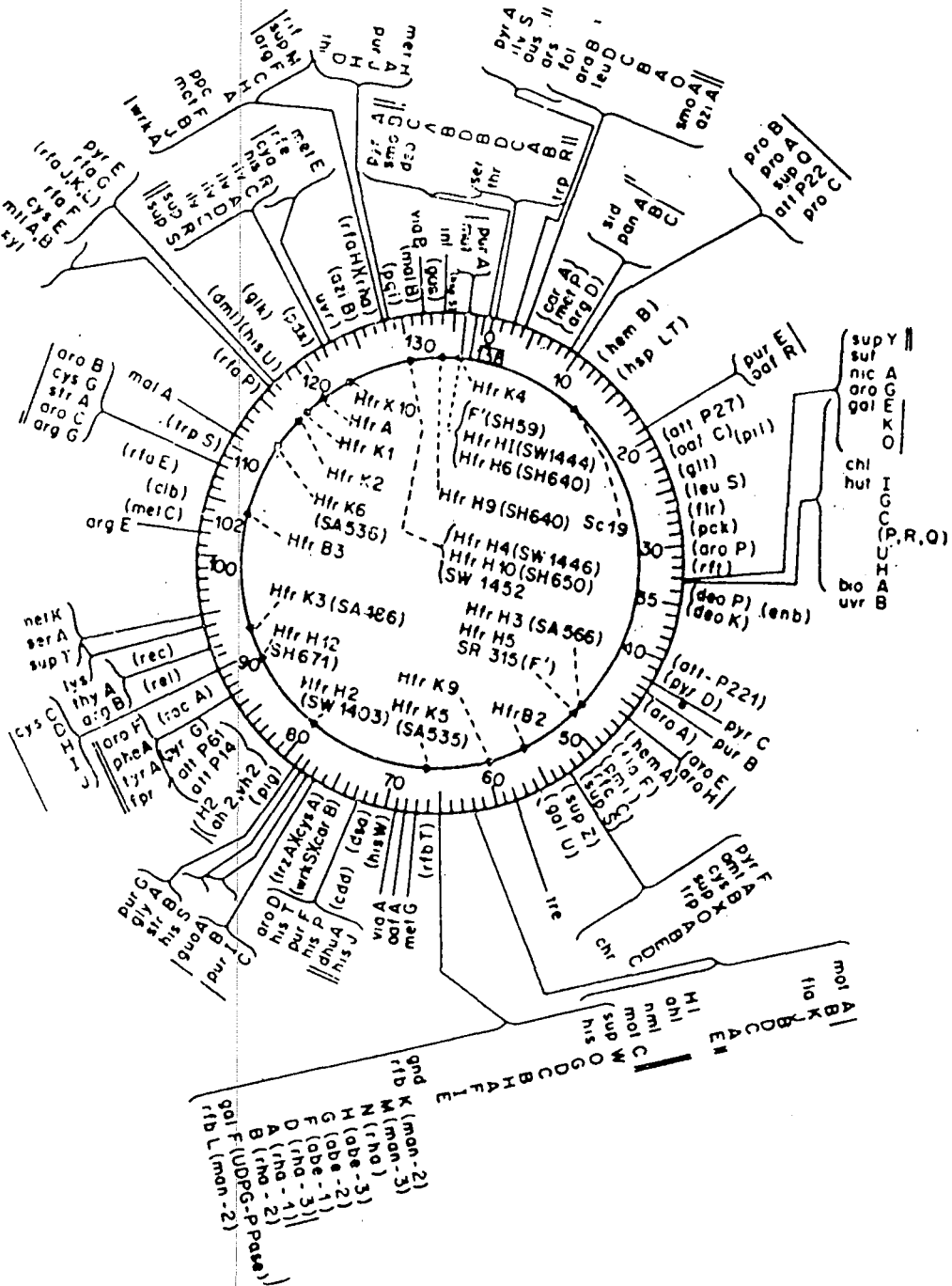
Mutajenik ajanlar mutasyon ayırımıyla uğraşan genetikçiler için güçlü araçlardır. Bu gibi araştırmalarda kullanılan mutajenler ile istenilen tipte mutasyonlar yönlendirilebilir. Bu şekilde mutajenlerle muamele edilerek mutant soylar oluşturulan türlerden bazıları şunlardır; *Neurospora*, *E.coli*, *Salmonella*, *Saccharomyces*, çeşitli bakteriyofajlar, *Drosophila* türleri vb. (79), ayrıca yüksek yapılı bitki ve hayvanlar da bu amaçla kullanılabilir (79,83,84). Mutasyon çalışmalarında transpozisibil elementler de kullanılmaya başlanmıştır. Bu elementler genom içinde bir pozisyondan diğerine hareket ederler ve kromozom kopması gibi genetiksel değişikliklere (mutasyonlara) yol açarlar Bir transpozisibil elementin bir gen içine aktarılmasıyla

oluşturulmuş mutasyonlarda, bu elementler lokal işaret olarak iş görürler. Bu işaretler yardımı ile mutant genler kolayca tespit edilebilirler (74, 79,83,84).

### 1.2.1. Salmonella typhimurium' un genetik özellikleri

Bakteri mutantları, bakteri genetiğinin en önemli ve vazgeçilmez araçlarıdır. Mutajenik madde ve etkenleri kullanarak mutant izole etme şansı arttırılabilir. Bazı etkenlerle, bakteri genlerinin %1' inde bakterinin canlılığını etkilemeyen mutasyonlar oluşturulabilir ve bazı mutajenler kullanılarak  $10^{-5}$ - $10^{-10}$  kadar olan spontan mutasyon oranı %3' e kadar yükseltilebilir. Bilinen mutajenlerin hiç biri diğer genlerin mutasyon oranını arttırmaksızın belirli bir genin mutasyon oranını yükseltmezler. Fakat bazen bazı seyrek DNA bölgelerinin mutasyon oranları diğer genlere göre çok yüksek olabilir. Bu bölgelere 'hot spots' (sıcak bölgeler) denir. Bazı mutajen maddeler bu bölgeleri spesifik biçimde etkilemektedir (38,39,74-81).

S. typhimurium' un çembersel DNA' sı Şekil 1.1. de görülmektedir.



Şekil 1.1. *S. typhimurium*' un çembersel gen bağlantısı haritası (Kaynak 75' den)

Yapılan bu çalışmada kullanılan bakterilerinin genotip özellikleri aşağıdaki tabloda gösterilmektedir.

Tablo 1.1. Mutajenite testinde kullanılan *Salmonella typhimuriumun* mutanat suşlarının taşıdıkları genotip özellikleri.

Mutant suşlar	Histidin Mutasyonu	Lipopolisakkarit LPS	DNA Onarım	R-faktör	Mutasyon bölgeleri
TA97	HisD6610	Rfa	DuvrB	+	CCC'nin +4 yakınında
TA98	HisD3052	Rfa	DuvrB	+	C' nin -1 yakınında

**His D6610:** Histidinol dehidrogenaz enzimini kodlamaktadır, his D6610 tipi mutasyon, His D<sup>+</sup> geninden kodlanan bu enzimde meydana gelen bir mutasyondur, mutasyon bölgesinde 6 sitozinin birikmesine neden olan sitozin fazlalığı vardır. Bu sebeple çerçeve kayması tipinde bir mutasyondur ve çerçeve kayması mutajenlerin teşhisinde kullanılır. Birikmiş sitozinlerin yakınında birbirini takip eden -G-C- baz çiftlerinin oluşturduğu, bir ikinci sorumlu bölge' ye de sahiptir. Bu mutasyon tipine sahip olan TA97 suşu, TA1537 ile hemen hemen aynı genetik özelliğe sahiptir ve bu suştan geliştirilmiştir. Fakat ilave olarak pKM101 plazmidi içerdiği için, çerçeve kayması mutajenlerine karşı daha hassas hale gelmiştir (6,33,37,55,63,65,68,70).

**His D3052:** His D<sup>+</sup> geninde meydana gelen (-1) çerçeve kayması şeklinde bir mutasyondur ve nükleotid eksikliği His D-geni içinde 8 defa tekrarlanan

-GCGCGCGCGC-

-CGCGCGCGCG- bölgesindedir.



Bu nedenle TA 98 daha çok çerçeve kayması tipi mutasyonlara sebep olan mutajenik/kanserojenik kimyasallarla his<sup>+</sup> hale dönüştürülür (6,33,37,55,63,65,68,70).

**Rfa:** Bu mutasyon bakterilerin yüzey tabakasındaki lipopolisakkarid duvarda kısmi hasara sebep olur ve normal hücre duvarından geçemeyen büyük moleküllere karşı geçirgenliği artırır (6,33,37,55,63,65,68,70).

**uvrB:** Bu mutasyon, DNA kesme onarma sistemi için kodlanan bir genin delesyonuna neden olur, sonuçta bir çok mutajenin teşhisinde duyarlılık son derece artmış olur. *uvrB*<sup>+</sup> içinde normalde, *chl* (nitrat redüktaz enzimini kodlayan genidir) ve *bio* (biyotin sentezinden sorumlu bir enzimi kodlar) genleri de bulunur fakat  $\Delta$ *uvrB* geni' nin delesyonu sırasında istenmeden *chl* ve *bio* genleride çıkarılmış olur. Bu sebepten dolayı bakteri gelişmesi için biyotine' de ihtiyaç duyar. (6,33,37,55,63,65,68,70).

**R faktör (+) :** pKM101 ampisilin dirençlilik geni taşıyan, hücrede çok sayıda bulunan bir plazmid' dir. Bu plazmidin hücrede bulunuşu, bu hücrelerde normalde bulunan, hata frekansı yüksek olan error- prone DNA onarım mekanizmasını aktif hale getirir. Bu nedenle de kimyasalların etkisi ile veya spontan olarak mutasyonların artmasına neden olur (6,33,37,55,63,65,68,70)

### 1.3. Mutasyon Oluşturan Faktörler (Mutajenler)

Temel olarak mutasyon oluşturabilen faktörler üç ayrı grupta; fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere sınıflandırılabilir.

**Fiziksel etmenler** arasında ultra viyole (UV) ve X ışınları sayılabilir. DNA molekülleri 250-260nm olan UV ışınlarını spesifik olarak absorbe eder. Bu ışınlara

maruz kalan DNA moleküllerinde mutasyonlar oluşur. UV ışınlarından daha çok pirimidin (timin ve sitozin) bazlarının etkilendiği görülmüştür. X ışınlarının da UV'nin etkisine benzer bir etkiyle mutasyona sebep olduğu bilinmektedir (74-79).

**Biyolojik mutajenler** olarak virüsler ve transpozisibil elementler bilinmektedir. Virüs genomu konak hücrelerin DNA'sına girdiğinde kendi DNA'sından da bazı genleri konak DNA'ya aktarmakta veya ayrılırken beraberinde bir parçayı da götürmektedir. Bu da konak DNA'nın genetik yapısını değiştirdiğinden dolayı bir mutasyon olarak kabul edilebilir (39,74-80). Çok çeşitli organizmalarda çeşitli mutasyonlardan meydana gelmesinden transpozisibil elementlerin sorumlu oldukları hakkındaki şüpheler artmaktadır. Bu elementler genom içinde bir pozisyondan diğerine hareket ederler ve kromozom kopması gibi genetiksel değişikliklere yol açarlar. Bazen bu elementler DNA molekülleri arasında rekombinasyona aracılık ederler. Bir transpozisibil element bir kromozoma girerken o kromozoma farklı bir parça ekleyebileceği gibi, oradan bir parçayı da alıp başka kromozomlara ekleyebilir. Bu elementlerin önemi; rekombinasyon çalışmalarında özel bazı elementlerin transpozisyonunu uyararak doğal mutasyon oranını artırılabilir. Bir transpozisibil elementin bir gen içine aktarılmasıyla oluşturulmuş mutasyonlarda, bu elementler bir 'landmark' (lokal işaret) olarak iş görürler. Bu genler ise 'etiketlenmiş genler' olarak adlandırılırlar. Bu işaretler yardımı ile mutant genler kolayca tespit edilebilirler (74,79,84).

**Kimyasal mutajenler:** Etki biçimlerine göre 5 alt grupta incelenebilir.

**1. Baz analogları:** Bu moleküllerin, molekül yapıları nükleik asitlerdeki pürin ve pirimidin bazlarına çok benzerler. Bu sebeple bu maddelerin mutajenik etkileri DNA

replikasyonlarında oluşan kimyasal değişim olarak gözlenebilir. DNA replikasyonu sırasında, zincire eklenecek normal bazların yerine baz analoglarının eklenmesi, DNA yapısında bulunan hidrojen atomlarında pozisyon değişikliği sebebiyle çok sayıda yanlış eşleşmiş bazın oluşumu ile sonlanır. En çok bilinen baz analoglarından birisi bir timin analogu olan 5-Bromo-urasil (BU)' dir. DNA molekülünde timin gibi davranarak adenin bazlarının karşısına bağlanır. Bu mutasyon tipine 'transisyon' denir.

Bir diğeri ise adenin analogu olan 2-aminopurin olup, hemen hemen aynı mekanizmayla DNA' da mutasyon oluşturur. Amino formda iken timinle eşleşir. Nadiren imino formda olur ve sitozinle eşleşerek A-T çiftlerinin olacağı yerde AP-C çiftleri oluşur. İkinci bir replikasyonda ise G-C çiftleri, A-T çiftleri ile yer değiştirir. Baz analogları bakteri kültürlerine ilave edildiğinde sentezlenen DNA' nın yapısına girerler ve ilk replikasyonda çift yönlü transisyona neden olurlar (38,39,75,77,80).

**2. DNA' da baz değiştiren maddeler:** Bu moleküller dinlenme halindeki DNA' nın yapısına girerek bazlarını değiştirirler. En önemlileri Nitröz asiti (HNO<sub>2</sub>)' dir. Doğrudan doğruya DNA bazlarında amino gruplarını çıkarırlar ( deamine eder) ve baz sırasını değiştirirler. Örneğin; böyle bir etki adenini hipoksantine çevirebilir. Hipoksantin sitozinle özgül olarak bağlanır. İlk replikesyonda sitozin bazları guaninle eşleşeceğinden A-T çiftleri yerine G-C çiftleri gelecektir. Nitröz asiti adenin ve sitozin üzerine çift yönlü transisyon şeklindedir. Hidroksilamin ise sadece sitozin üzerine spesifiktir. Sitozini sadece adenin ile eşleşecek şekilde değiştirerek, A-C çiftlerinin oluşumuna neden olur. Sonraki replikasyonda adenin, timinle bağ yapacağından G-C çiftleri yerine A-T çiftleri gelir (38,39,75,77,80).

**3. DNA' dan baz çıkararak maddeler:** En önemlileri alkilleyici maddelerdir.

Kükürt, nitrojen mustard, etilenoksit ve daha az toksik olan etil-metan-sülfonat (EMS) bu gruba girer. Alkilleyici maddeler spesifik olarak guaninin N7 pozisyonunu etkiler. Bu etki sonucu DNA' daki deoksiriboz bağı gevşer ve 7-alkil guanin DNA' dan ayrılır. Sonuçta, DNA' da oluşan pürin boşluğuna 4 bazdan herhangi birisi gelebilir. Hem transisyon hemde transversiyon tipi mutasyon görülür (38,39,75,77,80).

**4. Akridin boyaları:** Bu maddeler genellikle C-G...A-T veya A-T...T-A şeklinde transversiyonlara yol açar. Akridin mutasyonları diğer transversiyon mutasyonlarından farklı olarak daima gen fonksiyonlarının tümüyle kaybolmasına yol açar. Birden fazla baz çifti içeren DNA segmenti gen yapısından çıkar (delesyon) yada uzun DNA segmentleri gen yapısına girer (insersiyon). Akridin boyalarının mutasyona yol açtıkları noktalar DNA üzerinde gelişmiş güzel dağılmıştır ve bu noktalara 'hot spots' (sıcak noktalar) denir (38,39,75,77,80).

**5. S.O.S. bağımlı mutajenler:** Bazı mutajen olan kimyasallar etkilerini S.O.S. onarım sistemini kullanarak gösterirler. Bu maddelere 'S.O.S. bağımlı mutajenler' denir. Bunlara 4-nitro kuinolin, benzo (a) piren, aflotoksin, UV ışığı örnek verilebilir. Mutajenler birden fazla bazı etkilediğinde yanlış eşleşen bazların miktarı artacağı için replikasyon engellenecektir. Bunu engellemek için S.O.S yolunun uyarılması gerekir (83). Araştırmacılar, bitkilerden izole edilen bitki ekstraktlarının antimutajen olup olmadığını S.O.S yöntemi ile araştırmışlar, sonuç olarak S.O.S' i baskıladığı düşünülen kimyasal maddelerin, S.O.S aktivitesi sonucu meydana gelebilecek mutasyonları engellediği ve ya azaltıldığı, YE' nin (yucca ekstraktı) S.O.S de aktivite gösteren umu genini baskılayarak mutasyonu azalttığı tespit edilmiştir (64).

#### 1.4. Metabolik Aktivasyon

Metabolizma, yaşam için gerekli olan ve organizmada meydana gelen bütün kimyasal reaksiyonlar olarak tanımlanabilir (21). Organizmaya yabancı olan kimyasal maddelere 'ksenobiyotik' adı verilir. Bunların organizmadaki kimyasal değişimlerine de metabolizma denmektedir fakat 'Biyotransformasyon' bu anlamda daha uygun bir terim olarak kullanılmaktadır (21).

Metabolizma'nın amacı, ilaçların daha az toksik hale dönüşmesi (detoksifikasyon = zehirsizleştirme) ve organizmadan kısa sürede atılmasıdır. Bu da daha polar bileşiklerin oluşmasıyla yani biyotransformasyon ile mümkündür (16,18,40,45,84,85). Biyotransformasyon, ilaç etkisinin ortadan kalkması, toksisitenin azalması ve ilacın vücuttan daha kolay atılması olaylarını gerçekleştirir (84,85). Buna rağmen ilaç metabolizma reaksiyonları sadece zehirsizlenme değildir, çünkü bazı ilaçların biyolojik aktivitesi metabolitinde de görülmektedir ve bunlara 'aktif metabolit' denir. Bu bileşikler bazı durumlarda değişik etkiye sahip bir yapıya çevrilebilmektedir. Kendileri inaktif olup biyotransformasyon sonucu etkili metabolite dönüştürülen ilaçlara 'Ön ilaç' (prodrug) denir ve prontosil, kloro guanid, klormezanon, kloramfenikol palmitat bunlara örnek olarak verilebilir (86,87).

Bazı bileşiklerin oluşan metabolitleri toksik etki gösterebilir. Örneğin; organizmada dapson, N-hidroksidapson' u oluşturmakta ve bu metabolit methemoglobinemi' ye sebep olmaktadır. Çoğu aromatik aminler özellikle azoamino boyalar karsinojenik etkiye sahiptir. Bunlar arasında tereyağı sarısı olarak bilinen p-dimetilaminoazobenzen boya maddesi, farelerin diyetine katıldığında karaciğer

tümörlerinin oluştuğu ve onkojenik etkiden N-hidroksi metabolitinin sorumlu olduğu bildirilmektedir (86).

İnsanlar, endüstriyel ve çevresel ksenobiyotiklerin sürekli olarak etkisinde kalmaktadır. Örneğin çevremizdeki sulara bulunan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), dioksinler, alkilitin bileşikler, kimya endüstrilerinin her geçen gün artan ürünlerinden deterjanlar, pestisitler, insektisitler, kozmetik ürünleri, tekstil boyaları, nitrozamin ve aflatoxin gibi bileşikler, besinlerle alınan boyalar, antioksidanlar, insektisit ve fungusit artıkları, sigara dumanı, tütülenmiş gıdalar, yakma işlemiyle oluşan polisiklik hidrokarbonlar, (benzo[a]piren,7,12-dimetil[a]antrasen), hava kirliliği ile alınan bileşikler, farmakolojik ürünler olan ilaçlar vücudumuza yabancıdır (ksenobiyotik) ve reaksiyonlar zinciriyle metabolite edilmeye (zehirsizleştirilmeye) çalışılırlar (4,16,18,40,45,47,68,86,87).

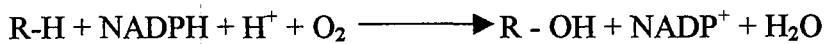
İlaçların metabolizması, en fazla çeşit ve miktarlarda enzim içermesi nedeniyle, esas olarak karaciğer hücreleri içerisinde olur. Ayrıca akciğer, böbrek, gastrointestinal mukoza, barsak lümenindeki mikroflora ve daha az ölçüde olmak üzere hemen hemen bütün dokular içerdikleri enzimlerle ilaç metabolizmasına katkıda bulunurlar. Az sayıda ilaç (atraküryum, penisilin G ve bir ön ilaç olan dipiron gibi) non-enzimatik yıkılmaya uğrarlar. Oksidasyon olaylarının çoğu karaciğer hücresinin mikrozomal enzimleri tarafından yapılır (86-88).

Enzimatik olay türleri 'birinci faz reaksiyonlar' ve 'ikinci faz reaksiyonlar' diye iki ana gruba ayrılırlar. Birinci fazda, ilaç molekülünde oksitlenme, indirgenme veya hidroliz (kopma) sonucu polar bir grup oluşur. İkinci fazda, değişmeden kalan ilaç yada birinci fazda oluşan metabolitler konjugasyon denilen özel sentez reaksiyonları

sayesinde endojen bir madde ile (glukuronik asit, sülfat veya metil grubu gibi) birleştirilerek, suda fazla çözünen konjugat metabolitlerine dönüştürülürler (87). Bazı ilaçların oksidasyonları, mikrozomal olmayan oksidazlar tarafından yapılır. Bunlar arasında monoamin oksidaz (MAO), diamin oksidaz (histaminaz), ksantin oksidaz vb. enzimler bulunur. Bunlardan en yaygın bulunanı MAO' dur (86,87).

#### 1.4.1. Mikrozomal enzimler

Karaciğerde endoplazmik retikulumda, ilaç metabolize edici 'mikrozomal enzim sistemi' vardır. Bunlar hücrede endoplazmik retikulumun düz kısmında bulunur. İn vitro enzim incelemeleri için hücre homojenize edilirken ER membranı 'mikrozom' denilen kürecikler halinedönüşür. Mikrozomal enzim sistemine, sitokrom P450' ye bağımlı 'karma fonksiyonlu oksidazlar' (monooksidazlar) da denir. Bu enzim sistemi peroksidazların tersine O<sub>2</sub> molekülünün yalnız 1 atomunun substrat içine eklenmesini sağlar, öteki atom suya indirgenir. Bu olayın kimyasal reaksiyonu şu şekilde gösterilebilir (45,86-89).



Karma fonksiyonlu oksidaz enzim sistemi içinde bulunan en önemli enzim, 1 oksijen atomunu RH substratına ileten, bir hem protein olan sitokrom P-450 enzimleridir. Mikrozomal enzim sisteminin diğer önemli bir komplementeri, bir flavo protein olan NADPH-sitokrom P-450 redüktaz ve NADPH' den sitokrom P-450 ye elektron taşıyan bir lipid' dir (sitokrom-b5).

Oksidasyon reaksiyonlarında sitokrom P-450' nin rolü şöyledir: İlk aşamada sitokrom P-450 (Fe<sup>+3</sup>) ile substrat (R-H) arasında bir kompleks oluşur. Bunu, NADPH

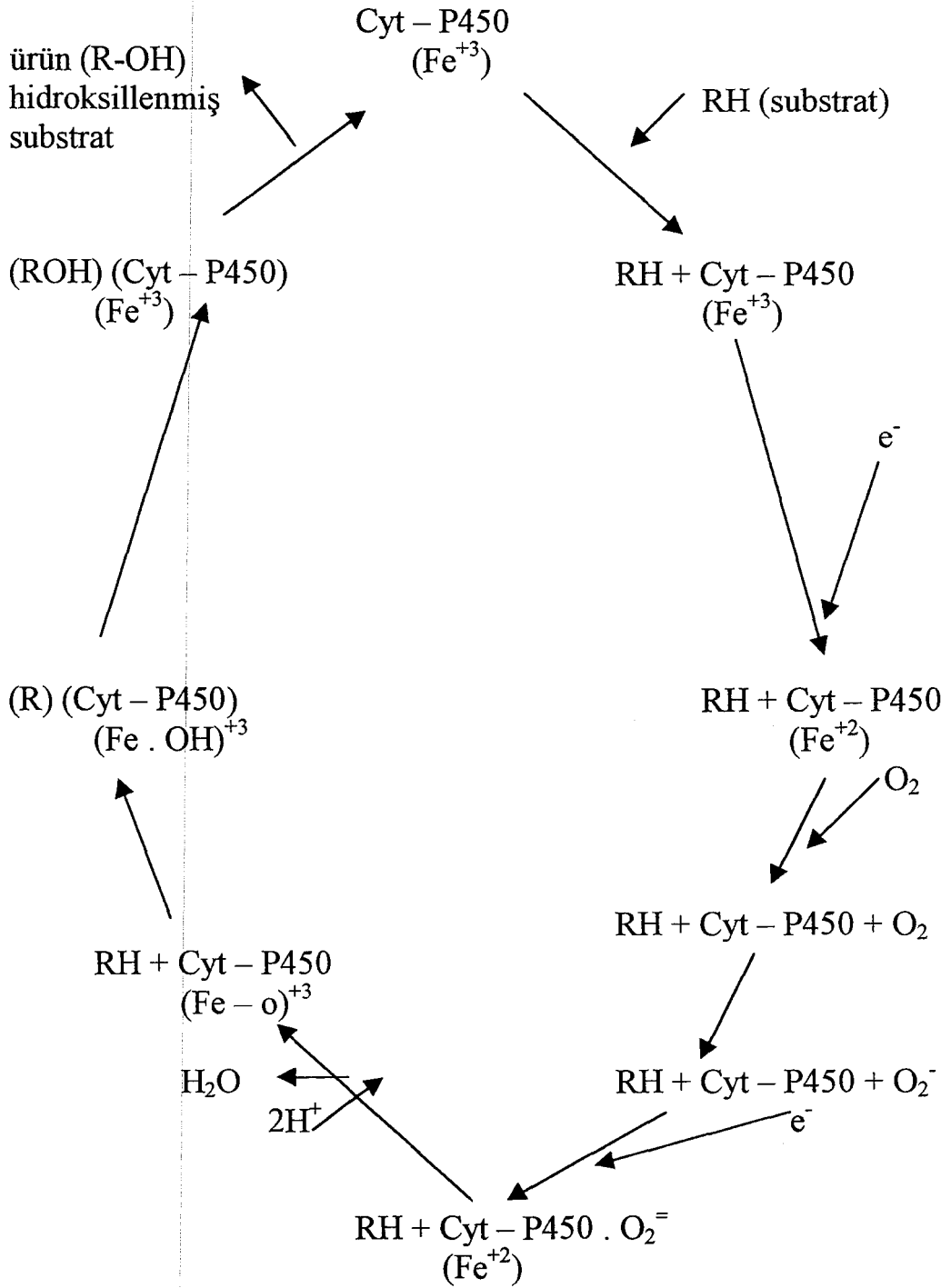
H<sup>+</sup> dan bir elektron kopmasıyla Fe<sup>+3</sup>'ün Fe<sup>+2</sup>'ye dönüşmesi izlemektedir. Bir kademe sonra sisteme O<sub>2</sub> molekülü karışır. P-450 Fe<sup>+2</sup> O<sub>2</sub> haline dönüşür. Bir kademe sonra bir elektron daha girer. Bu elektronun nereden geldiği tam olarak bilinmemektedir. Substrat hidroksile edilerek ayrılır, sistemden bir molekül su çıkar, P-450 (Fe<sup>+3</sup>) halinde yeni bir reaksiyonda kullanılmak üzere değişmeden ayrılır (86-89).

Substrat ilaçlar enzimin 'hem' kısmının Fe<sup>+++</sup> iyonuna bağlanırlar. Mikrosomal sitokrom P450 enzimleri tarafından yapılan ilaç metabolizması olayları şunlardır (87):

- a) Aromatik halkanın hidroksillenmesi
- b) Alifatik hidroksilasyon
- c) Diğer hidroksilasyon olayları
- d) N-dealkilasyon, O-dealkilasyon, S-dealkilasyon
- e) Desülfürasyon (kükürtsüzlenme)
- f) (-Metilli aminlerin oksidatif deaminasyonu)
- g) S-oksidasyon (sülfoksid oluşumu)
- h) N-oksidasyon ve N- hidroksilasyon

Sitokrom P-450 karaciğerin endoplazmik retikulum (ER) membranlarında (mikrozomal fraksiyon) en yüksek miktarlarda bulunur. Bu membranda bulunan toplam protein içeriğinin %20'si kadardır. Sitokrom P-450 molekülünün, çeşitli ilaçlar ve diğer ksenobiyotiklere etkili olabilen, geniş substrat özgünlüğüne sahip en az 6 türü vardır. Bu türlerden biri olan sitokrom P-448, Polisiklik Aromatik Hidrokarbonların (PAH) ve benzer moleküllerin metabolizması için özgüldür. Bu sebeple bu enzim Aromatik Hidrokarbon Hidroksilazlar (AHH) olarak adlandırılırlar (16,22,40,45,86-90).



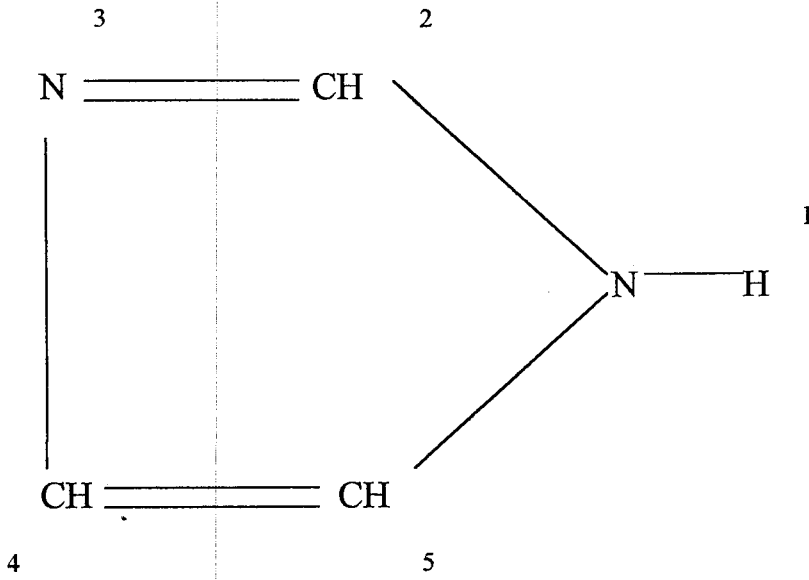


Şekil 1.2. Sitokrom P450 tarafından substratın hidroksilasyonu (Kaynak 85' den).

## 1.5. İmidazol ve Fenantro İmidazol' ün Yapı ve Aktiviteleri

### 1.5.1. İmidazol'ün Sentezi ve biyolojik aktiviteleri

İmidazol'ün sentezi: İmidazol e.n. 90 °C, k.n. 256 °C olan bir bileşiktir. Glioksal, formaldehid ve amonyaktan elde edilir (Şekil 1. 2). Bu reaksiyonlarda glioksal yerine disübstitüe türevlerinin, formaldehit yerine de başka bir aldehid'in kullanılması ile çeşitli imidazol türevleri elde edilir (22,91). Bunlar nispeten suda çözünmezler, fakat DMSO, kloroform, polietilen, glikol ve polietiloksilat, kastor yağı gibi organik çözücülerde çözünürler (22,92).



Şekil 1.3. İmidazolün genel formülü

**Biyolojik aktiviteleri:** İmidazol, birçok kompleks organik bileşiğin yapısında olduğu gibi basit bir heterosiklik moleküldür. Bu madde, suda kolay çözülür ve ağız yoluyla alındığında, gastrointestinal yoldan 'hidantoin' ve daha sonrada 'hidantoikasit' oluşur. Hidantoin, hidantoikasit ve değişmeden kalan imidazol, üre ile birlikte dışarı atılır. Bakteriyal metabolizma sonucunda imidazol'den N-asetil imidazol oluşur. İmidazol' ün pKa değeri 7 civarındadır. Bu özellik, imidazole fizyolojik PH

seviyelerinde hem proton alıcısı hem de vericisi olma niteliği kazandırmaktadır. İmidazol düşük akut toksisiteye sahiptir ve fare de oral LD50 değeri 1.88 g/kg olduğu rapor edilmiştir (14).

İmidazol yapısına; vitaminlerde, hormonlarda ve nükleikasit yapısına giren bazlarda doğal olarak rastlandığı gibi çoğu bitkilerde alkaloid yapısına girerek bitkiyi olumsuz koşullara karşı korumayı da sağlamaktadır (22,91,92). Önemli bir imidazol türevi, hayat için gerekli bir aminoasit olan histidin (4-imidazolilalanin)' dir. Bunun dekarboksilasyonu ile vücuttaki çeşitli dokularda ve organlarda bulunan 'histamin' oluşur (14). Çeşitli hayvan ve bitki türleri histamin (4-imidazoliletilamin) sentezleme yeteneğindedir. Histamin'in çeşitli fizyolojik olaylar ile allerji gibi patolojik olaylarda rol oynadığı gösterilmiştir. Sindirim yoluyla alınmayıp da vücuda enjekte edildiğinde çok zehirlidir. Bundan dolayı vücutta proteinlerle beraber kombine halde bulunması gerekir (91-94).

İmidazoller geniş spektrumlu fungistatik ilaçlardır. Antihelmantik olarak da uzun yıllar kullanılmıştır. Cilt ve mukozaların mantar enfeksiyonlarında diğer ilaçlara göre üstünlük gösterirler. İmidazol türevi antifungal ilaçlar, mantar hücrelerinin sitoplazma membranındaki ana sterol bileşiği olan ergosterol' ün sentezini, 14-metilanosterol' ün desmetildihidrol-anosterol' a dönüşümü katalize eden 14  $\alpha$ -dimetilaz enzimi mikrozomal P450 stokromuna bağımlıdır. İmidazol türevi ilaçlar P450 stokromunu özgül olarak inhibe eder. Mantarların P-450 sitokromu bu tür ilaçlara, memelilerin bu enzimlerine oranla en az 1000 kez daha duyarlıdır (22,87).

İmidazol' ün biyolojik aktivitesi ile ilgili yapılmış çalışmalardan bazıları şunlardır. Vikse ve arkadaşları (57), pişirilmiş et ve balıklarda bulunan heterosiklik

aminlerden olan 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f] quinolin (IQ) bileşiğinin mutajenik aktivitesini Ames testi ile araştırmışlar ve çeşitli pozisyonlarında pridin N atomu içeren IQ bileşiklerinin tüm pozisyonlarının Salmonella üzerine yüksek mutajen etki gösterdiğini bulmuşlardır. Bu maddelerin DNA' ya bağlanmaları, sitokrom P450 enzimlerinin hidrosillemesi sonucunda gerçekleşmektedir.

Benzer bir çalışmada, pişirilmiş besinlerden izole edilebilen 2-amino-6-metildiprido[1,2-a:3,2-d] imidazol (Glu-P-1), 2-amino-3-dimetilimidazo[4,5-f] quinolin (IQ), 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-f] quinolin (MeIQ) ve daha birçok heterosiklik aminlerin mutajenik aktiviteleri, bakteriler ve transgenik kemirgenlerde in vivo mutajenik testler karşılaştırılarak araştırılmış ve sonuçta, saydığımız bileşiklerin bakteriyal test sistemlerinde daha mutajenik sonuçlar verdikleri Josephy ve arkadaşları (18) tarafından bulunmuştur. Bu bileşiklere çeşitli şekillerde maruz kalındığında, bir dizi biyokimyasal mekanizma sonucu mutajen ve kanserojen etki oluşturduğu ve S.O.S. sistemin *umu* genleri'ni uyararak DNA hasarlarına yol açtıkları görülmüştür.

Forster ve arkadaşları tarafından (14), imidazol ve onun metabolitleri olan hidantoin, hidantoik asit ve bakteri metabolizması sonucu oluşan bir metabolit ürün olan N-asetil-imidazol, hücre kültüründeki UDS yönteminde, transformasyon yönteminde ve Ames yönteminde test edilmiş ve sonuç olarak imidazol ve onun metabolit ürünlerinin her üç testte de negatif sonuçlar verdiği rapor edilmiştir.

Bir başka çalışmada ise oksidatif tip (renk açıcı) saç boyaları ve pestisitlerin formüllerinde bulunan ve fungusit yapımında kullanılan, fenilendiamin' in çeşitli bileşiklerle reaksiyonu sonucu oluşan, metil [1-[(butilamino) karbonil]-1H-benzimidazol-2-yl]karbamet ve metil 2-benzimidazol karbamet bileşikleri *Salmonella'*

nın çeşitli suşları ile ve bitkisel metabolik aktivasyon solusyonu (*Nicotinia tobako* bitkisinden hazırlanmış) varlığında test edilmiştir.. Sonuç olarak bu bileşikleri içeren saç boyaları, pestisit ve fungusitlerin hammaddelerinin bakterilerde yüksek mutajenik etkiye sahip oldukları görülmüştür (68).

Debnath ve arkadaşları, 30 adet imidazol türevi nitro bileşiklerinin ve içerdikleri nitro gruplarının metabolik aktivasyon sonucunda DNA' ya bağlanma affinitelerinin arttığını ve mutasyona sebep olduklarını bulmuşlar (73).

Bir methimidazol türevi *Salmonella'* nın iki suşu (TA 98 ve 100) kullanılarak bir deniz midyesi olan *Mytilus galloprovincialis'* den hazırlanan S9 fraksiyonu varlığında Britvic ve arkadaşları (47) tarafından test edilmiş. Sonuç olarak methimidazol türevinin TA 98 suşunda yüksek mutajenik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur.

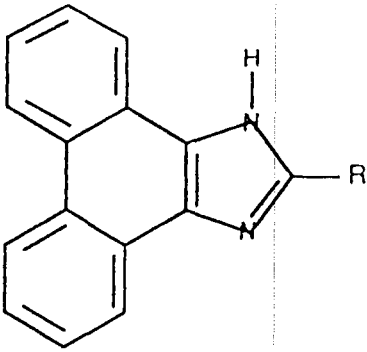
Başka bir çalışmada' da aneorobik bakteri ve protozoalar üzerinde etkili olduğu bilinen 5-nitro imidazol türevi ilaç olan metronidazol (MNZ) ve tinidazol (TNZ), *Salmonella'* nın TA ve YG suşları ile test edilmiş ve MNZ ve TNZ' nin benzer yüksek mutajenik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur (66).

Ayrıca bazı imidazol türevleri (IQ, MeIQ, PhIP ve aflatoksin B1(AFB1) gibi) pozitif mutajen olarak kullanılarak, bazı moleküllerin antimutajenik etkisi Ames testi ile araştırılmıştır. Çeşitli imidazol' ler ile uyarılan mutajenik aktiviteyi besin koruyucusu olarak kullanılan arakidonik asitin inhibe ettiği bulunmuştur (67). Aynı konuda yapılmış bir diğer çalışmada İto ve Şirai (96), Heterosiklik imidazol bileşikleri ile uyarılmış mutajeniteye karşı 1-o-hexyl-2,3,5-trimetilhidroquinon (HTHQ) ve diğer bilinen ve yeni bulunmuş lipofilik antioksidantların antimutajenik etkisini Ames testi ile araştırmışlar. Yen ve Chen (97)' de aynı yöntemle çeşitli çay ekstratlarının ve yapraklarının içerdikleri

katekin, kafein, folik asitli bileşikler, askorbik asit, (karoten ve tokoferoller' in antimutajenik aktivitesini araştırmıştır. Bunun için, yine heterosiklik imidazol bileşikleri ile bakteriyal mutajenite uyarılmıştır.

### 1.5.2. Fenantro imidazol' lerin genel özellikleri

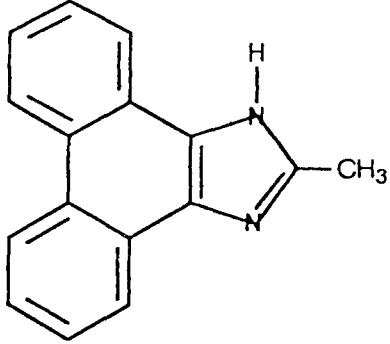
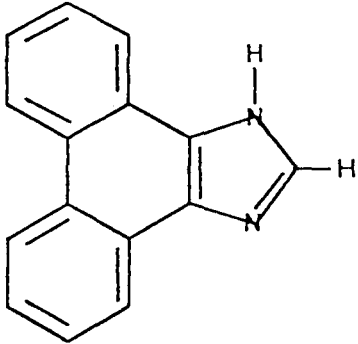
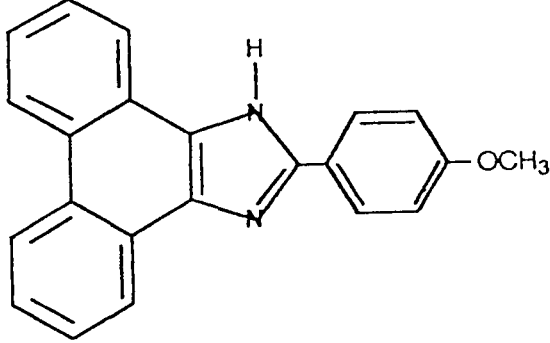
Fenantroimidazol bileşikleri, Işıkdag ve Özdemir (95) tarafından fenantrakinon bileşiğinden sentezlenmiştir. Bu bileşiklerin fizikokimyasal parametreleri ile spektral analizleri de ayrıca yapılmıştır.

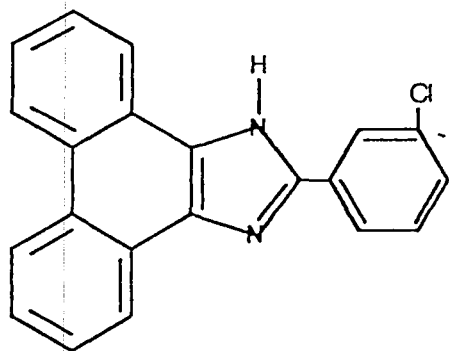
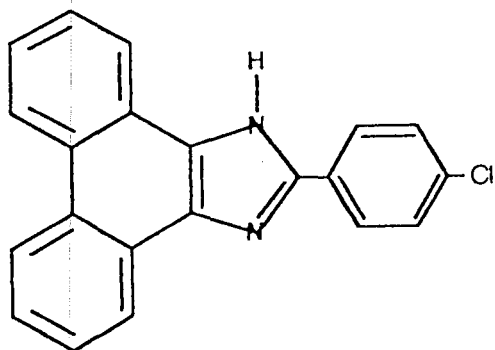


Şekil 1.4. 2- Süstitüe fenantro imidazol' ün genel formülü (Kaynak-95 den).

Mutajenitesi test edilen beş ayrı fenantro imidazol türevi, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya anabilim Dalı' nda Prof. Dr. İlhan Işıkdag' dan sağlanmıştır. Kimyasalları çözmek için dimetil sülfoksit (DMSO) kullanılmış ve 10µg/plak, 100µg/plak, 500µg/plak, 1000µg/plak., 2500µg/ plak olmak üzere beş ayrı dozdaki çözeltileri hazırlanmıştır..

Tablo 1.2. Mutajenitesi araştırılan kimyasal test maddelerinin isimlendirilmeleri ve kimyasal formülleri

1. Madde (2-Metil fenantroimidazol)	
	 <p>The structure shows a phenanthrene core (three fused benzene rings) with an imidazole ring fused to the central ring. A methyl group (CH<sub>3</sub>) is attached to the 2-position of the imidazole ring.</p> <chem>Cc1nc2c(c1)ccc3ccccc23</chem>
2. Madde (fenantroimidazol)	
	 <p>The structure shows a phenanthrene core with an imidazole ring fused to the central ring. Both the 2 and 3 positions of the imidazole ring are occupied by hydrogen atoms.</p> <chem>c1ccc2c(c1)ccc3c2[nH]c3</chem>
3. Madde (2-(4-Metoksi fenil) fenantroimidazol)	
	 <p>The structure shows a phenanthrene core with an imidazole ring fused to the central ring. A 4-methoxyphenyl group (a benzene ring with a methoxy group, OCH<sub>3</sub>, at the para position) is attached to the 2-position of the imidazole ring.</p> <chem>COc1ccc(cc1)c2nc3c(c2)ccc4ccccc34</chem>

**4. Madde (2-(3-Kloro fenil) fenantroimidazol)****5. Madde (2-(4-Kloro fenil) fenantroimidazol)**



## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1-Materyal

#### 2.1.1. Kimyasal maddeler

4-Nitro-o-fenilendiamin (Aldrich), S9 tabletleri (Boehringer Mannheim), sitrikasit monohidrat,  $K_2HPO_4$ , Sodyumhidroksit (Codex Carloerba), Bacto agar (Difco),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $NaH_2NH_4 (PO_4 \cdot 4H_2O)$ , L-Histidin.HCl (F.W.191.7), Sodyum azid, 2-Aminoflurene, KCl, NaCl (Merck), Nutrient Broth No: 2 (Oxoid), D-Biyotin (F.W.247.3), Ampisilin trihidrad, 3-Metilkolantren, (Sigma)' dan temin edilmiştir.

#### 2.1.2. *Salmonella typhimurium* test suşları

Deneyde, Prf.Dr. Ames ve arkadaşları tarafından, *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla geliştirilmiş TA97 ve TA98 suşları kullanılmıştır. Bu suşlar Dr. Bruce N. Ames (Kaliforniya Üniversitesi Berkeley,CA.,USA)' den sağlanmıştır. Bu iki suş, Ames ve arkadaşları tarafından, Ames testi için gerekli olan orjinal mutasyonlara ilave olarak kazandırılan bazı özellikler ile çerçeve kayması mutajenlerine karşı daha hassas hale getirilmiştir.

#### 2.1.3. Test maddeleri (dozları ve hazırlanışı)

Bu çalışmada 5 ayrı 2-substitüe 1H-fenantro (9,10-d) imidazol bileşiğinin mutajenik etkileri Ames / *Salmonella* / Mikrozom test yöntemiyle araştırılmıştır. Test maddeleri fenantroimidazol' ün beş ayrı türevidir ve Prof. Dr. İlhan Işıkdag (Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi) tarafından sentezlenmiştir İsimleri sırasıyla, 2-metil fenantroimidazol, fenantroimidazol, 2-

(4-metoksi fenil) fenantro imidazol, 2-(3-kloro fenil) fenantroimidazol ve 2-(4-kloro fenil) fenantroimidazoldür. Bu maddeler dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülmüşler ve oda sıcaklığında saklanmışlardır. Uygulanacak dozları belirlemek için maddelerin 10µg/plak, 100µg/plak, 500µg/plak, 1000µg/plak, 2500µg/plak ve 5000µg/plak konsantrasyonları hazırlanıp bakteriler üzerinde denenmiş ve 2500 µg/100µl konsantrasyonunun üzerindeki konsantrasyonların toksik etki yaptığı görülmüştür.

#### 1.2.4. Deneyde kullanılan ortamların içerikleri ve hazırlanmaları

##### (50X) Vogel Bonner Medium

Kullanım: MGA ve HBA (master) plakları

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.....10g

Sitrikasit monohidrat.....100g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....500g

NaH<sub>2</sub>NH<sub>4</sub>(PO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O).....175g

Distile su (45C).....670ml

Maddeler yukarıda yazıldıkları sıra ile suyun içine eklenir, daha sonra hacim 1lt' ye tamamlanır. 1litrelik 2 kaba bölünerek 121 °C de 20 dakika süreyle otoklav edilir.

##### (0.5mM) Histidin /Biyotin solüsyonu

Kullanım: Mutajenite deneyi (100ml top agara 10ml olarak)

D-Biyotin (F.W.247.3).....30.9mg

L-Histidin.HCl (F.W.191.7)...24.0mg

Distile su.....250ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülür, daha sonra histidin ilave edilip otoklav edilir ve +4 °C' de saklanır.

**(%0.8/0.02NaOH) Ampisilin solüsyonu**

Kullanım :Ampisiline direnç kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

Ampisilin trihidrat.....0.8g

0.02M sodyum Hidroksit.....100ml

Ampisilin trihidrat, 0.02 M NaOH içinde çözülür ve sterilizasyon için 0.22mµ çaplı filtreden geçirilir ve +4 °C' de saklanır.

**(% 0.1) Kristal viyole**

Kullanım:rfa mutasyonu'nu denemede

Kristal viyole.....0.1g

Distile su.....00ml

Boya ve su karıştırılır ve solusyon ışık geçirmeyen bir kaba konup+4°C de saklanır.

**(%0.13) Biotin çözeltisi**

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

D-Biotin.....0.65mg

Distile su.....50ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülür ve otoklav edilir.

**(%0.5) Histidin çözeltisi**

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

L-Histidin. HCl (F.W.191.7).....2g

Distile su.....400ml

**(%40) Glikoz çözeltisi**

Kullanımı: MGA ve HBA plakları hazırlanması

Glikoz.....40g

Distile su.....100ml

Glikoz distile su içinde çözülerek otoklav edilir ve 0-4 °C de saklanır.

**(0.1µg/µl) Sodyum Azid çözeltisi**

Kullanım:pozitif kontrol

1.0mg/petri başına olmak üzere distile suda çözülerek kullanılır. TA97 suşu için

S9 karışımı gerektirmeyen kimyasaldır. 0-4 °C de saklanır.

**(2µg/µl) 2-Aminofluorene (2AF)**

Kullanım:pozitif kontrol

1.0mg/petri başına olmak üzere dimetilsüloksit' de (DMSO) çözülerek kullanılır. S9

karışımı gerektirmeyen kimyasaldır. 0-4 °C de saklanır.

**(2µg/µl) 4-Nitro-o-Fenilendiamin (NPD)**

200µg/petri olmak üzere DMSO da çözülerek kullanılır. TA 98 suşu için S9 karışımı gerektirmeyen kimyasaldır. Oda ısısında saklanır.

**(%6.4) 3-Metilkolantren**

Kullanım: metabolik aktivasyonun hızlandırılması

3-metilkolontren.....64mg

Mısır yağı.....1ml

(80mg/kg olmak üzere) mısır yağında çözülerek 0.5ml intraperitoneal olarak enjekte edilir.

**(0.15M) KCl çözeltisi**

Kullanım: mikrozom izolasyonu

KCl.....11.275g

Distile su.....1000ml

KCl, bir miktar distile suda çözülür ve toplam hacim 1000ml' ye tamamlanarak otoklav edilir ve +4 °C' de saklanır.

**Top agar**

Kullanım: Mutasyon deneyi

Agar.....6g

NaCl.....5g

Distile su.....1000ml

Agar-su ve tuz manyetik karıştırıcıda ısıtılarak ve karıştırılarak çözülüp otoklav edilir.

**Histidin/ Biyotin plakları (HB Agar)**

Kullanım: Histidin gereksinim deneyi

Agar.....15g

%40 glikoz.....50ml

histidin.HCl.H<sub>2</sub>O.....10ml

(2g/400ml.H<sub>2</sub>O)

0.5mM Biyotin.....6ml

Distile su.....914ml

Agar ve su karıştırıldıktan sonra otoklav edilir. 45°Cye soğutulup %40 glikoz, 50 xVB tuzları ve histidin çözeltisi eklenir, solusyon biraz daha soğuduktan sonra biyotin eklenir, karıştırıp petri kutularına 30ml olarak dağıtılır.

**Histidin/ Biyotin/ Ampisilin plakları (HBA Agar)**

Kullanım: Ampisiline dirençlilik testi ve 'Master Plate' hazırlanmasında

Agar.....15g

Distile su.....910ml

50 xVB tuzları.....20ml

%40 glikoz.....50ml

histidin.HCl.H<sub>2</sub>O.....10ml

(2g/400ml.H<sub>2</sub>O)

0.5mM Biyotin.....6ml

(%0.8/0.02NaOH) Ampisilin....3.15ml

Agar ve su. otoklavlanır, 45°Cye soğutulup %40 glikoz, 50x VB tuzları ve histidin bu sıcak solusyona eklenip karıştırılır ve biraz daha soğuyunca biyotin ve ampisilin eklenip plaklar petrilere ve 30 ml olarak aktarılır.Bu plaklarda bakteriler +4°C de 2 ay saklanabilir.

### Minimal Glikoz Agar Plakları

Agar.....	15g
Distile su.....	930ml
50xVB.....	20ml
%40 glikoz.....	50ml

Agar ve su 2 lt'lik kapta karıştırılıp çözülür ve otoklavlanır, 45°C ye soğutulup %40 glikoz ve 50 xVB tuzları eklenip petri kutularına 30ml olarak aktarılır.

### Nutrient Agar Plakları

Kullanım: Gecelik kültürün ml'sindeki bakteri sayısını bulma ve genotip kontrolü

a)kristal viyole b) UV ye duyarlılığı

Oxoid nutrient broth no 2.....	25g
Agar.....	15g
Distile su.....	930ml

Agar, broth ve su 2 lt'lik kapta karıştırılıp otoklavlanır ve petri kutularına 30ml olarak aktarılır .

### Nutrient Broth sıvı kültür ortamı

Kullanım:Bakterilerin Gecelik kültürde büyütülmeleri

Oxoid nutrient broth no: 2.....5g

Distile su.....200ml

Broth ve su karıştırılıp otoklavlanır ve +4 °C' de saklanır.

### **S9 karışımı**

Ticari olarak alınmış S9 tabletleri (1 tablet için) 14ml distile su da çözülür ve 3ml rat mikrozomu ilave edilip toplam hacim 20ml'ye tamamlanır, buz içinde (0-2°C) kullanıma kadar muhafaza edilir (kullanılacağı zaman hazırlanıp hemen tüketilir).

## **2.2. Metod**

Bu çalışmada, USA'dan elde ettiğimiz test bakterilerinin stok kültürlerinin hazırlanması, bakterilerin genetik özelliklerinin kontrol edilmesi, Mikrozomal fraksiyonun hazırlanması ve Ames / *Salmonella* / Mikrozom testi Maron ve Ames (6)'in yöntemine uygun olarak plak inkorporasyon metodu ile yapılmıştır. Deneyle S9'lu ve S9'suz olarak 2 grup halinde çalışılmıştır. Her doz paralel 3 plak halinde denenmiş ve farklı zamanlarda iki bağımsız deney yapılmıştır. Ayrıca pozitif kontrol, solvent kontrol ve spontan kontrol' ler deneye paralel olarak denenmiştir.

### **2.2.1. *Salmonella* suşlarının kültürlerinin ve master plaklarının hazırlanması**

Kağıt disklere emdirilmiş olarak gelen bakteri kültürlerinin Histidin Biotin Amphisilin (HBA) plaklarına paralel ekimleri yapıp 37°C de 48 saat inkübasyona alınmıştır. Sürenin sonunda iyi izole olmuş bir koloni seçilip, 2ml Nutrient Broth (NB) ortamı içinde süspanse edilerek bir gece (12-16 saat) 37°C de inkübe edilmiştir.



İnkübasyondan sonra platin öze ile bir öze dolusu sıvı kültür alınıp HBA agar üzerine çizgi ekim yapılarak plaklar 37°C de 48 saat inkübe edilmiştir. Bu plaklar +4°C de iki ay süre ile saklanmış ve pasajlar yapılmıştır.

### **2.2.2. *Salmonella* suşlarının stoklanması ve stok kültürlerin açılması**

Test suşlarının uzun süre canlılığını ve mutant özelliklerini koruyabilmeleri için stoklanmaları gerekmektedir. Bunun için HBA agarda üremiş olan *Salmonella* suşlarından iyi izole olmuş, normal büyüklükteki bir koloni öze ile alınıp 2ml NB içeren tüplerde süspansiyon edilerek 37°C de, bir gece inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda steril ependorf tüpüne 1ml sıvı bakteri kültürü ve 0.09ml DMSO ilave edilmiş ve -20°C de donması sağlandıktan sonra -80°C de saklanmıştır. Kültürün açılması gerektiğinde, stok bakteri kültürü oda sıcaklığında eritilip bir öze dolusu olarak Histidin biyotin (HB) agar plaklarına paralel ekim yapılmıştır. 37°C de 48 saat inkübe edildikten sonra, HB plaklarında üreyen bakterilerden iyi izole olmuş bir koloni steril transfer iğnesi ile 0.3ml 1X Fosfat Buffer Salin (PBS) içinde, süspansiyon edilmiştir. Bu bakteri süspansiyonu içine steril eküvyon (pamuklu öze) daldırılıp, fazlası tüp kenarında sıkıldıktan sonra HBA plaklarına 4-5 çizgi halinde paralel ekim yapılarak 37°C de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda master plaklar +4°C de iki ay süreyle saklanmıştır yada gerektiğinde bu plaklardan master plaklar yenilenerek deney sırasında gecelik kültür hazırlanmıştır.

### **2.2.3. *Salmonella* suşlarının kontrol testlerinin yapılması**

#### **2.2.3.1. Bakterilerin genotiplerinin kontrol edilmesi**

Testin güvenilirliği açısından test suşlarının orjinal mutasyonlara sahip olup olmadığını bilmek gerekir. Bu nedenle bakterilerin genetik özellikleri bazı testlerle kontrol edilmiştir.

#### **Histidin gereksinimi kontrolü:**

Bakterilerin minimal glikoz agar (MGA) üzerine ekilmeleri sonucu his<sup>-</sup> bakteriler his<sup>+</sup>lerden ayırd edilir. Bu amaçla NB' da, bir gece üretilen bakterilerden MGA ve HB plaklarına çizgi ekim yapılmıştır. 37°C de 48-72 saat inkübasyondan sonra HB plaklarında üreme gözlenirken MGA plaklarında üreme gözlenmemiştir. Böylece kullanacağımız bakterilerin His<sup>-</sup> mutasyonu'nu taşıdığı anlaşılmıştır.

#### ***uvrB* mutasyonu kontrolü:**

Bu mutasyon ile bakteriler, Ultra viyole (UV) ışınlarının neden olduğu replikasyon hatalarının düzeltilmesi için gerekli olan 'DNA onarım mekanizması' engellenmiştir ve bu mutasyonun varlığı UV ışınlarına duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için, NB' da bir gece büyütülen bakteri kültüründen 1 öze dolusu alınıp Nutrient Agar (NA) plağının tamamına paralel ekim yapılmıştır. Plağın yarısı (çizgileri kesecek şekilde) plastik bir plaka ile kapatılıp 15 watt gücünde bir UV lambası ile 33 cm yüksekten 8sn. süre ile ışınlanmıştır. Işınlamadan sonra petri kapakları kapatılıp 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir. Kullanılan UV ışığı dozu, *uvrB* mutasyonu taşıyan bakterileri öldürecek dozdadır. Çünkü DNA kesme tamir etme mekanizması engellenmiştir. Bundan dolayı UV'ye maruz kalan kısımda üreme olmazken, plastik kapakla kapatılan kısımda normal bir üreme gözlenmiştir. Bu da bize kullanılacak bakterilerin *uvrB* mutasyonunu taşıdığını göstermiştir.

### ***Rfa* mutasyonu kontrolü:**

Bu mutasyon bakteri hücre zarının lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuştur ve hücre zarının geçirgenliği arttırılmıştır. Varlığı kristal viyoleye duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için bakteri kültürü NB' da bir gece büyütülen 0.1ml sıvı kültür , 45°C su banyosunda ısıtılmış 2ml top agar üzerine ilave edilip daha sonra Nutrient agar (NA) plaklarına dökülerek plaklara 8 işareti yaptırılmıştır. 10 dk. donması beklendikten sonra plağın ortasına 0.5cm çaplı steril filtre kağıdı diski yerleştirililip diskin ortasına %0.1' lik kristal viyole karışımından 10µl damlatılmıştır. Kağıdın boyayı emmesi beklenilmiş, sonra plaklar 37°C'de 24 saat inkube edilmiştir. İnkübasyon sonunda disk çevresinde 9cm'lik üreme olmayan zon gözlenmiştir. Bu zonda, boya maddesi bakterilerin içine kolayca girip etkilediği için bakterilerin üremesini engellediği için bakterilerin *Rfa* mutasyonunu taşıdıkları anlaşılmıştır.

### **R faktör varlığı kontrolü:**

Test bakterilerinin içerdiği, R faktör taşıyan pKM101 plazmidlerinin kaybolup kaybolmadıkları, ampisiline dirençliliğinin ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Bu amaçla, büyütülen NB içinde bakteri kültürü, (%0.8ampisilin / 0.02M NaOH) ampisilin içeren HBA plaklarına çizgi ekim yapılarak,. 37°C de 24 saat inkübasyonu sonunda, plazmid içeren mutant bakterilerin ampisilinli ortamda büyüdükleri gözlenmiştir. Yani bakteriler R faktör plazmidini içermektedirler.

### **Spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü:**

Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his<sup>-</sup> durumundan his<sup>+</sup> durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar TA98 için 30-50 revertant / plak; TA97 için 90-180 revertant / plaktır. Bu test için, 37°C de, NB' da büyütülen bir gecelik

kültürden 0.1ml alınıp, 45°C deki su banyosunda ısıtılan 2ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra 0.2ml 0.5M histidin-biyotin solusyonu da eklenip test tüpü yavaşça çalkalanarak MGA plaklarına yayılmış ve 37°C de 48 saat ikübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır.

### 2.2.3.2. Sıvı kültürün ml'indeki bakteri sayısının belirlenmesi

Deneyde kullanılan gecelik kültürün ml'sinde bulunan bakteri sayısını bulmak için HBA plaklarından bir koloni alınarak NB içinde süspanse edilmiş, çalkalamalı inkübatörde 37°C de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, gecelik kültürün NB ile  $10^0$ ,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  ve  $10^{-6}$  olacak şekilde bir dizi seyreltmeleri hazırlanmıştır. Bu seyreltmelerden NA plaklarına 10µl'lik miktarlarda damlatarak ekim yapıp 37°C de 24 saat inkübe edildikten sonra plaklardaki koloniler sayılmış ve bakteri sıvı kültürünün ml'sinde  $2.4 \times 10^9$  bakteri olduğu belirlenmiştir. .

Ayrıca bakteri kültürünün optik dansitesi 650nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülüp saf kültürün ( $10^0$ ) optik dansitesi 0.165 olarak belirlenmiştir (6).

### 2.2.4. Test Maddelerin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması

Kullanılan test bileşiklerinin, test bakterileri için öldürücü dozunun saptanması amacıyla üst agara (top agar ) 0.1ml bakteri kültürü ve 0.1ml test bileşiklerinin değişik konsantrasyonları (doz) test tüpüne eklenmiştir. Tüpteki karışım NA plaklarına dökülerek plaklar 37°C de 24 saat inkübe edilmiş, inkübasyondan sonra plaklardaki koloniler sayılmış ve kontrol plakları (kimyasal eklenmeyen) ile karşılaştırılarak toksik ve toksik olmayan dozlar belirlenmiştir. Buna göre test bileşiğinin 5000µg/plak dozunun toksik olduğu

bulunmuş ve 2500µg/plak, 1000µg/plak 500µg/plak, 100µg/plak, 10µg/plak olmak üzere 5 doz seviyesinde mutajenite deneylerinin yapılmasına karar verilmiştir.

### 2.2.5. Memeli Karaciğer Mikrozoamlarının Hazırlanması

Test maddelerinin metabolik ürünlerinin mutajen olup olmadığını araştırmak için kullanılması gereken mikrozoam ekstresi wistar cinsi ratlar'dan hazırlanmıştır. Bunun için ratlara, öldürülmeden 5 gün önce 80mg/kg olacak şekilde intraperitoneal olarak 3-metilkolorten enjekte edilerek mikrozoomal enzim artışı uyarılmıştır (6).

Mikrozoam izolasyonuna başlamadan önce kullanılan tüm malzemeler steril edilmiş ve 0-2°Cde muhafaza edilmiştir. Deneyde kullanılmak üzere 3-metilkolorten enjekte edilmiş olan 200gr ağırlığında genç erkek ratlar 5 günlük süre sonunda boynu kırılarak (servical dislocation) öldürülmüştür. Ratlar diseksiyon masasında açıldıktan sonra karaciğer zedelenmeden çıkarılmış ve net ağırlığı bulunmuştur. 1gr karaciğere 1ml olacak şekilde soğuk 0.15 M KCl ile karaciğer yıkandıktan sonra 1gr karaciğere 3ml olacak şekilde soğuk 0.15 M KCl eklenmiştir. Karaciğer steril pens ve makas yardımı ile küçük parçalara ayrılarak 'Junge kunkel ultra turrax' marka homojenizatör tüpüne alınıp aynı marka homojenizatör ile 24000rpm de homojenize edilerek koyu pembe renk görülene kadar bu işlem tekrar edilmiştir. Homojenat, 9000xg'de 0-2°C de 10 dak. 'Varifüge 20RF' marka santrifüjde santrifüj edildikten sonra, süpernetant kısım soğuk steril ependorf tüplere aktarılmıştır. Kontaminasyonu önlemek amacı ile homojenat 0.25µm çaplı selüloz filtreler ile filtre edilmiştir. Sterilite kontrolü için mikrozoomal fraksiyondan 0.1 ml alıp NA ve HBA plaklarına yayma ekim yapılarak plaklar 37°Cde 24 saat ikübe edilmiştir Kullanılmak için -20°C de saklanmıştır.

## **2.2.6. Metabolik aktivasyon için yeterli mikrozomal fraksiyonun miktarının tesbiti (S9' lu deney için)**

S9 karışımı hazırlamak için ticari olarak satılan S9 mutajenite tabletleri (Boehringer Mannheim) kullanılmıştır. Firma, tablet başına 2ml ticari mikrozomal enzim kullanılmasını tavsiye etmiştir. Fakat mikrozomal enzimi rat karaciğerinden hazırladığımız için uygun konsantrasyonu belirlemek amacıyla 4 ayrı konsantrasyonu ayrı ayrı deneyerek tablet başına 3ml mikrozomal enzimin ilave edilmesine karar verilmiştir. Bu amaçla, bir S9 tableti 14ml steril distile su içinde çözülüp 4 ayrı steril corning tüpüne eşit miktarda aktarılmıştır (tüp başına 3.5ml olacak şekilde). Tüplere sırasıyla 0.25ml, 0.50ml, 0.75ml ve 1.00ml mikrozomal enzim ilave edilip toplam hacimleri 5ml'e tamamlanmıştır. Bir pozitif mutajen olan (20µg/100ml) 2-Aminofluoren (bölüm 5) ile S9'lu mutajenite deneyi yapılmıştır. İçinde 0.2ml (0,5mM) Histidin-Biyotin solusyonu bulunan 2ml'lik top agar tüplerine 0.1ml 2-Aminofluoren, 0.1ml TA98'in gecelik kültürü ve 0.5ml buzda bekletilen S9 karışımı ilave edilip çalkalanarak 37°C' deki MGA plaklarına dökülmüştür. 15dk. donması beklendikten sonra 37°C' de 48-72 saat ikübe edilip plaklardaki his<sup>+</sup> koloniler sayılarak Tablo 3.3' e kaydedilmiştir. Sonuçta 1379 revertant/plak olarak en fazla üreme gözlenen doz olan 0.75ml mikrozom/5ml S9 karışımı dozu en uygun miktar olarak belirlenmiştir (3ml mikrozom/tablet).

## **2.2.7. Ames Mutajenite testinin yapılışı**

Deneyin amacı, daha önceden büyümesi için histidin amino asidine gereksinim duyan oksotrofik suşların, kullandığımız test maddeleri ile tekrar histidin sentezleyebilir (prototrofik) hale dönüşmesi temeline dayanır.

### 2.2.7.1. S9' suz (-) deney

Bu amaçla, içlerine 0.2ml histidin-biyotin çözeltisi ilave edilmiş 2' şer ml'lik top agar içeren deney tüpleri 45°C'lik su banyosunda ısıtılıp içlerine 0.1ml test maddesi ve 0.1ml 12-16 saatlik bakteri kültürü eklenmiştir. Tüpler çalkalanarak 37°C'ye ısıtılmış MGA (Minimal glikoz agar) plaklarına dökülmüş, plaklara hızla 8 işareti yaptırılarak top agarın plak üzerine homojen dağılması sağlanmıştır. 15dk. donması beklendikten sonra plaklar ters çevirilip 37°C'lik etüvde 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilerdeki koloniler sayılmıştır. Deney her doz için 3 ayrı plak olmak üzere hazırlanarak yapılmış, sonuçların değerlendirilebilmesi için deneylere paralel olarak spontan kontrol, solvent kontrol (DMSO) ve pozitif (diagnostik) kontrol olarak TA97 suşu için 1µg/100µl (NaN<sub>3</sub>) Sodyum Azid (6), TA98 suşu için, 200µg/100µl (O<sub>2</sub>NC<sub>6</sub>H<sub>3</sub>(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>) 4-nitro-*o*-fenilendiamin (6,6,10,15,33,36) kullanılmıştır Deney sonuçları standart hata ile birlikte ortalamaları alınarak Tablo 3.2 ve Tablo 3.3.' e.kaydedilmiştir

### 2.2.7.2. S9' lu (+) deney.

Deneyin S9'lu kısmında tablet başına 3ml mikrozomal enzim olacak şekilde S9 karışımı hazırlanmış ve buz içinde bekletilmiştir. Deneyde 45°C'lik su banyosunda bulunan ve 0.2ml histidin-biyotin solüsyonu içeren 2ml'lik yumuşak agar tüplerine 0.1ml test maddesi, 0.1ml gecelik bakteri kütürü ve 0.5ml buzda bekletilen S9 karışımından ilave edilmiştir. Tüpler çalkanarak önceden 37°C'ye ısıtılmış MGA plaklarına dökülmüş ve homojen yayılması sağlanmıştır. 15dk. donması beklendikten sonra 37°C'lik etüvde 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra his<sup>+</sup> kolonilerin sayımı yapılip standart hata ile birlikte ortalamaları alınarak Tablo 3.2 ve Tablo 3.3' e kaydedilmiştir.

Ayrıca deneyde TA97 ve TA98'in kendiliğinden geri dönüş sıklığı (spontan mutasyon), solvent kontrol olan DMSO ve pozitif kontrol olarak da her iki suş için 1g/100µl 2-Aminofluoren (6,9,10,33,35,41,47-49,54,63) deneye paralel olarak denenmiş ve sonuçları tablolara kaydedilmiştir

### 2.2.7.3. Sonuçların değerlendirilmesi

Bu çalışmada beş ayrı fenantroimidazol türevinin mutajenik aktivitesi *Salmonella typhimurium*' un TA 97 ve TA 98 mutant suşları ile araştırılmıştır. Her doz, üç paralel plak ile aynı anda test edilmiştir ve farklı zamanlarda iki bağımsız deney yapılmıştır. Ayrıca, test bileşenlerinin etkilerinin memelilerin metabolik aktivasyonları sonucunda değişip değişmediğini belirlemek amacıyla S9 fraksiyonu varlığında da deney aynen tekrarlanmıştır. Sonuçlar, standart hataları ile birlikte ortalamaları alınarak istatistiksel açıdan *Student-t* testi ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi İstatistik Bölümünden alınan 'SPSS-WINDOWS' paket programı kullanılmıştır. TA 97 için olan deney sonuçları Tablo 3.2' de TA 98 için olan deney sonuçları ise Tablo 3.3' de verilmiştir. Tablolarda, test maddelerinin her doz için revertant koloni sayılarının ortalamaları 'ortalama  $\pm$  stn hata' şeklinde gösterilmiştir. Her deneye paralel olarak spontan revertant kontrol, solvent kontrol (DMSO kontrolü) ve pozitif kontroller yapılmıştır ve sonuçları Tablo 3.2 ve 3.3' de aynı şekilde gösterilmiştir. Ayrıca S9' lu deneyler için gerekli mikrozom miktar tespiti testinin sonuçları da Tablo 3.1' de gösterilmiştir.



### 3. BULGULAR

Bu çalışmada beş ayrı 2-sübstitüe 1H-Fenantro [9,10-d] imidazol türevinin mutajenik aktivitesi Ames testinde *Salmonella typhimurium*' un TA 97 ve TA 98 mutant suşları ile araştırılmıştır.

Deneyler her iki suş için S9 mikrozomal fraksiyon yokluğunda ve varlığında olmak üzere iki grup halinde gerçekleştirilmiştir. S9 (+) deneylerde kullanılmak üzere metabolik aktivasyon için gerekli enzimleri içeren, rat' tan elde edilen mikrozomal fraksiyonun miktarını belirlemek amacıyla çeşitli konsantrasyonları denenmiştir. Bunun için bir pozitif mutajen olan 2-AF (2-Aminofloren) ile mikrosomal fraksiyon' un 4 farklı dozu, iki ayrı bağımsız deneyle test edilmiş ve sonuçları tablo 3.3.' de gösterilmiştir. Bunlardan en uygun sonuçların elde edildiği 3ml / tablet (0.75ml / 0.5ml S9) dozu hazırlanarak deneylerde kullanılmıştır.

Tablo 3.1. Mikrosomal fraksiyonun miktar tespiti

DENENEN DOZLAR ml mikrosom/0.5ml S9	REVERTANT KOLONİ SAYISI
2-Aminofloren 0.25	393.30±164.47
0.50	572.45±34.15
0.75	1040.45±478.21
1.00	720.30±76.80
Spontan kontrol 0.25	25±10.15
0.50	20.60±6.03
0.75	26.30±4.33
1.00	19±2.83
DMSO kontrolü 0.25	21±10
0.50	24±5.30
0.75	23±60
1.00	19.60±30

Her doz, üç paralel plak ile aynı anda test edilerek farklı zamanlarda yapılan iki deneyin ortalamaları alınıp tabloya kaydedilmiştir (ort.±st.h).

Daha sonra deneyler, her test maddesi için 2500 µg/plak, 1000 µg/plak, 500 µg/plak, 100 µg/plak ve 10 µg/plak olarak beş doz halinde uygulanmış ve 2500 µg'ın üzerindeki dozlar test bakterileri için toksik etki gösterdiğinden kullanılmamıştır. Her doz, üç paralel plak ile aynı anda test edilmiş ve farklı zamanlarda iki bağımsız deney yapılmıştır. Ayrıca, test bileşenlerinin etkilerinin memelilerin metabolik aktivasyonları sonucunda değişip değişmediğini belirlemek amacıyla S9 fraksiyonu varlığında deney aynen tekrarlanmıştır. Sonuçlar, standart hataları ile birlikte ortalamaları alınarak istatistiksel açıdan *Student-t* testi ile, çözücü kontrolü olan DMSO sonuçları karşılaştırılmak suretiyle değerlendirilmiştir. TA 97 için olan deney sonuçları Tablo 3.2.'de TA 98 için olan deney sonuçları ise tablo 3.3. de verilmiştir. Tablolarda, test maddelerinin her doz için revertant koloni sayılarının ortalamaları 'ortalama ± stn hata' şeklinde gösterilmiştir. Her deneye paralel olarak spontan revertant kontrol, solvent kontrol (DMSO kontrolü) ve pozitif kontroller yapılmıştır ve sonuçları Tablo 3.2. ve 3.3.'de aynı şekilde gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Fenantroimidazol' ün beş ayrı türevinin TA 97 ile verdikleri revertant koloni sayıları.

TEST BİLEŞİĞİ	DENENEN DOZ ( $\mu\text{g/plak}$ )	REVERTANT SAYISI	
		S9 (-)	S9 (+)
I. MADDE 2-Metil fenantroimidazol	10	80 $\pm$ 3	<sup>t</sup> 117 $\pm$ 12
	100	93.5 $\pm$ 0.5	117 $\pm$ 11
	500	110 $\pm$ 16	116 $\pm$ 12
	1000	124.5 $\pm$ 2.5	96.50 $\pm$ 7.5
	2500	82 $\pm$ 2	<sup>t</sup> 91.50 $\pm$ 4.5
II: MADDE Fenantroimidazol	10	66 $\pm$ 11	162 $\pm$ 10
	100	158.5 $\pm$ 31.5	<sup>a</sup> 208 $\pm$ 25
	500	49.50 $\pm$ 2.5	<sup>b</sup> 183.5 $\pm$ 2
	1000	195 $\pm$ 31	<sup>a</sup> 211 $\pm$ 19
	2500	169 $\pm$ 19	<sup>c</sup> 189 $\pm$ 11
III: MADDE 2-(4-Metoksi fenil) fenantroimidazol	10	100 $\pm$ 14	148 $\pm$ 10
	100	110 $\pm$ 39	109 $\pm$ 10
	500	92 $\pm$ 42	113 $\pm$ 13
	1000	102 $\pm$ 22	118.5 $\pm$ 1
	2500	105.50 $\pm$ 20.5	91 $\pm$ 5
IV: MADDE 2-(3-Kloro fenil) fenantroimidazol	10	119.50 $\pm$ 15.5	94 $\pm$ 2
	100	140 $\pm$ 0	<sup>t</sup> 75.5 $\pm$ 11
	500	133 $\pm$ 25	105.5 $\pm$ 3
	1000	132 $\pm$ 28	86 $\pm$ 0
	2500	115.5 $\pm$ 10.5	87 $\pm$ 6
V. MADDE 2-(4-Kloro fenil) fenantroimidazol	10	81.5 $\pm$ 4.5	100 $\pm$ 11
	100	105.5 $\pm$ 44.5	83.5 $\pm$ 12
	500	117.5 $\pm$ 14.5	<sup>t</sup> 69 $\pm$ 2
	1000	102.5 $\pm$ 2.5	110 $\pm$ 13
	2500	103.5 $\pm$ 5.5	136.5 $\pm$ 5
Spontan kontrol	100	95.67 $\pm$ 12.97	97.75 $\pm$ 14.17
DMSO kontrol	100	118.5 $\pm$ 18.4	101.25 $\pm$ 16.11
Sodyum azid	1000	164 $\pm$ 29.61	-
2-Aminofluorene	1000	-	658.25 $\pm$ 111.02

Sodyum azid, TA 97 için S9 gerektirmeyen, 2-Aminofluorene, TA 97 için S9 gerektiren pozitif kontrol ve DMSO, çözücü kontrol olarak kullanılmıştır. Her doz, üç paralel plak ile aynı anda test edilerek farklı zamanlarda yapılan iki deneyin ortalamaları alınıp (ort. $\pm$ st.h) tabloya kaydedilmiştir. (a: P<0.001, b: P<0.01, c: P<0.001, t: toksik etkili)

Tablo3.3.. Fenantroimidazol' ün beş ayrı türevinin TA 98 ile verdikleri revertant koloni sayıları.

TEST BİLEŞİĞİ	DENENEN DOZ (µg/plak)	REVERTANT SAYISI	
		S9 (-)	KOLONİ (TA 98) S9 (+)
I. MADDE 2-Metil fenantroimidazol	10	25±1	77.50±14.5
	100	24.50±2.5	<sup>c</sup> 62±13
	500	26.50±3.5	<sup>c</sup> 67±3
	1000	30.50±5.5	<sup>b</sup> 78.50±12.5
	2500	20.50±8.5	59.50±15.5
II: MADDE Fenantroimidazol	10	29±4	<sup>a</sup> 106±0
	100	29±5	<sup>c</sup> 89±14
	500	25.50±3.5	<sup>c</sup> 96.50±5.5
	1000	25.50±5.5	40.50±9.5
	2500	26.50±1.5	<sup>c</sup> 63±0
III: MADDE 2-(4-Metoksi fenil) fenantroimidazol	10	26.50±1.5	<sup>t</sup> 29.50±0.5
	100	25.50±2.5	<sup>t</sup> 26±1
	500	22.50±0.5	<sup>t</sup> 32.50±2.5
	1000	25.50±3.5	<sup>t</sup> 30.50±2.5
	2500	26.50±2.5	<sup>t</sup> 24.50±1.5
IV: MADDE 2-(3-Kloro fenil) fenantroimidazol	10	26±1	38±
	100	24.50±2.5	47.50±3.5
	500	25.50±0.5	39±0
	1000	24.50±0.5	<sup>t</sup> 35.50±2.5
	2500	25.50±2.5	56±14
V. MADDE 2-(4-Kloro fenil) fenantroimidazol	10	20.50±1.5	53±0
	100	21.50±1.5	<sup>c</sup> 69.50±12.5
	500	27.50±2.5	40±2
	1000	22.50±0.5	48±6
	2500	18±3	<sup>t</sup> 32.50±0.5
Spontan kontrol	100	26.40±2.69	41.83±11.31
DMSO kontrol	100	32.67±5.16	45.83±10.86
2-Amino floren	1000	-	731±138.1
4-nitro-o-fenilendiamin	200	1174.44±61.28	-

4-Nitro-o-Fenilendiamin, TA 98 için S9 gerektirmeyen, 2-Aminofluorene, TA 98 için S9 gerektiren pozitif kontrol, DMSO, çözücü kontrolü olarak kullanılmıştır. Her doz, üç paralel plak ile aynı anda test edilerek farklı zamanlarda yapılan iki deneyin ortalamaları alınıp (ort.±st.h) tabloya kaydedilmiştir (a: P<0.001, b: P<0.01, c: P<0.05, t: toksik etkili).

Hem TA 97 hem de TA 98 suşları ile yapılan S9 (-) deneylerinin sonucunda, tüm maddelerin uygulandığı plaklarda DMSO (solvent kontrol) revertant sayısı aşılamamıştır. S9 (+) sonuçlarında ise TA 97 için, II. madde (fenantroimidazol) hariç diğer 4 madde' nin, TA 98 için ise I. (2-metil-fenantroimidazol) ve II. (fenantroimidazol) maddeler hariç diğer 3 maddenin mutajenik etkisine rastlanmamıştır. TA 97 için I. maddenin (2-metil-fenantroimidazol) 10µg/plak ve 2500µg/plak, IV. maddenin (2-(3-kloro fenil) fenantroimidazol) 100µg/plak ve V. maddenin (2-(4-kloro fenil) fenantroimidazol) 500µg/plak dozlarında spontan revertantların sayısının altında toksik etkiyi gösteren sonuçlar elde edilmiştir. TA 98 için ise S9 (+) sonuçlarında III. maddenin tüm dozlarında, IV. maddenin 1000µg/plak ve V. maddenin 2500µg/plak dozlarında toksik etkiyi gösteren spontan revertantlardan düşük sonuçlara rastlanmıştır.

TA 97 ile S9 (+) ortamda yapılan deneylerde II. madde olan fenantroimidazol bileşiğinde istatistiksel açıdan 100µg/plak ve 1000µg/plak dozlarında ( $P<0.001$ ), 500µg/plak dozunda ( $P<0.01$ ) ve 2500µg/plak dozunda ( $P<0.05$ ) anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. TA 98' in sonuçlarında ise I. ve II. maddeler olan 2-metil-fenantroimidazol ve fenantroimidazol bileşiklerinde anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre, I. maddenin 100µg/plak ve 500µg/plak dozlarında  $P<0.05$ , 1000µg/plak dozunda  $P<0.01$  anlamlı değeri, II. maddenin 10µg/plak, dozunda  $P<0.001$  değerine rastlanırken 100µg/plak, 500µg/plak ve 2500µg/plak dozlarında  $P<0.05$  değeri gözlenmiştir. Ayrıca V. maddenin 100µg/plak dozunda da  $P<0.05$  değerinde anlamlı bir sonuç gözlenmiştir.

Deneylerde spontan ve DMSO revertant koloni sayıları her iki suşta genellikle S9 (+) ortamında biraz artış gösterirken, yalnızca TA 97' de S9 (+) ortamında, DMSO revertant koloni sayısında çok az bir azalma gözlenmiştir.

TA 97 suşu için kullandığımız S9 gerektirmeyen pozitif mutajen olan sodyum azid ve S9 gerektiren pozitif mutajen 2-amino fluorene, DMSO ile elde edilen revertant sayısını aşmıştır. (Tablo 3.2. ve 3.3).

TA 98 suşu için kullanılan pozitif mutajen 4-nitro-o-fenilendiamin ve S9 gerektiren deneylerin pozitif mutajen olan 2-Aminofloren ile elde edilen sonuçlar, DMSO revertant sayısını oldukça fazla aşmıştır (Tablo 3.2. ve 3.3.).

#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde, çok miktarda kimyasal maddeye maruz kaldığımız için bu kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılması oldukça önem kazanmıştır (6). Farklı ortamları (hava, su, toprak) kirleten iç ve dış etkenlerin olup olmadığı, bu kirlilik derecesinin Dünya Sağlık Örgütünün belirlediği sınırlar içinde bulunup bulunmadığı ve olası mutajenik etkileri çeşitli test yöntemleriyle araştırılmaktadır (2).

Örneğin bir çalışmada, denizlerin kirlilik derecelerini ölçmek amacıyla midyeler, *E.coli* ve *Salmonella typhimurium* suşları ile mutasyon oranı araştırılmış ve denize atılan endüstriyel atıklar, ağır metaller, hidrokarbonlu atıklar ve diğer çevre kirleticilerinin seçilen bu canlı grupları üzerindeki toksik ve mutajenik etkileri gösterilmiştir (17,44,49), Diğer bir çok çalışmada, ağır sanayii'nin sebep olduğu çevre kirlenmesi ve dolayısıyla da mutajenik etkileri *Salmonella typhimurium* TA 98 suşu ile tespit edilmiştir (16,35,36,40-42,46-48,50,51,54,71).

Ev temizleme solusyonlarında bulunan Rokanol B<sub>2</sub> ve Rokamid R<sub>1</sub> gibi yüzeysel akyivasyonu sağlayan bu iki maddeye maruz kalan kişilerde mutajenite potansiyeline sahip olup olmadıkları TA 97, 98, 100 suşları kullanılarak Ames testi ile araştırılmıştır. Rokamid R<sub>1</sub>' in Ames, MN, SCE testi ile mutajenik bir etkiye sahip olmadığı gözlenmiştir. (10). Besin koruyucusu olarak kullanılan AA (Arakidonik asit) Salmonella TA 98 suşu ile test edilmiştir ve mutajeniteyi inhibe ettiği T.A. HO tarafından bildirilmiştir (67).

Tıp, Eczacılık ve kozmetik alanlarında geliştirilen kimyasal maddelerin herhangi bir ilaç yapımında kullanılmadan önce mutlaka mutajenik özelliklerinin bilinmesi gerekmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) bunu zorunlu kılmıştır (2). Bu amaçla birçok kuruluş, çeşitli kimyasalları farklı test yöntemleriyle test etmektedir. (7,11,58,59,62). İnsan

sağlığı ile ilgili olarak geliştirilmiş kimyasalların mutajenik etkilerinin sadece tek bir test yöntemiyle test edilmesi yeterli olmamaktadır, çünkü farklı test yöntemleri yada farklı organizmalar kullanılarak yapılan testler farklı sonuçlar verebilmektedir (11,19).

Bu çalışmada, Eczacılık fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim dalı'ndan sağlanan 1-sübstitüe 1H-fenantro [9,10-d]-imidazol bileşikleri' nin mutajenik yada genotoksik potansiyelleri Ames testi ile ölçüldü (6). Bu bileşikler ilaç başlangıç maddesi olarak düşünülmüştür. Bu sebeple bileşiklerin genotoksik potansiyellerinin belirlenmesi önem kazanmıştır.

Bulgular kısmında tek tek ele alınan değerlerde, TA98 suşunun TA97 suşuna göre, test ettiğimiz 1-sübstitüe 1H-fenantro [9.10-d]-imidazol bileşikleri' nin 2 ayrı türevi olan I. ve II. madde ile daha fazla dönüşüm yaptığı gözlenmiştir. TA 97 ve TA98 suşu çeşitli çerçeve kayması mutajenlerinin teşhisinde kullanılır. Çerçeve kayması mutajenleri, DNA' nın sıcak noktalarında yada tekrarlanan dizilerinde, sık sık yanlış eşleşmeler meydana getirebilirler. Histidin sentezi için okunan çerçevenin tamamı yer değiştirdiği için bir çerçeve kayması mutasyonu ile sonuçlanır. TA97 suşu, diğerine ilave olarak eksik sitozin bölgesinin yakınında nöbetleşe değişen –GC- baz çiftlerinden oluşan ikinci bir sıcak nokta daha içerir. Bu sebeple, bazı çerçeve kayması mutajenlerine karşı daha hassastır (6). 2 nolu test bileşiği TA 97 ve TA 98 suşlarının her ikisi ile denendiğinde mutajen özellik göstermiştir. Bu test suşlarının her ikisi de çerçeve kayması mutasyonuna sahip olduğundan dolayı 2 nolu bileşiğin çerçeve kayması mutajeni olduğu düşünülebilir. Diğer yandan S9 fraksiyonu katılarak yapılan deneylerde S9 kullanmadan yapılan deneylere oranla her iki suşta da daha fazla geri dönüşüm olduğu gözlenmiştir. Bu sonuca dayanarak 1-sübstitüe III-fenantro [9.10-d]-imidazol bileşikleri' nin canlı vücuduna



girdiğinde metabolik reaksiyonlar sonucunda oluşan metabolitlerinin DNA ile etkileşimini bir miktar arttırdığı düşünülebilir.

Fenantroimidazol yapısı, taşıdığı doymamış gruplar (fenil grupları) ile yağimsı karakterde bir maddedir. Bu madde, yine yağimsı karakterde olan bakteri hücre zarından kolaylıkla hücrenin içine geçebilmektedir. Bu geçiş hızı yapının süstitüsüyonu ile yakından ilgilidir. Deney sonuçlarına göre nonsüstitüe yapı (fenantroimidazol), hem yağda erirliği hemde sterik özellikleri nedeni ile en kolay geçişi sağlayabilmektedir. 2 nolu konuma yerleştirilen fenil grubu yağda çözünürlüğü arttırmakta ancak etkileşmede sterik olarak engel teşkil etmektedir. Fenil grubunun taşıdığı yağda çözünür grupların (Mg, Cl, Br) ana yapıya oranla membrandan geçiş hızında azalma meydana getirdiği düşünülmekte ancak bu hızın fenil grubuna bağlanan suda çözünür gruplarla (-OH, -OCH<sub>3</sub>) daha da azaldığı görülmektedir. Test bileşenlerinin bakteri hücre duvarından geçmiş olması direk olarak DNA ile etkileşeceğini göstermez. Bileşiğin sitoplazmik konsantrasyonu yüksek olsa dahi sitoplazmik alanda yada bakteriyal genomda bulunan özgül bağlanma bölgeleriyle kompleks oluşturamayabilir. Dolayısıyla da DNA ile etkileşmesi görülmez. Bizim sonuçlarımızda 2-metil-fenantroimidazol ve hiçbir kimyasal grup eklenmemiş fenantroimidazol bileşiğinde mutajenik özellik gözlenmiş diğer bileşiklerde böyle bir sonuca rastlanmamıştır. Bu da bize, 2-metil-fenantroimidazol ve fenantroimidazol bileşiklerinin, suşların 'histidinol dehidrogenaz' enziminini kodlayan His D<sup>+</sup> geninde bulunan mutasyon bölgesindeki özgül bölgeler (tekrar eden Sitozin bazlarının olduğu bölge) ile uyum sağlayarak bakterilerde ikinci bir mutasyona sebep olduğunu ve His<sup>+</sup> haline dönüştürdüğünü, bileşiğe eklenen diğer grupların bu uyumu bozduğu için bileşiğin DNA ile etkileşimini engellemiş olabileceğini düşündürmektedir.

İmidazolün pKa değeri 7 civarındadır. Bu onun için değişik pH ortamlarında elektron alış verişini kolaylaştırır. İmidazol, Nishie' ye göre (102) düşük toksisiteye sahip olan bir madde olup LD<sub>50</sub> değeri 1.88g/kg olarak bildirilmiştir (14). İmidazol, basit bir heterosiklik moleküldür ve değişik organik bileşikler oluşturabilir. Vücuda girdikten sonra metabolik yollarla hidantoin, hidantoik asit, N-asetilimidazol' a dönüşmekte ve üre ile birlikte dışarı atılmaktadır (14). İmidazol ve bunun metabolik türevleri olan hidantoin, hidantoik asit, N-asetilimidazol ve histamin' nin mutajenik ve karsinojenik etkilerinin olmadığı *iv vivo* ve *in vitro* testlerle bulunmuştur (14). Ancak imidazol' ün başka elementlerle (bakır, kobalt) birlikte bulunduğu durumlarda imidazolün etkisini arttırdığı , ayrıca bazı imidazol türevleri olan 2-merkpto imidazol' ün ve burada sayamayacağımız 48 imidazol türevinin mutajenik etkisinin olduğu kanıtlanmıştır (7,73,95-99,102-105).

Saç boyaları, pestisitler ve fungusitlerin yapısında bulunan bazı imidazol halkası içeren bileşiklerden olan DAP (2,3, diaminofenazin) ve AHP (2-amino 3- hidroksifenazin) Ames yöntemiyle test edilmiş ve TA 98 suşunda S9 varlığında ve yokluğunda maddelerin oldukça mutajen oldukları (P≤0.001) bulunmuştur (68). Bizim sonuçlarımızla bu sonuçların uyumsuz olmasının sebebi, DAP ve AHP' nin içerdiği imidazole ilave olarak içerdikleri diğer grupların bu maddelerin mutajenik özelliklerini arttırması olabilir.

Britvic ve arkadaşları (47), metimidazol' ün *Salmonella* kullanılarak Ames yönteminde test etmişler ve metabolik aktivasyon için sazan balığının sindirim bezlerinden elde ettikleri fraksiyonu kullanmışlardır. Sonuçta, TA 98 suşunda metimidazol etkisiyle yüksek oranda geri dönüşüm gözlenmiştir. Pişirilmiş besinlerden elde edilebilen karsinojenlerden olan IQ (2-aminno-3-metilimidazo[4,5-f]quinolin) bileşiğinin üç sentetik izomerinin mutajenik etkisi TA 98 suşu ile test edilmiş ve bu maddenin yüksek mutajen

özelliğe olduğu görülmüştür. Bu madde, bu tip çalışmalarda pozitif mutajen olarak kullanılmaktadır (57).

Bir 5-nitroimidazol olan antiprotozoal ilaçlarda bulunan metronidazol (MNZ) ve tirinidazol (TNZ), bir baz çifti değişimi suşu olan TA 100 ile Gupta ve arkadaşları tarafından (66) test edilmiştir. TNZ' nin ( $P < 0.005$ ) ve MNZ' nin ( $P < 0.001$ ) her ikisinin de mutajen olduğu bulunmuştur. Başka bir çalışmada da, TNZ mutajenik olarak bulunmuştur (98). 4-Nitro-o-fenilendiamin, TA 98 için pozitif mutajen olarak kullanılmış ve S9 içermeyen deneylerindeki sonuçları bizim sonuçlarımız ile benzerlik göstermektedir (9).

Mutajenik ve karsinojenik potansiyeli bulunan 16 aminoimidazo-azoarenler' in nitrenium iyonlarının DNA' ya bağlanarak etki ettiği bulunmuştur (99). Benomyl ve bunun aktif metaboliti olan carbendazim, Mikronükleus testi ile test edilmiş ve her iki bileşik de MN oluşumu bakımından pozitif sonuçlar vermiştir. Bu imidazol içeren iki bileşiğin DNA' da klastrojenik etkisinin olduğu bulunmuştur (100).

Bizim yaptığımız çalışmada, 2-Süstitüe 1H-fenantro[9,10-d]-imidazol bileşiğinin 3 türevinde mutajenik özelliğe rastlanmamış ( $P > 0.05$ ) ve 2 türevi olan 2-metil-fenantroimidazol ve fenantroimidazol' ün zayıf mutajenik bir etkiye sahip olduğu sonucu ortaya çıkmıştır ( $P = 0.018$ ). Bu sonuç, Forster' in sonuçları ile desteklenmiştir. Forster, imidazol ve metabolitlerini *iv vivo* ve *in vitro* test etmiş (14) ve testlerin tümünde negatif sonuçlar almıştır.

2,4,5 trifenil imidazol bileşiği Ayaz tarafından Ames testi ile test edilmiş ve pozitif sonuçlar alınmıştır (63). Aynı madde Saleh tarafından Mikronükleus testi ile denenmiş ve yine MN oluşumunu arttırdığı bulunmuştur (22). Aynı zamanda i.p. yolla enjekte edildiğinde değişik dokularda defektlere sebep olduğu saptanmıştır (106). Bu

sonuçların bizim sonuçlarla farklı olmasının sebebi, 2,4,5-trifenilimidazol bileşiğinin bizim kullandığımız bileşikten farklı bir moleküler yapıya sahip olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Test sonuçlarımıza göre 2-Süstitüe 1H-fenantro [9,10-d] imidazol bileşiğinin 2 türevi olan 2-metil-fenantroimidazol ve fenantroimidazol bileşiklerinin mutajen özelliğe sahip olabileceği düşünülebilir fakat bu maddeler farklı genotipik özelliğe sahip test suşları ile ve farklı organizma gruplarının kullanıldığı farklı test yöntemleriyle de test edildikten sonra genel bir sonuca gidilmelidir. Negatif sonuçlar aldığımız diğer test maddelerinin de tekrar farklı genotipik özelliğe sahip suşlarla test edilmesi gerekmektedir. Çalışmanın bundan sonraki aşaması bu yönde devam edecektir.

## KAYNAKLAR

1. Review of Potentially Harmful Substances Carcinogens, *Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution (Gesamp)*. World Health Organization, Reports and Studies, No. 46.; Geneva, 1991.
2. Mediterranean Action Plan Med. Pol. United Nations Environment Programme (UNEP), *Assessment of the State of Pollution in the Mediterranean sea by Carcinogenic, Mutagenic and Teratogenic Substances*. World Health Organization, MAP Technical Reports Series No. 92, Athens, 1995.
3. LÉONARD, A., Gerber, G.B., *Mutagenicity, carcinogenicity and Teratogenicity of Antimony Compounds*. *Mutat. Res.*, 366,1-8,1996.
4. WYSZYŃSKA, K., Liro, W.C., *The Use of Cytogenetic Tests For Evaluation of Mutagenic Properties of Selected Dyes Applied In Textile and Cosmetic Industry*. *Genetica Polonica*, Vol. 32, No. 3, 1991.
5. GALLI, A., Schiestl, R.S., *Effects of Salmonella Assay Negative and Positive Carcinogens on Intrachromosomal Recombination in G<sub>1</sub>- Arrested Yeast Cells*. *Mutat. Res.*, 370, 209-221, 1996.
6. MARON, D.R. and Ames, B.N., *Revised Methods For the Salmonella Mutagenicity Test*. *Mutat. Res.*, 113, 173-215, 1983.
7. DEBNATH, A.K., Compadre, R.L., Debnath, G., Shusterman, A.J., Hansch, G., *Structure-Activity Relationship of Mutagenic Aromatic and Heteroaromatic Nitro Compounds. Correlation with Molecular Orbital Energies and Hydrophobicity*. *Journal of Medicinal Chemistry*, Vol. 34, No. 2, 786-797, 1991.
8. TROSKO, J.E., *Challenge to the Simple Paradigm that 'Carcinogens' are 'mutagens' and to the in vitro and in vivo Assays Used to Test the Paradigm*. *Mutat. Res.*, 373, 245-249, 1997.
9. WYSZYŃSKA, K., Przybojewska, B., Spiechowicz, E., Liro, W.C., Dziubaltowska, E., Rydzynski, K., *Cyanuric Chloride Has No Genotoxic and Mutagenic Properties In Bacteria and Bone Marrow Cells*. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, Vol. 7, No. 3, 281-289, 1994.
10. SPIECHOWICZ, E.J., Boranski, B., Dziubaltowska, E., Wyszynska, K., Przybojewska, B., Liro, W.C., Przondo, J., *Genotoxicity Assessment of Rokanol B<sub>2</sub> and Rokamid R<sub>1</sub>*. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, Vol. 7, No. 2, 51-57, 1994.

### KAYNAKLAR (devamı)

11. LEE, H., Bian, S.S., Chen, Y.L., *Genotoxicity of 1,3-dithiane and 1,4—dithiane in the CHO/SCE Assay and the Salmonella/ Microsomal Test*. Mutat. Res., 312, 213-218, 1994.
12. BHUNYA, S.P., Jena, G.B., *Studies on the Genotoxicity of Monocrotophospat and organophosphate Incecticide, in the Chick in vivo Test System*. Mutat. Res., 293, 231-239,1993.
13. MAJONE, F., Brunetti, R., Fumagalli, O., Gabriela, M., and Levis, A.g., *Induction of Micronuclei by Mitomycin C and Colchicine in the Marine Mussel Mytilus Galloprovincialis*. Mutat. Res., 244, 147-151, 1990.
14. FORSTER, R., Blowers, S.D., Cinelli, S., Marquardt, H. and Westendorf, J., *Mutagenicity Testing of Imidazole and Related Compounds*. Mutat. Res., 292, 71-79, 1992.
15. BAKALE, G., Mc Creary, R.D., *Response of  $k_e$  Test to NCI/NTP-Screaned Chemicals. Non- Genotoxic Carcinogens and Genotoxic Non- Carcinogenens. Carcinogenesis*, Vol. 11, No. 10, 1811-1818, 1990.
16. JARVIS, A.S., Honeycutt, M.E., Mc Farland, V.A., Bulich, A.A. and Bounds, H.C., *A Comparison of the Ames Assay and Mutatox in Assessing the Mutagenic Potential of Contaminated Dredged Sediment*. Ecotoxicology and Envirinmental Safety, 33, 193-200, 1996.
17. GRIFFOLL, M., Solanas, A.M. and Bayona, J.M., *Characterization of Genotoxic Compounds in Sediments by Mass Spectrometric Techniques Combined with Salmonella/ micrososome Test*. Arch. Environ . Contam. Toxicol., 19, 175-184, 1990.
18. JOSEPHY, P.D., Gruz, P., Nohmi, T., *Recent advences in the Construction of Bacterial Genotoxicity Assays*. Mutat. Res., 386, 1-23, 1997.
19. HAMASAKI, T., Sato, T., Nagase, H., Kito, H., *The Genotoxicity of Organotin Compounds in SOS Chromotest and Rec-Assay*. Mutat. Res., 280, 195-203, 1992.
20. HAYASHI, M., Tice, R.R., Mac Gregor, J.T., Anderson, D., Blakey, D.H., Volders, M.K., Oleson, F.B., Pacchierotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Sutov, S., Vannier, B., *In vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay*. Mutat. Res., 312, 293-304, 1994.
21. KALKAN, N., *Ames Test Yöntemi ile Dört Ayırı Sentetik Quinoxalin Türevinin farklı türevinin Farklı Dozlardaki Mutajenik Aktivitesinin ve Mutajenliğinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 1996.

### KAYNAKLAR (devamı)

22. SALEH, K., *Mikronükleus Testi ile Bazı Kimyasal Maddelerin ve Çevre Kirleticilerinin Neden Olduğu Klastrojenik Etkilerinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 1997.
23. DAROUDI, F. and Natarajan, A.T., *Induction of Sister Chromatid Exchanges, Micromuclei and Gene Mutations by Indirectly Acting promutagens Using Human Hepatoma Cells as an Activation System*. *Atla.*, 22, 445-453, 1994.
24. JAGDT, B., Warncke, K., Aver, H. and Rüdiger, H.W., *Sleep Deprivation Does Not Induce Sister Chromatid Exchange in Humans*. *Mutat. Res.*, 361, 11-15, 1996.
25. MENG, Z. and Zhang, L., *Cytogenetic Damage Induced in Lymphocytes by Sodium Bisulfite*. *Mutat. Res.*, 298, 63-69, 1992.
26. TUTGUN, S., *Kadın ve Erkeklerde Yaşlanmayla Birlikte Artan Mikronükleus Oranının Saptanması*. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 1996.
27. ZHULEVA, L.Y. and Dubinin, N.P., *Use of the Micronucleus Test For Ecological Monitoring in Astrachan Oblast*. *ГЕНЕТИКА*, Vol. 30, No. 7, 999-1004, 1994.
28. SCHMID, W., *The Micronucleus Test*. *Mutat. Res.*, 31, 9-15, 1975.
29. SLAVOTINEK, A., Thomson, A., Eynaud, P., Perry, P., Michael, S.C. and Eden, O.B., *The Frequency of Micromuclei, in Bone Marrow Erythroblasts During The Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leucaemia*. *Mutat. Res.*, 303, 11-18, 1993.
30. HEDDLE, L.A., *Arapid in vivo Test For Chromosomal Damage*. *Mutaat. Res.*, 18, 187-190, 1973.
31. CHETALAT, A.A., Albertini, S. and Gocke, E., *The Photomutagenicity of Floroquindones in Test For Gene Mutation, Chromosomal Abberation, Gene Conversiyon and DNA Breakage (Comet Assay)*. *Mutagen.*, 5 (11), 497-504, 1996.
32. KASAMATSU, T., Kohda, K. and Kawazoa, Y., *Comparison of Chemically Induced DNA Breakage in Cellular and Subcellular Systems Using the Comet Assay*. *Mutat. Res.*, 369, 1-6, 1996.
33. HERA, C. and Pueyo, C., *Response of the L-Arabinose Forward Mutation Assay of Salmonella Typhimurium to Frameshift-Type Mutagens*. *Mutat. Res.*, 203, 39-45, 1988.

**KAYNAKLAR (devamı)**

34. WISTREICH, G.A., *Microbiology Laboratory, Fundamentals and Application*. East los Angeles Collage, New Jersey, 1997.
35. ABE, A., Urano, K., *Influence of Chemicals Commonly Found in a Water Environment on the Salmonella Mutagenicity Test*. The Science of the Total Environment., 153, 169-175, 1994.
36. ALZUET, P.R., Gaspes, E., Ronco, A.E., *Mutagenicity of Environmental Samples From an Industrialized Area of the Rio De La Plata Estuary Using the Salmonella / Mikrosomal Assay*. Environ. Toxicol. Water Quality., Vol. 11, 231-236, 1996.
37. BONNEUE, D., Thybaund, V., Melcionn, C., Bouhet, F., Cordier, A., *Optimum Associations of Tester Strains For Maximum Detection of Mutagenic Compounds in the Ames Test*. Mutat. Res., 252, 269-279, 1991.
38. TORTORA, Funke, Case, *Microbiology in Introduction*, Fourth Edition, 207-215, 1992.
39. ALCAMA, I.E., *Fundamentals of Mikrobiology*, Third Edition, 175-185, 1991.
40. JOHNSON, B.T., *Genotoxicity Testing with Fish Hepatic S9 For Evaluation of Complex Mixtures in the Aquatic Environment: The Use of Chanel Catfish as a Model*. Aquatic Toxicology, 27, 293-314, 1993.
41. GRIFOLL, M., Solanas, A.M. and bayona, J.M., *Bioassay-Directed Chemical characterizasyon of Genotoxic agents in the Dissolved and Particulate Water Phases of the Besos and Llobregat River (Barcelona, Spain)*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 23, 19-25, 1992.
42. MACCUBBİN, A.E., Ersing, N., Frank, M.N., *Mutagenicity of Sediments From the Detroit River*. J. Great Lakes Res., 17 (3), 314-321, 1991.
43. JUNG, R., Engelhart, G., Herbolt, B., Jöckh, R., Müller, W., *Collaborative Study of Mutagenicity with salmonella Typhimurium TA 102*. Mutat. Res., 278, 265-270, 1992.
44. PARRY, J.M. TWEATS, D.J., Al-Mossawi, M.A.J., *Monitoring the Marine Environment For Mutagens*. Nature, Vol. 264, December 9, 538-540, 1976.
45. ARINÇ, E. and Şen, A., *Effect of in vivo Benzo(a)pyrene Treatment on Liver Microsomal Mixed-Function Oxidase Activaties of Gilthead Seabrem (Spararus Aurata)*. Comp. Biochem. Physiol., Vol. 107C, No. 3, 405-414, 1994.



## KAYNAKLAR (devamı)

46. HOUK, V.S., De Marini, D.M., *Use of the Microscreen Phage-Induction Assay to Assess the Genotoxicity of 14 Hazardous Industrial Wastes*. Environmental and Molecular Mutagenesis, 11, 13-29, 1988.
47. BRITVIC, S. and Kurelec, B., *Selective Activation of Carcinogenic Aromatic Amines To Bacterial Mutagens in the Marine Mussel Mytilus Galloprovincialis*. Comp. Biochem. Physiol., Vol. 85C, No. 1, 111-114, 1986.
48. FERNANDEZ, P., Grifoll, M., Solanas, A.M., Bayona, J.M. and Albalges, J., *Bioassay-Directed Chemical Analysis of Genotoxic Components in Coastal Sediments*. Environn. Sci. Technol., Vol. 26, No.4, 817-829, 1992.
49. KURELEC, B. and Krča, S., *Glucuronines in Mussel Mytilus Galloprovincialis as a Possible Biomonitor of Environmental Carcinogens*. Comp. Biochem. Physiol., Vol. 92C, No. 2, 371-376, 1989.
50. HAMASAKI, T., Sato, T., Nagase, H. and Kito, H., *The Mutagenicity of Organotin Compounds as Environmental Pollutants*. Mutat. Res., 300, 265-271, 1993.
51. KUSAMRAN, W.R., Wakabayashi, K., Ogori, A., Tepsuwan, A., Nagao, M., Sugimura, T., *Mutagenicities of Bangkok and Tokyo River Waters*. Mutat. Res. 325, 99-104, 1994.
52. FRANCIASSO, M.N., Leone, R., Brunello, F., Monostra, C., Tezza, F. and Storti, P.W., *Mutagenic activity in Wastewater Concentrates From Dye Plants*. Mutat. Res., 298, 91-95, 1992.
53. YAMADA, M., Aguirre, J.J.E., Watanabe, M., Matsui, K., Sofuni, T., Nohmi, T., *Targeted disruption of the Gene Encoding the Classical Nitroreductase enzyme in Salmonella typhimurium Ames Test Strains TA 1535 and TA 1538*. Mutat. Res., 375, 9-17, 1997.
54. BERNACCHI, F., Ponzanelli, I., Barale, R., Loprieno, N., *Mutagenic Activity of Some Coal-Derived Humic Compounds Evaluated by the Ames Test*. Mutat. Res., 369, 107-112, 1996.
55. LEVIN, D.E., Hollstein, M., Christman, M.F., Schwieters, E.A., Ames, B.N., *A New Salmonella Tester Strain (TA 102) with A-Tbase Pairs at the Site of Mutation Detects Oxidative Mutagens*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol. 79, 7445-7449, December, 1982.
56. HANSCH, C., *Structure-Activity Relationships of Chemical mutagens and Carcinogens*. The science of the Total Environment , 109/110, 17-29, 1991.

### KAYNAKLAR (devamı)

57. VIKSE, R., Klungsøy, L. and Grivas, S., *Mutagenic Activity of Three Synthetic Isomers of the Food Carcinogen 2-Amino-3-methylimidazo[4.5-f]quinoline (IQ) in the Ames Test*. Mutat. Res., 319, 273-278, 1993.
58. DEBNATH, A.K., Hansch, C., *Mechanistic Interpretation of the Genotoxicity of Nitrofurans (Antibacterial Agents) Using Quantitative Structure-Activity Relationships and Comparative Molecular Field Analysis*. J. Med. Chem., 36, 1007-1016, 1993.
59. CARIELLO, N.F., Piegorsch, W.W., *The Ames Test: The Two-Fold Rule Revisited*. Mutat. Res., 369, 23-31, 1996.
60. SMITH, C.J., Mc Kams, S.C., Davis, R.A., Livingston, S.D., Bombick, B.R., Avalos, J.T., Morgan, W.T. Doolittle, D.J., *Human Urine Mutagenicity Study Comparing Cigarettes Which Burn or Primarily Heat Tobacco*. Mutat. Res. 361, 1-9, 1996.
62. LUMBLEY, C.E., Parkinson, C. and Walker, S.R., *An International Appraisal of the Minimum Duration of Chronic Animal Toxicity Studies*. Human & Experimental toxicology, 11, 155-162, 1992.
63. AYAZ, B., *2,4,5-Tri (Substitüe) Fenil İmidazol ve Türevlerinin Mutajenik Aktivitesinin Ames/Salmonella/Mikrozom testi ile araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 1993.
64. UENOBE, F., Nakamura, S.I., Miyazawa, M., *Antimutajenik Effect of Reveratrol against Trp-P-1*. Mutat. Res., 373, 197-200, 1997.
65. ZÖHRER, E., Albertini, S., Gocke, E., Knasmüller, S., *Mutation Induction and Mutation Spectra of S.typhimurium TA 100 After Exposure to Isohistidines*. Mutat. Res., 356, 155-161, 1996.
66. GUPTA, R.L., Vats, V., Juneja, T.R., *Activation of Tinidazole, an Antiprotozoal Drug to a Mutagen by Mamalian Liver S9*. Mutat. Res., 3701, 195-201, 1996.
67. HO, T.A., Cartts, T.M., Rowland, I.R., Alldrick, A.T., *Inhibition of the Metabolism of Mutagens Occurring in Food by Arachidonic Acid*. Mutat. Res., 269, 279-284, 1992.
68. WAGNER, E.D., Wasilewska, A.C., Connolly, S., Plewa, M.J., *Mutagenic Analysis of 2,3-diaminophenazine and 2-amino-3-hydroxyphenazine in Salmonella Strains Expressing different Levels of o-acetyltransferase with and without Plasmid and Mamalian Activation*. Mutat. Res. 372, 65-74, 1996.

## KAYNAKLAR (devamı)

69. DEBNATH, A.K., Lopez de Compedre, R.L., Hansch, C., *Mutagenicity of quinolines in salmonella typhimurium Ta 100, A QSAR Study Based on Hydrophobicity and Molecular Orbital Determinants*. Mutat. Res., 280, 55-65, 1992.
70. WATANABE, K., Sakamoto, K., Sasaki, T., *Comparisons Chemically-Induced Mutagenicity Among Four Bacterial Strainns, Salmonella typhimurium TA 102 and TA 2638 and E.coli WP2/pKM101 and WP2A/pKM101: Collaborative Study I*. Mutat. Res., 361, 143-155, 1996.
71. OSBORNE, L.L., Davies, R.W., Dixon, K.R., Moor, R.L., *Mutagenic Activity of Fish and Sediments in the Sheep River, Alberta*. Water. Res., Vol. 16, 899-902, 1982.
72. ALBERTINI, S. and Gocke, E., *Renin Inhibitors as an Example of Presumptive Irrelevant Positive Findings in the Salmonella/Mamalian Microsome Assay*. Mutat. Res., 298, 237-246, 1993.
73. DEBNATH, A.K., Shustterman, A.J., Lopez de Compedre, R.L., Hansch, C., *The Importance of the Hydrophobic Interaction in the Mutagenicity of Organic Compounds*. Mutat. Res., 305, 63-72, 1994.
74. ERKAN, S., *Moleküler Biyoloji Bornova / İzmir*, 1992.
75. AKMAN, M., *Bakteri Genetiği*. 2. Baskı, Cumhuriyet Üniversitesi Yayını, Sivas, 1983.
76. DEMİRSOY, A., *Yaşamın Temel Kuralları/Genel Biyoloji*. Cilt. 1, Kısım. 1, Ankara, 1992.
77. MOTULSKY, V., *Human Genetics, Problems and Aproach*. Second, Completely Revised, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, new York, Tokyo, 1996.
78. STRACHAN, T., Read, A.P., *Human Molecular Genetics*. Bios Scientific Publishers Limited, 1996.
79. SUZUKI, Griffiths, Miller, Lewontin, *An Introduction to Genetic Analysis*. Fourth Edition, New York, 1989.
80. THERMAN, E., *Human Chromosomes, Structure, Behavior, Effects*. Second Edition, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, new York, Tokyo, 1986.
81. ŞAHİN, Y., *Genel Biyoloji II*. Bilim Teknik Yayınevi, 1995.
82. ROONEY, D.E., Czepulkowski, B.H., *Human Genetics Apractical Approach*. Vol. I, 1992.

## KAYNAKLAR (devamı)

83. GARDNER, E.S., Simmon, M.J., Snustad, D.P., *Principles of Genetics*. Eighth edition, pp. 314-315, New York, 1991.
84. WATSON, J.D., Gilman, M., Witowski, J., Zoller, M., *Recombinant DNA*. Second Edition, 1997.
85. BAĞCI, H., *Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Yaz Okulu Moleküler Biyoloji Ders Notları*. Ankara, 1985.
86. ROLLAS, S., *İlaçların Metabolizması (Biyotransformasyon)*. Marmara Üniversitesi Yayını No. 525, İstanbul, 1992.
87. KAYAALP, O., *Tıbbi Farmakoloji*. Hacettepe Taş Yayınları, Ankara, 1995.
88. TUĞLULAR, I. (Editör), *İlaç ve Kinetiği*. Nisan, Bilgehan Matbaa, Bornova/İzmir, 1981.
89. DÖKMECİ, İ., *Toksikoloji, Akut Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi*. 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, 1994.
90. VURAL, N., *Toksikoloji*. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları, No. 56, Ankara, 1984.
91. ÜN, R., *Halkalı Organik Bileşikler*. İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 1977.
92. PARADHAN, S.N., Maikel, R.R. and Dulta, S.N., *Pharmacology in Medicine; Principles and Practice*. 1996.
93. LINSTROMBERG, W.W., *Modern Organik Kimya* (Çev: Uyar, T.). Hacettepe Taş Kitapçılık, 1983.
94. BAYTOP, T., *Farmakognazi*. İstanbul Üniversitesi Yayını, İstanbul, 1980.
95. ÖZDEMİR, A., *Bazı 2-Süstitüe 1H-Fenanntro [9,10-d]-İmidazol Bileşiklerinin Sentezleri, Yapı aydınlatmaları ve Fizikokimyasal Parametrelerinin tayinleri Üzerinde Çalışmalar*. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 1996.
96. HIROSE, M., Iwata, S., Ito, E., Nihro, Y., Takahasi, S., Mizoguchi, Y., Miki, T., Satoh, T., Ito, N., Shirai, T., *Strong Anti-Mutagenic Activity of Novel Lipophilic Antioxidant 1-O-hexyl-2,3,5-TrimethylhydroQuinone Against Heterocyclic Aminne-Induced Mutagenesis in the Ames Assay and its Effect on Metabolic Activation of 2-Amino-6-Methylidpyrido[1,2-a:3',-d] Imidazole (glu-p-1)*. *Carcinogenesis*, Sep., 16 (9), 2227-32, 1995.

## KAYNAKLAR (devamı)

97. YEN, G.C., Chen, H.Y., *Relationship between Antimutagenic Activity and ajor Components of Various Teas*. Mutagenesis, Jan; 11 (1), 37-41, 1996.
98. ESPINOSA, A.J.J., de la Torre, R.A., Lares, A.I., Rubido, J., Dorado, V., Wong, M., Hernandez, J.M., *Bacterial Mutagens in the Urine of Patients Under Tinidazole Treatment*. Mutat. Res., Feb. 29, 359 (2), 133-40, 1996.
99. HATCH, F.T., Colvin, M.E., Seidl, E.T., *Structural and Quantum Chemical Factors Affecting Mutagenic Potency of Aminoimidazo-azaaranes*. Environ. Mol. Mutagen., 27 (4), 314-30, 1996.
100. SARRIF, A.M., Bentley, K.S., Fu, L.J., O'Neil, R.M., Reynolds, V.L., Stahl, R.G., *Evaluation of Benomyl and Carbendazim in the in vivo Aneuploidy/Micronucleus Assay in BDF1 Mouse Bone*. Mutat. Res., OCT. 1, 310 (1), 143-9, 1994.
101. ORTIZ, A.I., Pollastrini, M.T., Barea, M., Ordonez, D., *Bacterial Mutagenic Evaluation of Luxabendazole, a new Broad spectrum Antihelminthics With the Salmonella Typhimurium His<sup>r</sup> and E.coli Tryp<sup>r</sup> Reversions Tests*. Mutagenesis, Jan. 11 (1), 27-31, 1996.
102. NISHIE, K., Waiss, A.C. and Keyl, A.C., *Toxicity of Methylimidazoles*. Toxicol. Appl. Pharmacol., 14, 301-307, 1969.
103. HARTMAN, Z., Hartman, PE., *Copper and Cobalt Complexes of Carnosine and Anseine: Production of Active Oxygen species and its Enhancement by 2-Mercaptoimidazoles*. Chem. Biol. Interact., sep. 28, 84 (2), 153-68, 1992.
104. DE MEO, M., Vanella, P., Bernardini, E., Laget, M., Maldonado, L., Jentzer, O., Crozet, M.P., Dumenil, G., *Evaluation of the Mutagenic and Genotoxic Activities of 48 Nitroimidazoles and Related Imidazole Derivates by the Ames Test and the SOS Chromotest*. Environ. Mol Mutagen., 19 (2), 167-81, 1992.
105. BASU, A.K., Wood, M.L., Niedernhofer, L.J., Ramos, L.A., Essigmann, J.M., *mutagenic and genotoxic of Three Vinyl Chlorid-Induced DNA DNA Lesions: 1, N6-Ethenoadenine, 3,N4-Ethenocytosine, and 4-Amino-5-(Imidazol-2-yl) Imidazole*. Biochemistry, Nov. 30,32 (47), 12793-801, 1993.
106. KILIÇ, S., *Bazı imidazol Türevlerinin Ratlarda Yapmış Olduğu Histopatolojik Bulgular*. Yüksek Lisans Tezi, 1996.