

**1-ETİL-4, 5-DİFENİL-1H-İMİDAZOL
TÜREVİNİN MUTAJENİK ETKİSİNİN
AMES/SALMONELLA TESTİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

Sevil SAĞDIÇ
Yüksek Lisans Tezi

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Ekim-2004

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sevil SAĞDIÇ'ın "1-Etil-4,5-Difenil-1H-İmidazol Türevinin Mutajenik Etkisinin Ames/Salmonella Testi İle Araştırılması" başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 22.10.2004 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Ahmet ÖZATA	
Üye	: Doç. Dr. Mehtap KUTLU	
Üye	: Yard. Doç. Dr. Zerrin AŞAN	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 24.11.2004 tarih ve 39/1.....sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Altuğ İFTAR
Fen Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

ÖZET**Yüksek Lisans Tezi****1-ETİL-4,5-DİFENİL-1H-İMİDAZOL TÜREVİNİN MUTAJENİK
ETKİSİNİN AMES/SALMONELLA TESTİ İLE
ARAŞTIRILMASI****SEVİL SAĞDIÇ****Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı****Danışman: Prof. Dr. Ahmet ÖZATA****2004, 50 sayfa**

Bu tezde ilaç öncül maddesi olarak hazırlanan 1-Etil-4,5-Difenil-1H-İmidazol türevinin mutajenik etkisi, *Salmonella typhimurium*'un çerçeve kayması ve baz değişimi mutasyonuna sahip iki suşu olan TA98 ve TA100'de, Ames/Salmonella/Mikrozom test yöntemi ile araştırılmıştır. Bunun için her iki suş mikromozal enzimler içeren metabolik aktivasyon (S9) varlığında ve yokluğunda, test maddesinin 5 ayrı dozu ile 2 bağımsız paralel deneyde test edilmiştir. Buna göre 1-Etil-4,5-Dimetil-1H-İmidazol türevinin mutajenik aktivite gösterdiği bulunmuştur.

Anahtar sözcükler: Mutajenite, Ames test, *Salmonella typhimurium*, İmidazol, 1-Etil-4,5-Dimetil-1H-İmidazol

ABSTRACT**AN INVESTIGATION ON THE MUTAGENIC EFFECT OF
1-ETHYL-4,5-DIPHENYL-1H-IMIDAZOLE
BY AMES/SALMONELLA METHOE**

**Master of Science Thesis
SEVİL SAĞDIÇ**

**Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program**

**Supervisor: Prof. Dr. Ahmet ÖZATA
2004, 50 pages**

In this study, mutagenic effect of 1-Ethyl-4,5-Diphenyl-1H-Imidazole prepared as a drug raw material was and basic pair substitution investigated by using *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 strains containing frameshift mutations with Ames assay. Therefore, both test strains were tested in the absence or presence of S9 metabolic activation, for five different doses of the test substance in two parallel independent experiments. According to the results it has been understood that 1-Ethyl-4,5-Diphenyl-1H-Imidazole derivative has shown mutagenic activity.

**Keywords: Mutagenicity, Ames Assays, *Salmonella typhimurium*,
Imidazole, 1-Ethyl-4,5-Diphenyl-1H-Imidazole**

TEŞEKKÜR

Çalışmamda benden her türlü bilgi, yardım ve önerilerini esirgemeyen hocalarımız Sayın Prof.Dr. Ahmet ÖZATA' ya, Doç.Dr. Mehtap KUTLU' ya teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın labaratuvar aşamasında desteklerini bilgi ve yardımlarını esirgemeyen Arş.Gör. Gözde AYDOĞAN' a teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme de teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1.GİRİŞ	1
1.1.Amaç.....	1
1.2. Mutasyonlar ve Biyolojik Önemi.....	2
1.2.1. Kromozom mutasyonları.....	2
1.2.1.1 Kromozom sayı değişimleri (Genom mutasyonları).....	2
1.2.1.2.Kromozom yapı değişimleri(Kromozom Mutasyonları)....	2
1.2.2. Gen mutasyonları.....	2
1.2.2.1. Baz çifti değişimleri.....	3
1.2.2.2 Çerçeve (kodon) kayması (Frame-Shift) mutasyonları.....	3
1.2.2.3.Bazlar arasında bağların oluşması (Dimerizasyon).....	3
1.2.2.4.Bazlarla şekerler ve şekerlerle fosfatlar arasındaki bağların kopması.....	4
1.2.3. Mutasyonların kökeni.....	4
1.2.3.1.Kendiliğinden meydana gelen (spontan) mutasyonlar.....	5
1.2.3.2 Yapay mutasyonlar	5
1.3. Mutajen ve Kanserojen Maddeler	6
1.3.1. Mutajen maddeler.....	6
1.3.1.1. Fiziksel mutajenler.....	6
1.3.1.2. Kimyasal mutajenler.....	6
1.3.2. Kanserojen maddeler.....	7
1.3.2.1. Primer veya doğrudan etkili kanserojenler.....	7
1.3.2.2. Sekonder kanserojenler.....	9
1.3.2.3. Ko-kanserojenler.....	10

1.4. İmidazol.....	10
1.4.1. İmidazol'ün sentezi ve biyolojik aktiviteleri	10
1.4.2.Çalışmada kullanılan 1-Etil-4,5-difenil-1H-imidazol türevinin tanıtılması ve sentezi	12
1.5. Mutajen ve Kanserojenlerin Saptanmasında Kısa Zamanlı Test Sistemleri.....	12
1.6 Ames (Salmonella/Mikrozom) Test Sistemi.....	13
2.MATERYAL ve METOD.....	18
2.1. Materyal.....	18
2.1.1. <i>Salmonella typhimurium</i> test suşları.....	18
2.1.1.1. Test suşlarının genotip özelliklerinin açıklanması.....	18
2.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	19
2.1.3. Test maddesi (dozları ve hazırlanışı).....	20
2.1.4. Kullanılan ortamların içerikleri ve hazırlanmaları.....	20
2.2. Metod.....	25
2.2.1. <i>Salmonella</i> suşlarının kültürlerinin ve master plakların hazırlanması.....	25
2.2.2. <i>Salmonella</i> suşlarının stoklanması ve stok kültürlerin açılması.....	25
2.2.3. <i>Salmonella</i> suşlarının kontrol testlerinin yapılması.....	26
2.2.3.1. Bakterilerin genotiplerinin kontrol edilmesi.....	26
2.2.3.2 Sıvı kültürün ml'sindeki bakteri sayısının belirlenmesi.....	27
2.2.4. Test maddelerinin sitotoksik etkilerinin saptanması.....	28
2.2.5. Memeli karaciğer mikrozomlarının hazırlanışı.....	28
2.2.6. Karaciğer S9 karışımlarının hazırlanması.....	29
2.2.7. Ames testinin yapılışı.....	29
2.2.8. Sonuçların değerlendirilmesi.....	29

3. BULGULAR.....	31
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	34
KAYNAKLAR.....	37
EKLER.....	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Baz çifti değişimi ile meydana gelen mutasyonlar.....	4
1.2. Çerçeve kayması mutasyonları.....	4
1.3. Bazlar arası bağların oluşması sonucu meydana gelen mutasyon.....	5
1.4. Çeşitli maddelerin oluşturduğu baz çifti değişimi mutasyonları.....	8
1.5. Baz analoglarının yol açtığı baz çifti değişimi mutasyonları.....	9
1.6. İmidazolün genel formülü.....	11
1.7. 1-Etil-4,5-difenil-1H-imidazol türevi.....	12
3.1.a. Metabolik aktivasyon yokluğunda 1-Etil-4,5-Difenil-1H-İmidazol tarafından indüklenen revertantların doz-yanıtı eğrileri.....	31
3.1.b. Metabolik aktivasyon varlığında 1-Etil-4,5-Difenil-1H-İmidazol tarafından indüklenen revertantların doz-yanıtı eğrileri.....	33

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. Kısa zamanlı test sistemleri ve bunların dayandığı genetiksel ve biyokimyasal yollar	14
3.1. 1-Etil -4,5-Difenil-1H- İmidazol türevinin metabolik aktivasyon varlığında ve metabolik aktivasyon yokluğunda yapılan mutajenite analizlerinin ortalama sonuçları ve değerlendirmesi.....	32
3.2. Metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda Salmonella mutajenite testinde çözücü kontrol ve pozitif kontrollerinin sonuçları.....	33
3.3. 1-Etil-4,5-difenil-1H-imidazol türevinin mutajenik aktiviteleri.....	33

1. GİRİŞ

1.1. Amaç

Günümüzde insanları en fazla ilgilendiren ve yaşamın temeli olan konular arasında gıda, sağlık ve çevre konuları önemli yer tutmaktadır. Hızlı nüfus artışı, endüstriyel gelişmeler ve buna bağlı olarak yaşam düzeyinin yükselişi doğayı etkilemiş, canlıların yaşam ortamlarında bozulmalara sebep olmuştur. Bu bozulmalar canlıların sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Bundan dolayı çevre sorunları canlı hayatının en önemli sorunu haline gelmiştir. [1-3]

Çevremizde biyolojik etkileri bilinmeyen ve sayıları milyonları bulan sentetik ve doğal kimyasal madde bulunmaktadır. İnsanda kanserin oluşmasına yol açan etkenlerin başında kimyasal maddeler gelmektedir. Bu maddelerin çoğunun günlük kullanımda yer alması, son zamanlarda nüfusun yaklaşık $\frac{1}{4}$ 'ünün kansere yakalanıyor olması, çocukların %5-10'unun sakat doğması, kanser sebebiyle ölümlerin sayısının yılda beş milyona ulaşması, bu hastalığın ortadan kaldırılmaması kanserin temelini oluşturan öğelerin tespit edilmesinin gereğini ortaya çıkarmıştır. [1-3]

Mutasyon olaylarının kanserin temelini oluşturduğu bilinmekle beraber kanser ve mutasyon arasında kantitatif bir ilişki her çeşit kanserojenik madde için gösterilememektedir. Ancak bugün çevremizdeki çeşitli kimyasal maddelerin küçük miktarları mutajen veya kanserojen olabilir. Çevremizdeki bu özelliğe sahip bileşiklerin bilinmesi ve etkilerinin değerlendirilmesi önemlidir. [4,5]

İmidazol çekirdeği bazı endojen bileşiklerin ana yapısını oluşturan ve insan organizmasına yabancı olmayan kimyasal bir bileşiktir. Ayrıca günümüzde başta antihistaminikler, antifungaller, analjezikler ve antiinflamatuarlar vs. olmak üzere çok sayıda ilacın ana yapısını oluşturmaktadır. Bu nedenle, yapının mutajenite yönünden geniş olarak incelenmesi gerekmektedir. Yapı üzerinde mutajenik etkiye yönelik bazı araştırmalar yapılmıştır. [6]

Bu araştırmalara biraz da olsun katkıda bulunmak amacıyla çalışmamda 1-Etil-4,5-Difenil-1H-İmidazol türevinin mutajenik etkisi Ames /Salmonella / Mikrozoom testi uygulanarak saptanmıştır.

1.2. Mutasyonlar ve Biyolojik Önemi

Kalıtılabilir bir materyal olan DNA' da zaman zaman doğal ve yapay koşullar altında değişiklikler gözlemlenebilir. DNA' nın türe özgü kalıtsal kombinasyonu değişmeksizin, taşıdığı bilgi içeriğinde meydana gelen değişmeye **mutasyon** denir. Genotipte meydana gelen bu olay bir ya da daha fazla karakterdeki değişimle kendini belli etmekte, böyle bir değişikliğin ürünü **mutant** olarak adlandırılmaktadır. Bu terim bir gen, bir hücre veya bir birey için kullanılabilir. Mutasyonlar kalıtsal, daha önceden şifrelenmemiş, programlanmamış ve oldukça ender meydana gelen değişikliklerdir. Mutasyon kapsamına giren değişimler kolay anlaşılması için iki grup altında toplanabilir. [1,7-9]

1.2.1. Kromozom mutasyonları

1.2.1.1. Kromozom sayı değişimleri (Genom mutasyonları)

Organizmaların hem doğal hem de laboratuvar popülasyonlarında kendiliğinden meydana gelen kromozom sayısındaki değişimlerdir. Bireylerin sahip olduğu kromozomların sayısında tam katlar halinde artma (**poliploidi**) ya da azalmalar (**monoploidi**) ya da kromozomlardan bazılarının sayısındaki artma veya azalmaları (**anoploidi**) kapsar. [9,10]

1.2.1.2. Kromozom yapı değişimleri (Kromozom Mutasyonları)

Bazen kromatitler, krossing-over olmadan da parça değişimine (kazanılması ya da kaybedilmesi) uğrarlar. 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 sebep olur. Bu değişiklikler, kromozomlarda kırılmalar sonucu meydana gelen parça kayıpları (**delesyon**) veya artışlarını (**duplikasyon**) parça yerleşim düzenlerindeki değişimleri (**inversiyon**) kromozomlar arası parça değiş tokuşlarını (**translokasyon**) kapsar. [9,10]

1.2.2. Gen mutasyonları

Kromozomların yapılarında değişim olmaksızın, DNA' da bulunan nükleotid dizisinin ya da bazlarının değişmesiyle meydana gelmektedir. Kromozomların morfolojik karakterini değiştirmezler. Mutasyonlar moleküler düzeyde dört tip değişimden köken alarak oluşurlar. [1,9,10]

1.2.2.1. Baz çifti değişimleri

Bu tip değişimler nokta mutasyonlarını oluştururlar. Genin içindeki bir yada birkaç baz çiftinin yerini başka baz çiftinin almasıyla meydana gelirler. Bu tip mutasyonlarda değişimler pürin-pürin değişimleri (**transisyon**) şeklinde olabileceği gibi pürin- pirimidin değişimleri (**transversiyon**) şeklinde de olabilir. Bunun dışında bazın kimyasal yapısındaki değişimle eşleşme sırasında yapılan H bağlarının sayısı değişir ve yanlış eşleşme yapılır. Bazın kimyasal yapısının değişmesi 2 şekilde meydana gelir. Geçici tautomerik değişimde genlerin yapısında bulunan bazların halka yapısındaki atomların yer değişmesi ile replikasyon sırasında bazlar arasında yanlış eşleşmeler yapılabilir. Örneğin A hatalı olarak G ile eşleşebilir. Kalıcı değişimlerde ise DNA'nın bir bazında kalıcı yapı değişimleri ile mutasyonlara yol açarlar. Bu tip değişimlerin ortaya çıkması için hücrenin replikasyon geçirmesi gereklidir. Bir bazın yerini başka bir bazın alması ile meydana gelen kalıcı değişimlerde replikasyon sırasında meydana gelir ve değişikliğin ortaya çıkması için birkaç replikasyon döngüsünün daha geçirilmesi gereklidir. Baz çifti değişimleri ile meydana gelen mutasyonlarda genin işlevi kalıntı olarak devam eder ve genin ürünü olan protein aktivitesi tam olarak yitirilmez. Bu tip mutasyon Şekil 1.1.'de gösterilmiştir. [1,2,7,10]

1.2.2.2 Çerçeve (kodon) kayması (Frame-Shift) mutasyonları

Genin ürününü belirleyecek bölgede kodonların kayması ve genin ürününe ait bilginin değişmesi şeklinde olur. Bu mutasyonlar bir baz çiftinin aradan çıkması şeklinde olabileceği gibi yeni bir baz çiftinin yapıya girmesi şeklinde Şekil 1.2.'de gösterildiği gibi de olabilir. Her iki biçimde de gerçekleşen mutasyon sonucu mutasyonun meydana geldiği noktadan itibaren tüm kodonlar değişime uğrar ve genin ürünündeki değişiklik oldukça fazla olur. Bu nedenle kodon kayması ile oluşan mutasyonun fenotipde ortaya çıkma olasılığı baz çifti değişimi ile oluşan mutasyonların ortaya çıkma olasılığına göre daha yüksektir. [7,10]

1.2.2.3. Bazlar arasında bağların oluşması (Dimerizasyon)

Pirimidin bazları arasında kovalent bağ oluşumuna dayanan bu mekanizmada başlıca etken UV ışınlarıdır. Dimerizasyon nedeni ile DNA zincirinde yan yana veya karşılıklı olarak yer alan pirimidin bazları arasındaki

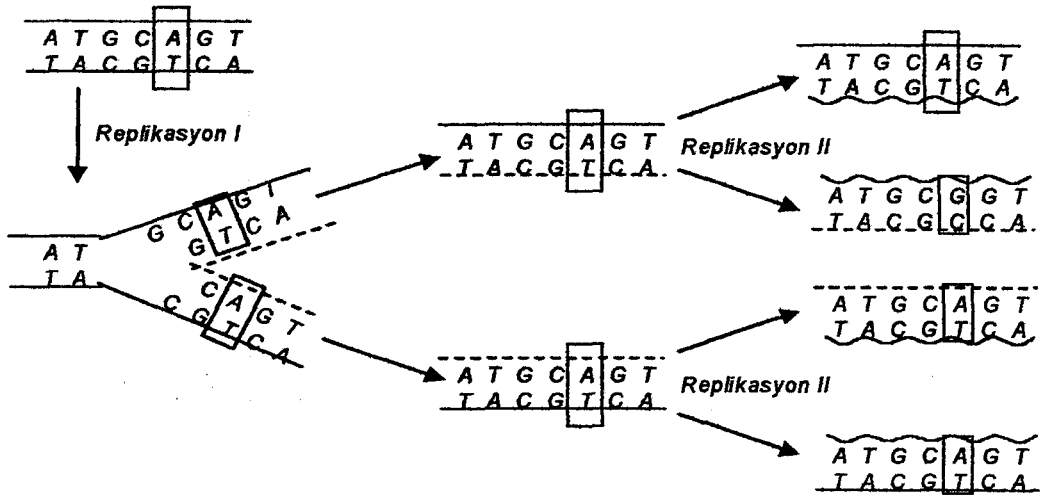
mesafe kısalmır. Buna bağlı olarak DNA zincirinde yamulmalar ortaya çıkar ve bu bölgeler transkripsiyon sırasında atlanır. Bu Şekil 1.3.' de gösterilmiştir. [1,10]

1.2.2.4. Bazlarla Şekerler ve Şekerlerle fosfatlar arasındaki bağların kopması

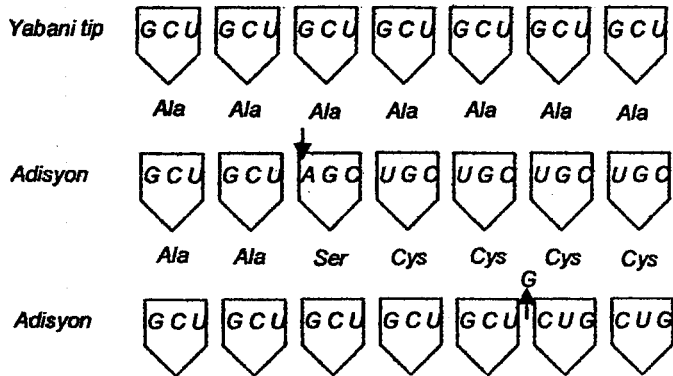
Bu tip mutasyonlarda DNA zincirinin btnliđi bozulur. [1,10]

1.2.3. Mutasyonların kökeni

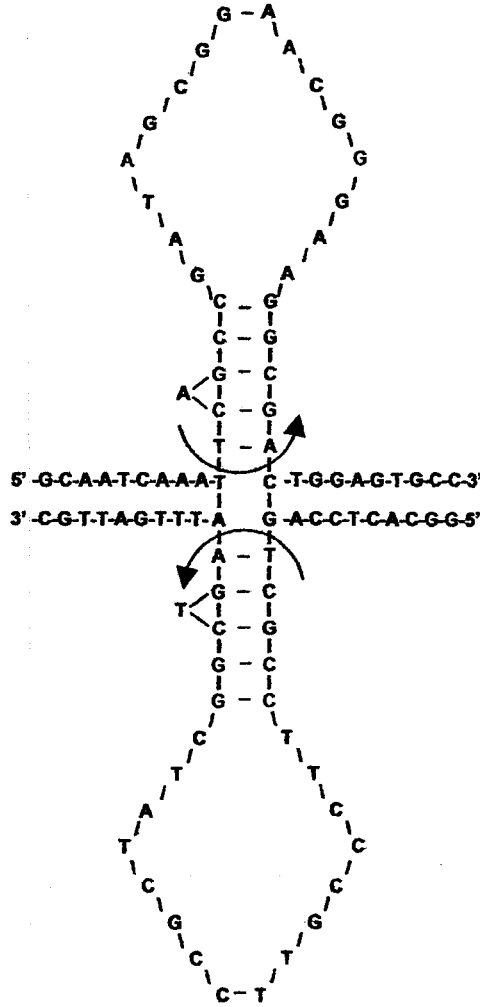
Mutasyonlar canlılarda spontan ya da yapay (teŐvik edilmiş) bir biçimde geliŐirler. [10]



Şekil 1.1. Baz ifti değişimi ile meydana gelen mutasyonlar



Şekil 1.2. ereve kayması mutasyonları



Şekil 1.3. Bazlar arası bağların oluşması sonucu meydana gelen mutasyon

1.2.3.1. Kendiliğinden meydana gelen (spontan) mutasyonlar

Kendiliğinden (spontan) mutasyon meydana gelme olasılığı oldukça düşük olup her replikasyon sırasında 10^{-5} - 10^{-10} / hücre olarak belirtilmektedir. Kendiliğinden mutasyonlar ya hücre metabolizmasında oluşan mutasyon yapıcı ara ürünlerin ya da tautomerik değişim nedeni ile yanlış eşleşme sonucu ortaya çıkabilir. [10]

1.2.3.2 Yapay mutasyonlar

Yapay olarak gerçekleşen mutasyonlar mutajen adı verilen fiziksel veya kimyasal etkenlerle ortaya çıkar. Bu tür bir etkiye maruz kalan bireyin genlerinde mutasyon görülme olasılığı 10^{-2} ye kadar yükselebilir. Mutajenler genleri

ayırımsızın etki ettiklerinin bilinmesinin yanında bazı mutajenlerin bazı genlerdeki mutasyon olasılığını oldukça artırdığı da bilinmektedir. [10]

1.3. Mutajen ve Kanserojen Maddeler

1.3.1. Mutajen maddeler

Sanayiinin hızla gelişmesi ve gerek üretim sürecinin yan ürünleri gerek ürünün kalitesini artırmak için kullanılan kimyasalların sağlığımız üzerine etkileri tam olarak bilinmemektedir. Yapılan testler neticesinde doğal etkenlerin ve her an karşı karşıya kaldığımız kimyasalların mutasyona yol açan maddeler olduğu görülmüş ve bunlara **mutajen** adı verilmiştir. Mutajenler üç ana grup altında toplanmışlardır. [2,7,11,12]

1.3.1.1. Fiziksel mutajenler

Sıcaklık, manyetik alan, elektriksel alan, UV, α , γ , proton, nötron ışınları gibi etmenlerdir. Bunlar genellikle bir baz çiftinin yerini bir başka baz çiftinin almasına yol açarlar. Fiziksel mutajenler etki şiddetine ve süresine göre geçici veya kalıcı değişimlere yol açarlar. [2,7,10]

1.3.1.2. Kimyasal mutajenler

Bunlar tautomerik değişimden farklı olarak her zaman kalıcı değişimlere yol açarlar. Bu tip mutajenler etki şekillerine göre bazların kimyasal yapısını değiştiren kimyasal maddeler ve baz analogları şeklinde 2 grup altında toplanırlar. [2,7,10]

1. Bazların kimyasal yapısını değiştiren kimyasal maddeler

Bazı kimyasal maddeler DNA yı doğrudan etkileyerek onun replikasyon sırasındaki kalıp özelliklerini değiştirirler. Bu mutajenlerin bir kısmı DNA yapısına girmez fakat bazıları modifiye ederek onların replikasyon sırasında yanlış eşleşmesine sebep olur. Bu tip kimyasal mutajenlerden nitroz asidi (HNO_2) bazıları deamine ederken, hidroksilamin (NH_2OH) sitozin ile tepkimeye girer ve hidroksilaminositozin oluşumuna yol açar; alkilleyici maddeler ise (etil metan sülfonat, nitrozoguanidin, metil metan sülfonat) bazlardaki azot grubuna bir alkil grubu ekler. Asilleyici ajanlar (asetik, süksinik, maleik anhidrit) ise amino ve karboksil gruplarını etkilerler. Bu mutajenler nötral pH da etkili değildirler. Şekil 1.4. 'de gösterildiği gibi bu mutajenler bazların H bağı yaptıkları bölgelerde modifikasyon yaptıkları için yanlış baz çiftlerinin oluşumuna yol açarak

mutasyona neden olurlar. Bu mutajenlerin bir kısmı DNA yapısındaki bazlar arasına girer ve çerçeve kaymalarına yol açarlar. Akridin boyaları (akriflavin, proflavin, akridin orange) bu grupta yer alan mutajenlerdir. [2,10,14,15]

2. Baz analogları

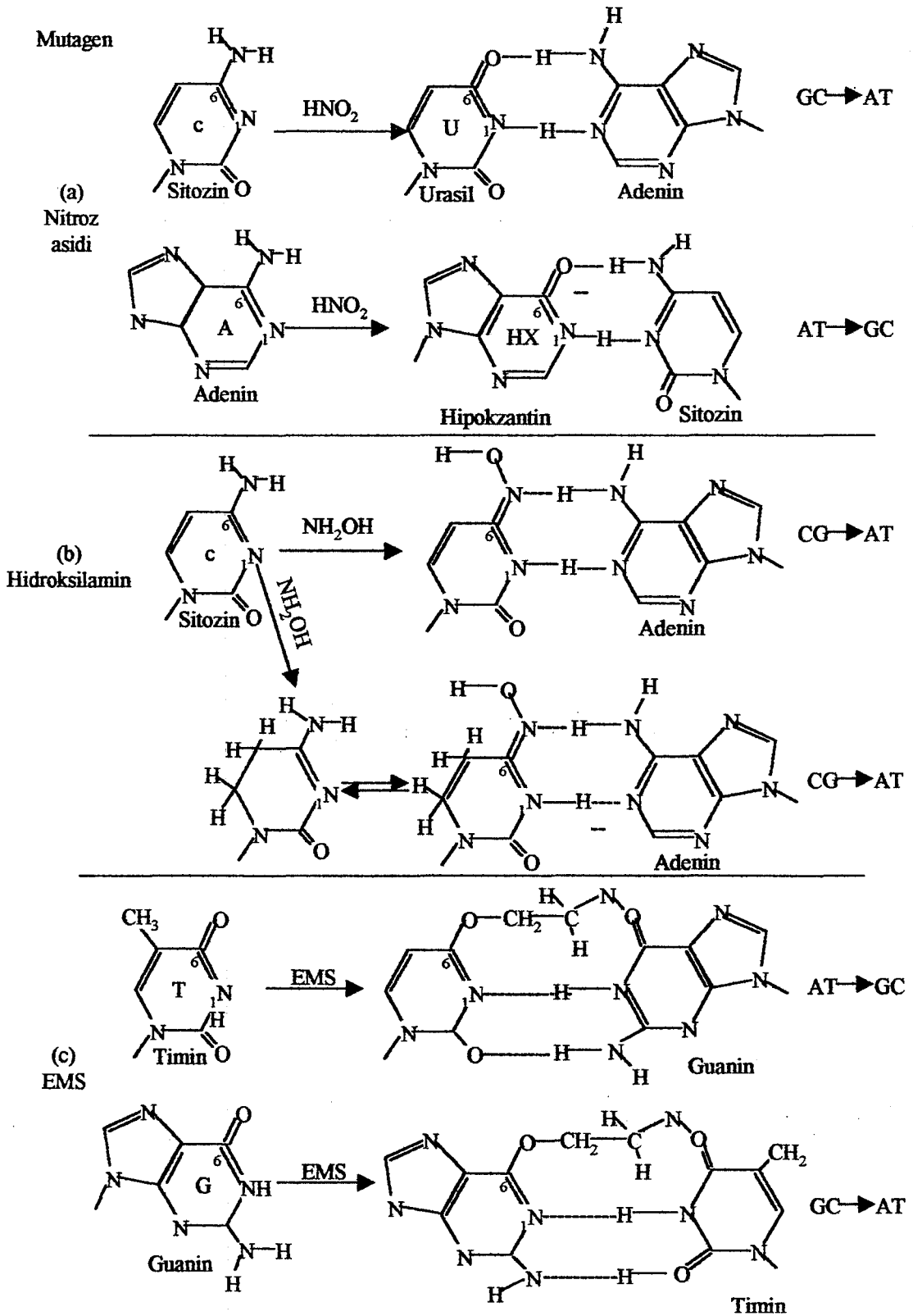
Bunlar molekül yapıları pürin ve pirimidinlere çok benzeyen kimyasal maddelerdir. Sadece replikasyon sırasında etkili olurlar. Daha sonraki replikasyonda normal bazdan farklı baz eşleşmesi yaptıkları için sonuçta yanlış bazların oluşumuna neden olurlar. Bu şekilde baz çifti değişimlerine yol açarlar. Örneğin, 2-aminopürin bir adenin analogu iken 5-bromourasil bir timin analogudur. Bunların mutasyon mekanizması Şekil 1.5.'de verilmiştir. [2,10,14,15]

1.3.2. Kanserojen maddeler

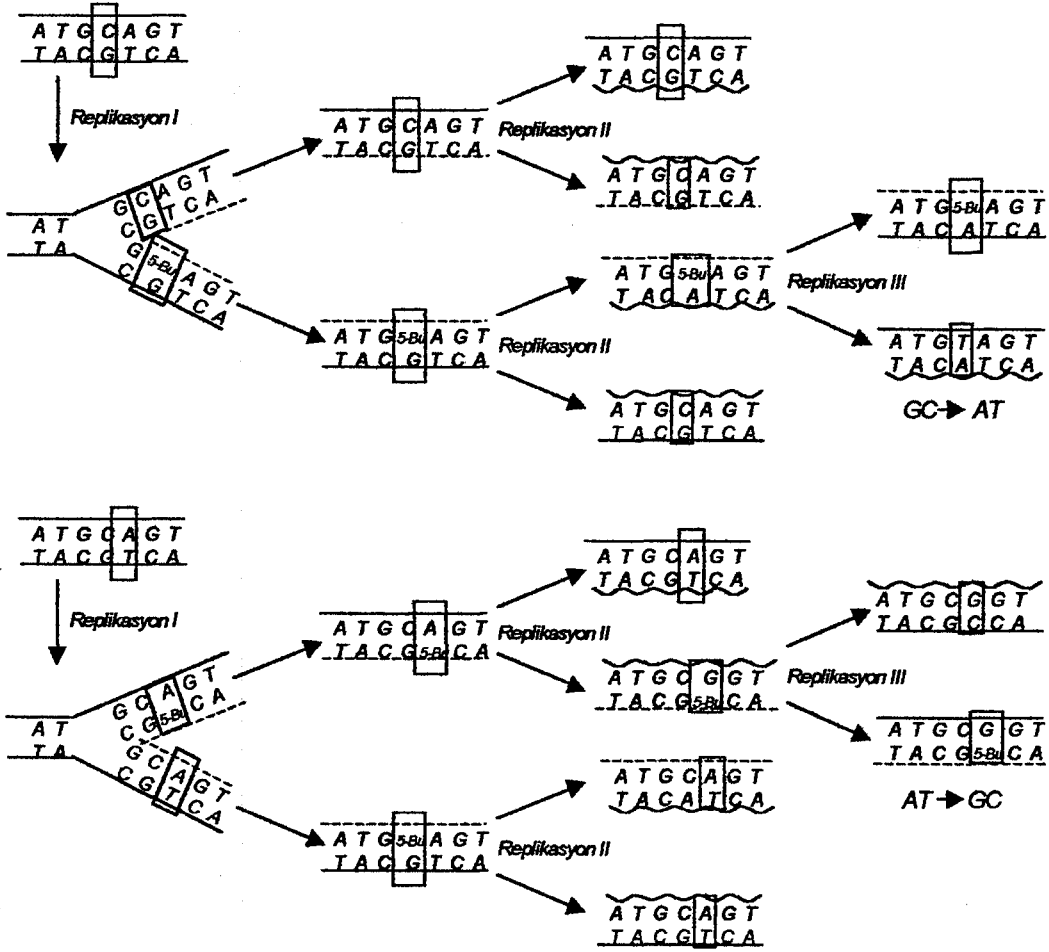
Mutasyona neden olan mutajenlerin kanser oluşumuna neden olduğunun ileri sürülmesi sonucu mutajenlerin özellikle kimyasal olanların kanserle olan ilişkisi ortaya konulmaya çalışılmış ve mutajen olan maddelerin bir kısmının kanserojen olarak adlandırılmasına neden olmuştur. Çevremizde bulunan sentetik ve doğal kimyasalların etkilerini tahmin etmek ve bunlardan bir ölçüde kaçınabilmek mümkünken vücudumuzda doğal metabolik olaylar sonucu oluşan çeşitli mutajenlerden kaçınmamız mümkün değildir. Genellikle kabul edilen bir görüşe göre doğrudan veya metabolize edildikten sonra kanserojenik etki gösteren tüm maddelerin mutajen olabilecekleri vurgulanmaktadır. Bunun akside düşünülmekte yani tüm mutajenlerin kanserojen olmadıkları ileri sürülmektedir. Kimyasal kanserojenler 3 ana grup altında toplanırlar. [2,7,13,15]

1.3.2.1. Primer veya doğrudan etkili kanserojenler

Bu maddeler moleküler yapıları itibarı ile kimyasal ve biyolojik olarak aktif bileşiklerdir. Genelde elektrofilik yapıda veya serbest radikal durumu alabilen bu moleküller hücre sel moleküllerle (DNA,RNA ve proteinler) doğrudan reaksiyona girebilir ve onları değiştirebilirler. Bu gruba alkilleyici maddeler, inorganik kimyasallar ve trifenilmetan türevleri girer. [2,7,13,15]



Şekil 1.4. Çeşitli maddelerin oluşturduğu baz çifti değişimi mutasyonları



Şekil 1.5. Baz analoglarının yol açtığı baz çifti değişimi mutasyonları

1.3.2.2. Sekonder kanserojenler

Bu moleküller kimyasal, biyokimyasal ve biyolojik açıdan aktif olmayan bileşiklerdir. Bunların bir kısmı kendiliklerinden hidrolize olarak aktif kanserojen maddeler haline dönüşürler, bir kısmı ise kendilerine özgü metabolik aktivasyonlarla primer kanserojen haline gelirler. Metabolik aktivasyonu yürüten enzimler organizma, organ ve dokulara göre nitelik ve nicelik farklılıklar gösterdiklerinden herhangi bir prokanserojen (sekonder kanserojen) maddenin etkisi de enzim aktivitelerine bağlı olarak farklı organizmalara veya aynı organizmanın farklı organlarına göre farklılıklar gösterebilirler. Sekonder kanserojenlere örnek olarak polinükleararomatik ve heterosiklik hidrokarbonlar, aromatik ve heterosiklik aminler, azo boyaları, nitroaril ve nitrofuran türevleri, nitrozaminler ve nitrozamidler, nitrozüreler, nitrozkarbamatlar, alkiltriazinler, safrol, tiyoamidler, klorlanmış hidrokarbonlar, mikotoksinler verilebilir. [13,14]

1.3.2.3. Ko-kanserojenler

Bu gruptaki kimyasallar kendileri doğrudan bir etkiye sahip değildirler. Fakat kanserojen veya prokanserojenlerin etkilerini kuvvetlendirirler. Bu kanserojenler arasında asetat türevleri, oleat türevleri, piren türevleri sayılabilir. [8,13,14]

Mutajenlerle yüz yüze gelmenin birinci yolu diyetimizde bulunan doğal kimyasalları almamız, ikincisi endüstriyel kimyasallar, pestisidler, kozmetik ve ilaçlar gibi yapay kimyasalları kullanmamız, üçüncüsü ise sigara dumanı, su ve havadaki kirleticiler gibi karmaşık bileşiklere yüz yüze gelmemizdir. Mutasyonun ortaya çıkmasında kimyasal madde ile yüz yüze gelmenin sonrasında diğer bazı faktörlerde rol oynamaktadır. Bunların en önemlileri nükleik asitlerin onarım, inhibisyon ve genetik yatkınlıklarıdır. [15-19]

Kanseri araştırmadaki amaç insanı bu hastalığa karşı korumaktır. Üreme hücrelerinin DNA'sında ortaya çıkan hasar kendinden sonra gelecek kuşaklarda bozukluklar gösterebilir. Senatik hücrelerin DNA'sında meydana gelen mutasyon normal hücresel mekanizmaları etkileyerek kanserli hücrenin doğmasına neden olabilmektedir. [15,23]

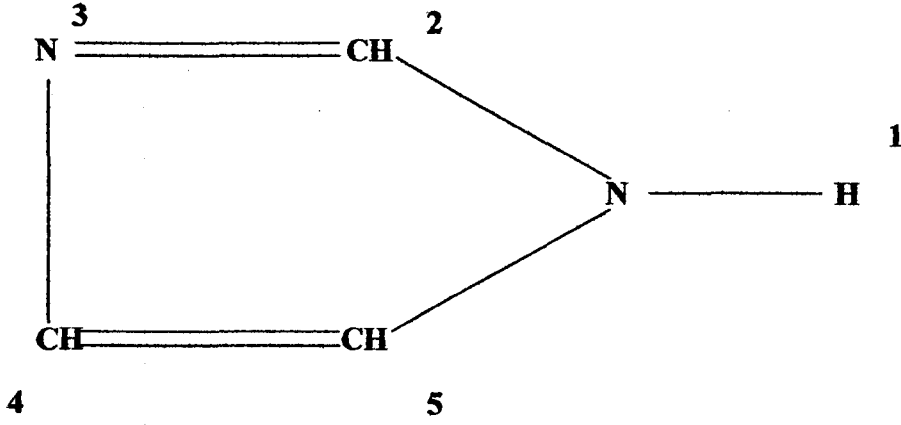
1.4. İmidazol

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-metillanosterol'ün desmetildihidrol-anosterol'a dönüşümü katalize eden 14 α -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. [2,17]

1.4.1 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 1.6) Bu reaksiyonlarda glioksal yerine disüstitüe türevlerinin, formaldehit yerine de başka bir aldehid'in kullanılması ile çeşitli imidazol türevleri elde edilir. Bunlar nispeten suda

çözünmezler, fakat DMSO, kloroform, polietilen, glikol ve polietiloksilat, kastor yağı gibi organik çözücülerde çözümler. [2,18]

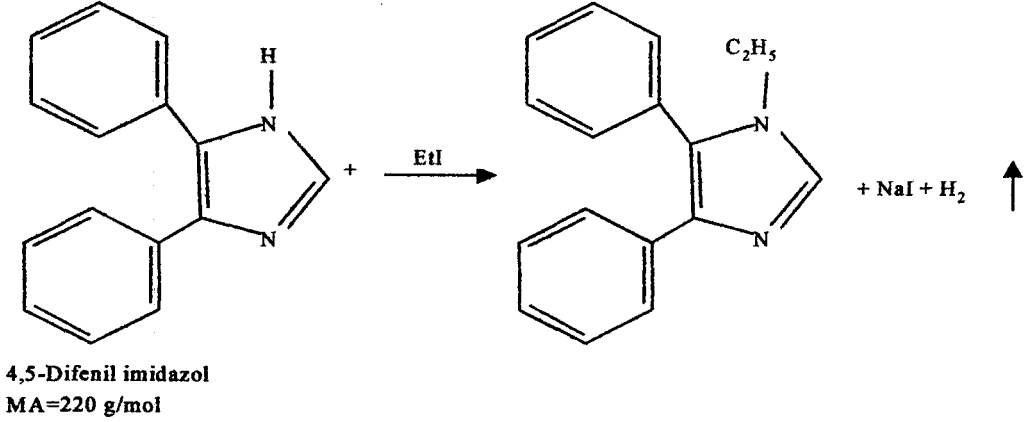


Şekil 1.6. İmidazolün genel formülü

Biyolojik aktiviteleri : İmidazol, birçok kompleks bileşiğin yapısında olduğu gibi basit bir heterosiklik moleküldür. Bu madde, suda kolay çözülür ve ağız yoluyla alındığında, gastrointestinal yoldan 'hidantoin' ve daha sonra da 'hidantoikasit' oluşur. Hidantoin, hidantoikasit ve değişmeden kalan imidazol, üre ile birlikte dışarı atılır. Bakteriyal metabolizma sonucunda imidazol'den N-asetil imidazol oluşur. İmidazol'ün PK 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. [2,19]

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. 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. 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. [2,18,19]

1.4.2.Çalışmamda kullanılan 1-Etil-4,5-difenil-1H-imidazol türevinin tanıtılması ve sentezi



Şekil 1.7. 1-Etil-4,5-difenil-1H-imidazol türevi

4,5-difenil imidazol	0,01 mol	2,2 g
THF		60 ml
NaH	0,015 mol	0,36 g
Etl	0,015 mol	1,212 ml

Başlangıç maddesi karıştırılarak çözünme sağlanmıştır. Çözeltiye NaH eklenerek H₂ gazı çıkışı sağlanmıştır. Karışıma Etl eklenerek önce oda sıcaklığında daha sonra soğutucu altında karıştırma işlemine geçilmiştir. Kromatografi alınarak reaksiyona son verilmiştir. Süzülerek kurutulmuş, sarı renkte plaklar halinde ürün elde edilmiştir. [6]

1.5. Mutajen ve Kanserojenlerin Saptamasında Kısa Zamanlı Test Sistemleri

Yaşamakta olduğumuz çevre iyi kullanılmadığı veya kullanım özellikleri iyi değerlendirilmediği için gün geçtikçe daha fazla bozulmaktadır. Doğadaki tüm canlılar günlük yaşamda sık sık doğal yada yapay kimyasal maddelerde yüz yüze gelmektedir. Bu nedenle kimyasalların kullanıma sunulmadan önce karsinogenik, mutajenik ve teratejonik özelliklerinin bilinmesi çevre kirliliğinin ve canlıların sağlığı açısından çok önemlidir. [20]

Kimyasal maddelerin karsinojenik risklerini ortaya çıkarmanın en uygun yolu deney hayvanlarında tümör indüksiyonudur. Bu testlerde kimyasal maddenin uygulanmasıyla deney sonuçlarının alınması arasında geçen süre oldukça uzun olmasından dolayı bunlara “uzun zamanlı testler” adı verilmektedir. Uzun zamanlı testler maliyet açısından yüksektir. Bu nedenle araştırmacılar karsinojenite taramalarına esas olabilecek, kısa zamanda sonuç alınabilen ve maliyeti düşük, bir çok kısa zamanlı mutajenite test sistemleri geliştirmişlerdir. Bu testler kimyasalların mutajenik etkilerini belirlemeye yöneliktir. Kısa zamanlı test sistemlerinden en yaygın olarak kullanılan, bakteriyel testlerdir. Bakteriler, basit üreme ortamlarında hızla ürediklerinden basit, çabuk ve ucuz uygulanabilir olmalarından ötürü bakteriyel testler tercih edilmektedir. [1,20]

Karsinojenlerin taranmasında mutajenitenin esas alınması iki önemli nedene dayanır.

1. Genetik kodun ve genetik sistemin evrensel oluşu
2. Karsinojenite ile mutajenite arasında korelasyonun yüksek oluşu

Bakteriyel test sistemlerinde mutajen olduğu bulunan birçok bileşiğin aynı zamanda karsinojen olduğu saptanmıştır. Karsinojen ve mutajenlerin sebep olduğu özgül DNA hasarlarının tiplerini saptamada Tablo 1.2’de verilen bakteriyel test sistemleri kullanılmaktadır. [1-3]

1.6. Ames / Salmonella / Mikrozom Test Sistemi

Ames/Salmonella/Mikrozom testi Dr.Bruce Ames ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olup etkenliği, ucuz ve hızlı uygulanabilirliği nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu test mutajen - karsinojen etkisi iyi bilinen kimyasallar ile geçerliliği kabul edilen iyi standardize edilmiş bir testtir. Havada, akarsu ve göllerde, içme suyundaki kompleks karışımlarda mutajenleri tespit etmek için yaygın şekilde kullanılmaktadır. [2,3]

Salmonella/Mikrozom/Ames testinde kullanılan bakteri atesal suşları Salmonella typhimurium LT-2 suşundan çeşitli mutasyonlarla elde edilen TA 1535, TA 1537, TA 97, TA 98, TA100, TA 102 ve TA 104 suşlarıdır. Bu suşların herbirinin histidin operonunda çeşitli tiplerde mutasyonlar oluşturulduğundan hepsi his⁻ (histidin sentezi yapamayan histidin oksotrofu) dur.

Bu test sisteminin ana prensibi ise his⁻ bakterilerinin, test edilen kimyasal madde tarafından, minimal ortamda geri mutasyon ile his⁺ şekline (histidin sentezleyebilen) dönüştürülmesidir. [2,6]

Bu test yöntemi 1975 yılında kanserojenik etkiye sahip oldukları canlı hayvan deneyleri ile ispatlanmış olan 300 değişik kimyasal maddenin mutajenik özelliklerinin araştırılması için kullanılmış ve bu kanserojenik maddelerin % 90'ı Salmonella/Mikrozom Testinde mutajenik bulunmuştur. [2,6]

İlk kez Salmonella/Mikrozom Testi ile mutajen olduğu saptanmış kimyasal maddeler, daha sonra aynı oranlarda canlı hayvanlarda denenmiş ve % 80'inin hayvanlar üzerinde kanserojenik etki gösterdiği bulunmuştur.[6]

Polinükleer aromatik ve heterosiklik hidrokarbonlar gibi diğer bir çok prokanserojen maddelerin metabolik aktivasyon gerektirdiği bilinmektedir. Bu tür kimyasal maddeler ancak bu reaksiyonlar sonucu aktif forma dönüşerek etkilerini gösterebilmektedirler. Salmonella test bakterilerinin bu enzim sistemleri yoktur.

Tablo 1.1. Kısa zamanlı test sistemleri ve bunların dayandığı genetiksel ve biyokimyasal yollar

S.NO	KISA ZAMANLI TESTLER	İZLENEN GENETİKSEL / BİYOKİMYASAL YOLLAR
1	Salmonella typhimurium	Histidin okzotrofları
2	Escherichia coli	Arjinin-triptofan okzotrofları Profaj indüksiyonu Onarım eksikliği olan suşların büyümelerinin inhibisyonu SOS cevabı
3	Drosophila melanogaster	Kromozomal hatalar
4	Neurospora crassa	Adenin okzotrofları
5	Çin hamsteri ovarıom ve akciğer hücreleri ile	HGPRT (Hipoksantin guanin fosforibazil transferaz) lokusunda mutasyonlar
6	İn-vivo DNA sentezi	Hata sıklığının artması
7	Bacillus subtilis	DNA onarımı hatalı suşları
8	Suriye Hamsteri emriyo hücreleri	Morfolojik tansformasyonlar
9	Soğan ve fasulye kök hücreleri	Kromozom anormallikleri
10	HeLa hücreleri, fare hepatositleri, insan deri fibroblastları	Programsız DNA onarımı
11	Fare karaciğer epitel hücreleri	8-Azaguanine direçlilik
12	Çin Hamsteri hücreleri, İnsan periferel lenfositleri	Kardeş kromatit değişimi. Kromozomal hatalar

Bu nedenle bunun gibi kimyasal maddelerin mutajenitelerinin tayini için karaciğer mikrozomu kullanılmaktadır. Bu test sistemi geliştirildiği günden beri tüm dünyada çok değişik amaçlar için yaygın olarak kullanılmakta olup, çeşitli materyallere bazı değişiklikler yapılarak uygulanmaktadır. Bu test 3 şekilde uygulanabilir. [6]

Plak İnkorporasyon Yöntemi: İçinde 2 m. top agar ve 0.2 ml histidin/biotin çözeltisi bulunan 45 °C 'deki su banyosunda tutulan tüplere sıra ile 0.1 ml test edilecek kimyasal madde, 0.1 ml over-night bakteri kültürü ve gerektiğinde 0.5 ml S-9 karışımı konur. Hafifçe el ile çalkalanıp önceden ısıtılmış MGA plaklarına dökülür. Plak sağa ve sola hafifçe çevrilerek karışımın plak üzerinde uniform dağılımı sağlanır. Plaklarda agarın donması beklenerek, ters çevrilip 37 °C'deki etüve yerleştirilir. 48 saat süre ile inkübe edilir. Bu süre sonunda his⁺ koloniler sayılır. Koloni sayısına göre, test edilen kimyasal maddelerin mutajenik olup olmadığına karar verilir. [3,6]

Ön-İnkübasyon Yöntemi: Bu yöntemde 0.5 ml S-9 karışımı, 0.1 ml bakteri ve 0.1 ml test maddesi bir tüpe konup 37 °C 'de 20-30 dakika inkübe edilir. Bu süre sonunda bu karışım 45 °C 'deki tüp agar karışımına ilave edilir. Aynı şekilde el ile çalkalayıp MGA plaklarına dökülür. Homojen şekilde yayılması sağlanarak donması beklenir. Daha sonra 37 °C 'deki etüve ters çevrilerek yerleştirilir. 48 saat inkübe edildikten sonra his⁺ koloniler sayılarak testin değerlendirilmesi yapılır. [6]

Spot Yöntemi: Bu testte 0.1 ml bakteri, 0.5 ml S-9 karışımı sıra ile 45 °C'deki erimiş 2 ml top agar'a konur. Bu karışım MGA plaklarına homojen bir şekilde yayılır. Agarın donmasından sonra plağın ortasına 6 mm çaplı kağıt disk yerleştirilir. Üzerine mikropipet ile belirli dozda test edilecek kimyasal madde çözeltisi konur. Şayet test maddesi kristal parçacıklar halinde ise belirli bir miktarı direkt olarak bu plak üzerine konur. Burada kağıt diske emdirilmiş veya katı haldeki test maddesi difüzyonla plak üzerinde yayılırken aynı plakta his⁻ bakteriler his⁺ haline çevrilecektir. [6]

Bu çalışmada *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları 1-Etil-4,5-Difenil-1H-İmidazol türevinin mutajenik etkisini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Ames test sistemiyle yapılan bazı çalışmalar vardır.

Antineoplastik ajanlar olarak kullanılmak üzere sentezlenen m-N-N-bis (2-kloro etil) aminocinnamic asidin homo-aza-steroidal esterleri olan 4 yeni kimyasal madde mutajenlikleri açısından test edilmiştir. Aynı alkilleme kısmi ve benzer bir kimyasal yapıya sahip olmalarına rağmen test edilen kimyasal maddeler farklı mutajenik aktiviteler görülmüştür. [24]

Besin maddeleri oldukça çok çeşitli antimutajen ve antikarsinojenlerin yanında mutajen ve karsinojenleri de içerir. Bu mutajen ve karsinojenlerin pek çoğu işlevlerini oksijen radikallerinin doğuşuyla başlatırlar. Oksijen radikalleri, DNA hasarı ve mutasyonu gibi kanser, kalp hastalıkları ve yaşlanmayla ilişkili olan organ bozulmalarında endojen başlatıcılar olarak da büyük rol oynarlar. Besin maddesi olarak kullanılan bitkiler de dahil olmak üzere doğadaki bitkiler, böcek, mantar ve diğer hayvanlara karşı savunma olarak oldukça önemli miktarlarda toksik kimyasallar sentezlerler. İnsan sağlığı açısından bu maddelerin tanınması çok önemlidir. Bu amaçla Ames / Salmonella / Mikrozom testi ile yapılan bir çalışmada 16 örnek incelenmiştir. [25]

Bazı vitamin ve antioksidantların antimutajenik-antikanserojenik etkileri araştırılmış, Askorbik asit, Retinol, Glutasyon ve Sistein'in kuvvetli, α -Tokoferol ve Tiamin'in ise çalışmada kullanılan 2-Aminofluoren, N'-metil-N'-nitro-N'-nitrosoguanidin, Sodyum azid ve Benzo (a) Piren gibi mutajen ve kanserojenler üzerinde zayıf antimutajenik etkileri olduğu saptanmıştır. [26]

Çinko priton'un (Znpt) mutajenik potansiyeli in vitro Salmonella/Mikrozom Test Sistemi ve CHO / HGPRT gen mutasyon deneyi ile araştırılmıştır. Znpt, sıçan karaciğeri mikrozomal enzimlerinin varlığı ve yokluğunda Ames testindeki 5 test eden suşta ve CHO / HGPRT testinde negatif sonuçlar vermiştir. [27]

Gıdalara katılan bazı azo boyalarının mutajenik etkileri bu test sistemiyle araştırılmıştır. Çalışmada gıdaları renklendirmede yaygın olarak kullanılan Ponceau 4R, Amaranth, Sunset Yellow FCF ve Tetrazine adlı 4 azo boyası mutajenik açıdan test edilmiş ve mutajenik özellikleri olmadığı belirlenmiştir. [28]

Yapıları açısından benzer olan üç substitue anilin mustardları mutajenlikleri açısından karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bunların TA100 ve TA1535 suşlarındaki his⁺ revertantlarında doza bağlı artışlara neden olan temel-çift

substitusyonları indüklediği bulunmuştur. Substituent grupların pozisyonunun bileşiklerin mutajenik aktivitesini etkilediği görülmüştür. Orto izomer metaya göre zayıf bir mutajenik etki göstermiştir. Meta da para'dan daha zayıf bir etki sergilemiştir. [29]

Aromatik aminlerin yapı-aktivite ilişkisi ve izo-butil nitrit solüsyonunun ve buharın mutajenik aktivitesi de bu test sistemiyle araştırılmıştır. Çalışma, amino grubu üzerindeki substituentlerin elektronik ve sterik intramoleküler etkileşimleri ve mutajenik olaylar arasındaki ilişkileri kurmak için yapılmıştır. İyonik dissosiasyon dengesinde aromatik aminlerin elektronik konumu ile bu biotransformasyonlar arasında bir ilişki olduğu görülmüştür. [30]

Proteinlerin mutajenlikleri de Ames test sistemi ve fluktasyon metoduyla araştırılmıştır. İdrar ekstraktları ve saf L-histidin-HCl, bu test tipindeki oksotrofik gelişim faktör etkilerini ölçmek için bir iki-aşamalı fluktasyon testi kullanılarak test edildi. Histidinsiz seçici besiyeri eklendiğinde oluşan kuvvetli dilüsyon nedeniyle bu çalışmada uygulanan fluktasyon testinin büyüme faktörlerine özellikle duyarlı olmadığı bulundu. Kendi mutajenik testleri için aynı indikatör bakterileri kullanan bir canlı deneyinin uygulanmasının, biyolojik örneklerdeki histidinle ilişkili büyüme faktörlerini ölçmek için güvenilir bir yol olduğu görülmüştür. Plak-inkorporasyon testi, fluktasyon testi ve bunun gibi testlerde önerilmektedir. [31]

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. *Salmonella typhimurium* test suşları

Testte kullanılan *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 mutant suşları Prof.Dr.Bruce N.Ames (University of California, Berkeley, CA, USA)'den sağlanmıştır.

2.1.1.1. Test suşlarının genotip özelliklerinin açıklanması

His D3052

Bu mutasyon bir bazın eklenmesi ya da çıkarılması ile kendini gösteren çerçeve kayması tipinde bir mutasyon olup, nükleotid eksikliği, his D⁻ geni içinde 8 kez tekrarlanan $\begin{matrix} -G C G C G C G C- \\ -C G C G C G C G- \end{matrix}$ bölgesindedir. Bu nedenle TA 98 suşu daha çok çerçeve kayması tipindeki mutasyonlara sebep olan kimyasallarla his⁺ hale dönüşür.

His G46

Bu mutasyon histidin biyosentezinde rol alan ilk enzimi kodlayan gende losin kodunu $\begin{matrix} -G A G- \\ -C T C- \end{matrix}$ yerine prolin kodunu $\begin{matrix} -G G G- \\ -C C C- \end{matrix}$ gelmesine neden olan mutasyondur. TA 100 suşu bu tip mutasyon içermektedir.

Rfa mutasyonu

Bu mutasyon bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasını kodlayan genlerde meydana gelir. Hücre yüzeyini saran lipopolisakkarit tabakasını zayıflatır. Böylece, normalde hücrelere giremeyen büyük moleküllerin test bakterilerine girebilmelerini kolaylaştırmaktadır. TA 98 ve TA 100 suşlarının her ikisi de bu mutasyonu içermektedir.

uvr B

DNA oranım sisteminde kesip çıkarma (=excisia repair) görevini üstlenen enzimi kodlayan uvrB geninde delesyon meydana getiren mutasyondur. Bu kısımda normalde uvr B⁺, chl⁺ ve bio genleri mevcuttur. Bu mutasyon bir çok mutajenin ortaya çıkarılmasında duyarlılığın artmasına neden olur. TA 98 ve TA 100 suşlarının her ikisi de bu tip mutasyonu içermektedir.

R faktör (+)

pKM101 Ampisilin dirençlilik geni taşıyan bir plazmid'dir. Plazmid çeren suşların, mutajenik olduğu gösterilmiş ajanlara karşı verilen cevapları, plazmid içermeyen suşlara göre hayli yükselir. Bu plazmidin hücrede bulunuşu bu hücrelerde normalde bulunan ve hata oranı yüksek (error-prone) onarım yolunun aktivasyonuna, bu sebeple de kimyasalların etkisi ile veya spontan olarak mutasyonların artmasına neden olur. TA 98 ve TA 100 suşlarının her ikisi de bu tip mutasyonu içermektedir.

2.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

- ◆ 2 aminofluoren :Pozitif mutajen olarak, Dimetilsulfoksit'te çözülerek 10µg/plak olarak kullanıldı.
- ◆ Sodyum azid :Pozitif mutajen olarak, steril suda çözülerek 1,5 µg/plak olarak kullanıldı.
- ◆ Dimetilsulfoksit (DMSO) :Test edilen maddenin çözülmesi için kullanıldı.
- ◆ D-biotin :Histidin-Biyotin plakları için, mutasyon deneyinde kullanıldı.
- ◆ L-histidin-HCl-monohidrat :Histidin-Biyotin plakları için mutasyon deneyinde kullanıldı.
- ◆ D-glukoz-6-fosfat :S9 karışımının hazırlanmasında kullanıldı.
- ◆ Fosfat tamponu :S9 karışımının hazırlanmasında kullanıldı.
- ◆ 3-Metilkolantren :Metabolik aktivasyon için uyarıcı olarak kullanıldı.
- ◆ Ampicillin trihidrat :NaOH'te çözülerek master plakları için kullanıldı.
- ◆ NADP :S9 karışımının hazırlanmasında kullanıldı.
- ◆ Nutrient Broth :Bakterileri bir gece büyütmek için kullanıldı.

2.1.3. Test maddesi (dozları ve hazırlanışı)

Bu çalışmada 1-Etil-4, 5-Difenil-1H-İmidazol türevinin mutajenik etkisi Ames /Salmonella / Mikrozmom test yöntemiyle araştırılmıştır. Test maddesi Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilimdalı'ndan temin edilmiştir. Bu madde dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülmüş ve oda sıcaklığında saklanmıştır. Uygulanacak dozları belirlemek için maddelerin 0,1µg/plak, 1µg/plak, 10µg/plak, 100µg/plak ve 1000µg/plak konsantrasyonları hazırlanıp bakteriler üzerinde denenmiş ve 1000 µg/plak konsantrasyonunun üzerindeki konsantrasyonların toksik etki yaptığı görülmüştür.

2.1.4. Kullanılan ortamların içerikleri ve hazırlanmaları

(50x) Vogel-Bonner Medium E

Kullanım	: MGA, HBA ve HB (master) plakları
Distile su	: 670 ml
MgSO ₄ .7 H ₂ O	: 10 g
Sitrikasit monohidrat	: 100 g
K ₂ HPO ₄	: 500 g
NaH ₂ PO ₄ (PO ₄ .4H ₂ O)	: 175 g

Maddeler yukarıda yazıldıkları sıra ile suyun içine eklenir ve hacim 1 litreye tamamlanır. Bir madde çözünmeden diğeri eklenmemelidir.

(0,5 mM) Histidin/Biyotin solüsyonu

Kullanım	: Mutajenite deneyi (100 ml top agara 10 ml)
D-Biyotin (F.17.247.3)	: 30.9 mg
L-Histidin.HCl (F.W.191.7)	: 24.0 mg
Distile su	: 250 ml

Biyotini suyu kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülür. Histidin ilave edilerek karışım 121°C'de 20 dakika süreyle otoklav edilir.

Top agar

Kullanım	: Mutasyon deneyi
Agar	: 6g
NaCl	: 5 g
Distile su	: 1000 ml

Agar, tuz ve su ısıtılıp karıştırılarak , 121°C'de 20 dakika otoklav edilir.

(1,65 M KCl+0,4 M Mg Cl₂) Tuz solüsyonu

Kullanım	: S9 karışımı
KCl	: 61,5 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	: 40,7 g
Distile su	: 500 ml

Sterilizasyon için 121°C' de 20 dakika otoklav edilir.

(0,2 M) (Ph 7,4) Sodyum fosfat tamponu

Kullanım	: S9 karışımı
0.2 M NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	: (13.8 g/500 ml) 60 ml
0.2 M Na ₂ HPO ₄	: (14.2 g/500 ml) 440 ml

(1 M) NADP solüsyonu

Kullanım	: S9 karışımı
NADP (F.W.765.4)	: 383 mg
Steril distile su	: 5 m

Sterilizasyon için 0.22 µm delik çaplı filtrelerden geçirilir.

(1 M) Glikoz-6-fosfat

Kullanım	: S9 karışımı
Glikoz-6-fosfat	: 2.82 g
Steril distile su	: 10 ml

Sterilizasyon için 0.22 µm delik çaplı filtrelerden geçirilir.

(%0,8 / 0,2NaOH) Ampisilin solüsyonu

Kullanım : Ampisiline direnç deneyi ve HBA plaklarının hazırlanması

Ampisilin – trihidrat	: 0,8 g
0.02 M Sodyum hidroksit	: 100 ml

Ampisilin trihidrat 0,02 M NaOH içinde çözülür. Sterilizasyon için 0,22 mM çaplı filtreden geçirilir.

(%0,1) Kristal viyole

Kullanım	: rfa mutasyonu'nu denemede
Kritsal viyole	: 0,1 g
Distile su	: 100 ml

Minimal Glikoz Agar plakları

Kullanım	: Mutasyon deneyi
Agar	: 15 g
Distile su	: 830 ml
50Xvb Tuzları	: 20 ml
%20 Glikoz	: 80 ml

15 gr agar 2 litrelik bir kapda bulunan 830 ml'lik distile suya eklenerek çözülür. 121 °C'de 20 dakika otoklavlanır. Solüsyon 45°C'ye soğutulup %20'lik glikoz ve 50xVB tuzları yavaş yavaş karıştırılarak eklenir, 45°C'de tutularak petrilere 30 ml'lik miktarlarda dağıtılır.

Histidin/Biyotin plakları (HB Agar)

Kullanım	: Histidin gereksinim deneyi
Agar	: 15g
Distile su	: 914 ml
50x4B tuzları	: 20 ml
%20 Glikoz	: 100 ml
Steril Histidin.HCl.H ₂ O (2gr./400 ml H ₂ O)	:10 ml
Steril 0.5 mM Biyotin	:6 ml

Agar ve su otoklavlanır, 45°C 'ye soğutulup %20'lik glikoz, 50X VB tuzları ve histidin çözeltisi eklenir. Solüsyon biraz daha soğutulup biyotin eklenir. Karıştırılıp petri kutularına 30 ml olarak dağıtılır.

Histidin/Biyotin/Ampisilin plakları (HBA agar)

Kullanım : Ampisiline dirençlilik testi ve "Master Plate" hazırlanmasında;

Agar	: 15 g
Distile su	: 910 ml
50XVB tuzları	: 20 ml
%20 Glikoz	: 100 ml
Steril Histidin.HCl.H ₂ O (2g/400 ml H ₂ O)	: 10 ml
Steril 0,5 mM Biyotin	: 6 ml

Steril ampisilin

(8mg/ml, 0.02 M NaOH içinde) : 3 ml

Agar ve su 20 dakika otoklavlanır. Glikoz, 50x VB tuzları ve histidin bu sıcak solüsyona eklenir. Sıcaklık biraz daha azalınca biyotin ve ampisilin eklenir, petrilere 30 ml'lik miktarlarda dağıtılır. Petriler TA97, TA98, TA100 için 4°C'de 2 ay süreyle saklanabilir.

Nutrient Agar plakları

Kullanım : Gecelik kültürün ml'sindeki bakteri sayısını bulma ve genotip kontrolü; (a) Kristal viyole
(b) uv duyarlılığı

Oxoid nutrient broth no:2 : 25 g

Agar : 15 g

Distile su : 950 ml

Yukarıdaki kimyasallar 2 litre hacimli bir kaba konularak 30 dakika otoklavlanır. Karıştırılıp 30 ml miktarlarda petri kutularına dağıtılır.

Nutrient sıvı kültür ortamı

Kullanım : Bakterilerin gecelik kültürde büyütülmeleri

Oxoid nutrient broth no:2 : 5 g

Distile su : 200 ml

Broth ve su karıştırılıp otoklav edilir ve +4°C'de saklanır

(%10'luk) S9 karışımı

Mikrozom : 1 ml

MgCl₂-KCl tuzları : 0,2 ml

Glikoz-6-fosfat : 0,05 ml

0.1 M NADP : 0,4 ml

0.2 M Fosfat tamponu : 5 ml

Steril distile su : 3 ml

(0,15 M) KCl çözeltisi

Kullanım : mikrozom izolasyonu

KCl : 11,275 g

Distile su : 1000 ml

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

(%0,13) Biotin çözeltisi

Kullanım : Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

D-Biotin : 0,65 mg

Distile su : 50 ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülür ve 121°C'de 20 dakika otoklav edilir.

(%0,5) Histidin çözeltisi

Kullanım : Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

L.Histidin HCl (FW.191.7) : 2 g

Distile su : 400 ml

Histidin ile distile su karıştırılarak otoklav edilir.

(%20) Glikoz çözeltisi

Kullanım : MGA ve HBA plakları hazırlanması

Glikoz : 20 g

Distile su : 100 ml

Glikoz distile su içerisinde çözülerek otoklav edilir.

(0,1 µg/µl) Sodyum Azid çözeltisi

Kullanım : Pozitif kontrol

1,0mg/petri başına olmak üzere dimetilsülfoksit'de (DMSO) çözülerek kullanılır.

(2 µg/µl) 2-Aminofluorene (2AF)

Kullanım : Pozitif kontrol

1,0 mg/petri başına olmak üzere dimetilsülfoksit'de (DMSO) çözülerek kullanılır. S9 karışımı gerektirmeyen kimyasaldır

(2,5 µg/µl) 4-Nitro-o-Fenilendiamin (NPD)

Kullanım : Pozitif kontrol

2,5 µg /petri olmak üzere DMSO'da çözülerek kullanılır. TA 98 suşu için S9 karışımı gerektirmeyen bir kimyasaldır. Oda ısında saklanır.

(%6,4) 3-Metil kolantren

Kullanım	:Metabolik aktivasyonun hızlandırılması
3-Metil kolantren	:64 mg
Mısır yağı	:1 ml

(80 mg/kg olmak üzere) mısıryağında çözülerek 0,5ml intraperitoneal olarak enjekte edilir.

2.2. Metod

Bu çalışmada Prof.Dr.Bruce N.Ames (University of California, Berkeley, CA, USA)'den alınan test bakterilerinin stok kültürlerinin hazırlanması, genetik özelliklerinin kontrol edilmesi ve test Maron ve Ames'in (1983) yöntemine uygun olarak plak inkorporasyon metodu ile yapılmıştır. Deneyler 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 kontroller deneye paralel olarak denenmiştir.

2.2.1. *Salmonella* suşlarının kültürlerinin ve master plakların hazırlanması

Bakteri kültürlerinin Histidin/Biyotin/Ampisilin (HBA) plaklarına paralel ekimleri yapıp 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. 48 saat sonunda iyi izole olmuş bir koloni seçilip, 2ml Nutrient Broth içinde süspanse edilmiş bir gece (12-16 saat) 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda bir öze dolusu sıvı kültür alınıp Histidin/Biyotin/Ampisilin agar üzerine çizgi ekim yapılmış ve 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Hazırlanan bu plaklar +4°C de iki ay süre ile saklanabilmektedir.

2.2.2. *Salmonella* suşlarının stoklanması ve stok kültürlerin açılması

Test suşlarının canlılığını ve mutant özelliklerini uzun süre koruyabilmeleri için stoklanmaları gerekir. Bunun için Histidin/Biyotin/Ampisilin agarda üremiş olan *Salmonella* suşlarından iyi izole olmuş bir koloni öze alınıp alınıp 2 ml Nutrient Broth içeren tüplerde süspanse edilir ve 37°C'de bir gece (12-16 saat) inkübe edilir. Bu sürenin sonunda steril ependorf tüp içerisine 1ml bakteri kültürü ve 0,09 ml dimetil sülfoksit (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 alınarak Histidin/Biyotin(HB) agar plaklarına paralel ekim yapılmış

ve 37°C'de 48 saat inkübe edilmiş ve bu sürenin sonunda iyi izole olan bir koloni öze ile alınıp Histidin/Biyotin/Ampisilin agar plaklarına paralel ekim yapılmıştır. HBA plakları 37°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası master plaklar +4°C'de iki ay süre ile saklanmıştır ve gerektiğinde gecelik kültür hazırlamak için kullanılmıştır.

2.2.3. *Salmonella* suşlarının kontrol testlerinin yapılması

2.2.3.1. Bakterilerin genotiplerinin kontrol edilmesi

Ames test sisteminde testin güvenilirliği açısından test suşlarının orjinal mutasyonlara sahip olup olmadığını belirlemek için deneylere başlamadan önce kontrolleri yapılmaktadır. Bu kontroller sırasıyla aşağıdaki şekildedir.

Histidin gereksinimi kontrolü

Test suşlarının his⁻ özelliği suşların minimal glikoz agar üzerine ekilmeleri yolu ile kontrol edilir. Bunun için, bir gece Nutrient Broth içinde üretilen bakteriler histidin/biyotin içeren ve sadece biyotin içeren minimal glukoz agarlı plaklara ekilerek 37°C'de 48 – 72 saat inkübe edilir. Suşların histidin varlığında üreyip histidin yokluğunda ürememeleri, his⁻ karakterini doğrulamaktadır. İnkübasyon sonunda HB plaklarında üreme gözlenirken MGA plaklarında üreme olmadığı görülmüştür.

R faktörünün kontrolü

Test bakterilerinde plazmidlerin varlığı ampisiline dirençlilikleri açısından test edilir. Bu amaçla Nutrient Broth'da büyütülen bakteri kültürünün histidin / biyotin / ampisilin içeren HBA plaklarına çizgi ekimi yapılmıştır. 37°C'de 24 saatlik bir inkübasyon sonucu, R faktörü içeren mutant bakterilerin ampisilinli plaklarda büyüdüğü gözlenmiştir.

R_{fa} mutasyonunun kontrolü

Bu mutasyonun varlığı kristal viyoleye duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için Nutrient Broth'da büyütülen kültürlerden alınan 0,1 ml'lik örnekler 45°C'lik su banyosunda ısıtılmış 2 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra çalkalanarak Nutrient agar plaklarına dökülmüştür. Donduktan sonra 0,5 cm çapında kesilmiş steril filtre kağıdından hazırlanmış ve %0,1'lik 10 µl kristal viyole çözeltisi emdirilmiş diskler plağın ortasına yerleştirilmiştir. Plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda diskin çevresinde bakteri

büyümesinin görülmediği gözlenmiştir. Kristal viyole bakteri içine kolayca girip etkilediği için bakterilerin üremeleri engellenmiş ve bakterilerin Rfa mutasyonu taşıdıkları gösterilmiştir.

uvrB mutasyonunun kontrolü

Bu mutasyonun varlığı ultraviyole ışınlarına duyarlılık testi ile kontrol edilir. Bu test için Nutrient Broth'da bir gece üretilen bakteri kültüründen öze ile alınan örnekler, Nutrient Agar bulunan plağın bir kenarından diğer kenarına uzanacak şekilde çizgi ekimi yapılmıştır. Plağın yarısı bir plastikle kapatılıp 15 watt'lık UV lambası altında, 33 cm uzaklıktan 8 sn süreyle ışınlanmıştır. UV'ye maruz bırakılan plağın kapağı kapatılarak 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Kullanılan UV ışığı dozu, uvrB mutasyonu taşıyan bakterileri öldürecek düzeyde olduğundan UV'ye maruz kalan kısımda büyüme olmamıştır. Kapatılan kısımda normal üreme gözlenmiştir. Bu sonuç bize kullanılacak olan bakterilerin uvrB mutasyonu taşıdığını göstermiştir.

Kendiliğinden geriye dönüş sıklığının kontrolü

Test suşlarının kendiliğinden his⁻ durumundan his⁺ durumuna dönüşmesi belirli sınırlar içindedir. Bu sınırlar TA98 için, 30–50 revertant/plak, TA100 için 90–130 revertant/plak'tır. Kendiliğinden geri dönüş frekanslarını saptayabilmek için minimal glikoz agarlı plaklar hazırlanır. Nutrient Broth'da 12 – 14 saat süreyle 37°C'de büyütülen test bakterilerinin 0,1 ml alınarak 45°C'deki su banyosunda ısıtılan ve 0,05 mm histidin biyotin içeren 2 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra 0,2 ml 0,5 M histidin biyotin solüsyonu da eklenip test tüpü çalkalanarak MGA plaklarına yayılmış ve 37°C'de 48 saat inkübe edilerek inkübasyondan sonra plaklarda geriye dönen koloniler sayılmıştır.

2.2.3.2. Sıvı kültürün ml'sindeki bakteri sayısının belirlenmesi

Deneyde kullanılan gecelik kültürün ml'sinde bulunan bakteri sayısını bulmak için HBA plaklarından bir koloni alınarak NB içinde süspansiyon edilmiş çalkalamalı inkübatörde 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda gecelik kültürün 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 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 x 10⁹ bakteri

olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bakteri kültürünün optik densitesi 650 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülüp saf kültürün (10^0) optik dansitesi 0,165 olarak belirlenmiştir.

2.2.4. Test maddelerinin sitotoksik etkilerinin saptanması

Kullanılan test bileşiklerinin test bakterileri için öldürücü olmayan dozunun saptanması için top agara 0,1 ml bakteri kültürü ve 0,1 ml test bileşiğinin değişik konsantrasyonları eklenmiştir. Karışım nutrient agarlı plaklara dökülerek 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra plaklardaki koloni sayıları ile kontrol plakları karşılaştırılarak toksik ve toksik olmayan dozlar belirlenmiştir. Buna göre test bileşiğinin 1000 µg/plak dozunun üzerindeki konsantrasyonlarının toksik olduğu bulunmuş ve 1000 µg/plak, 100µg/plak, 10 µg/plak, 1 µg/plak, 0,1 µg/plak olmak üzere 5 doz seviyesinde mutajenite deneylerinin yapılmasına karar verilmiştir.

2.2.5. Memeli karaciğer mikrozomlarının hazırlanışı

Promutajen maddelerin saptanabilmesi için karaciğer mikrozomları hazırlanarak plak üzerinde ya da tüpte kimyasalların metabolik aktivasyonları sağlanır. Sıçanların öldürülmelerinden beş gün önce karın boşluklarına mikrozomal enzimlerin miktarlarını arttırmak için mısır yağında çözülmüş 3-metil kolantren 80 mg/kg miktarda olacak şekilde enjekte edilmiştir.

Rattus norvegicus türünde erkek bir rat başının arkası sert bir yere vurularak öldürülmüştür. Hayvan ayaklarından otopsi kutusuna sabitleştirilerek steril makas ve bistüri ile aseptik şartlarda karaciğeri alınmıştır. Alınan karaciğer -4 °C'de soğutulmuş olan 0,15 M KCl solüsyonuna 1 g karaciğer, 1 ml KCl olacak şekilde önceden tartılmış steril behere konularak tartımı yapılmıştır. Sonra birkaç kez soğuk KCl ile yıkanarak karaciğerler yeni bir behere geçirilmiş, 3 ml 0,15 M KCl/1 g karaciğer oranı gözetilerek KCl eklenmiştir. Karaciğerler steril bir şekilde küçük parçalara ayrılmıştır. Doku parçaları zamanla homojenize edilmiş ve homojenat 9000 xg'de 10 dakika süreyle santrafüjlenmiştir. Süpernetant kısım (S9) alınıp bundan 0.1 ml ayrılarak S9 preparasyonunun steril olup olmadığı nutrient agar üzerine ekim yapılarak saptanmıştır. Kontaminasyon olduğu durumlarda S9 preparasyonu 0,25 µm çaplı filtre kağıtlarından geçirilerek steril hale getirilmiş ve -20°C'de saklanmıştır.

2.2.6. Karaciğer S9 karışımının hazırlanması

S9 fonksiyonunda bulunan mikrozomal enzimlerin metabolik aktivasyon reaksiyonlarını yürütebilmeleri için gereken şu kofaktörler S9 homejantına eklenmiştir. 8mM MgCl₂, 5 mM Glikoz-6-fosfat; 33 mM KCl, 4 mM Sodyum fosfat (pH 7.4) ve S9 (0,04 ml 59/1 ml S9 karışımı)

2.2.7. Ames testinin yapılışı

Bu çalışmada Ames/Salmonella/Mikrozom testinin Maron ve Ames (1983)'in yöntemine uygun olarak plak-inkorporasyon metodu uygulanmıştır.

Her birinin içinde 2 ml top agar bulunan ve 45 °C'lik su banyosunda ısıtılan tüplere 0,1 ml test bileşiği, 0,2 ml Histidin-Biyotin çözeltisi ve 0,1 ml bir gecelik bakteri kültürünü eklenmiştir. İyice çalkalanıp Minimal Glikoz Agar (MGA) plaklarına dökülmüştür. Bu plaklar hızla çevrilerek homojen dağılım sağlanmıştır. 15 dakika bekledikten sonra 37°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrielerde koloniler sayılmıştır.

S9 karışımı varlığında yapılan deneylerde 45 °C' lik su banyosunda ısıtılan tüplerde bulunan 2ml top agar'ın üzerine 0,2 ml Histidin-Biyotin solüsyonu, 0,1 ml bakteri kültürü, 0,1 ml test maddesi 0,5 ml buzda bekletilen S9 karışımından eklenerek iyice çalkalanmış, MGA plaklarına dökülerek 37°C'de 48 - 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrielerde koloniler sayılmıştır. Deneyler her bir doz için 3 ayrı plak olmak üzere yapılmıştır. Her deney iki kez tekrar edilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesi için deneylere paralel olarak pozitif, spontan ve solvent (DMSO) kontrollerde gerçekleştirilmiştir. S9 yokluğunda pozitif kontrol olarak TA 100 için Sodyum azid, TA 98 için 4-nitro-o-fenilendiamin, S9 varlığında ise her iki suş için de 2-Aminofluorene kullanılmıştır.

2.2.8. Sonuçların değerlendirilmesi

Bu çalışmada 1-Etil-4,5-Difenil-1H-İmidazol türevi mutajenite testine tabi tutulmuştur. Örneklerin belirlenen dozları 3 paralel olarak aynı anda test edilmiş ve birbirinden bağımsız olarak farklı zamanlarda 2 deney yapılmıştır. Ayrıca test bileşenlerinin etkilerinin memelilerin metabolik aktivasyonları sonucunda değişip değişmediğini belirlemek amacıyla S9 fraksiyonu varlığında da deney aynen tekrarlanmıştır. Deneylerde her bir plaktaki revertant kolonilerin sayısının

aritmetik ortalaması alınmış ve sonuçların değerlendirilmesi için SPSS istatistiksel programının student-t testi kullanılmıştır.

SPSS istatistiksel programının student-t testinde kullanılan, her bir plaktaki revertant kolonilerin sayısı aşağıda verilmiştir. Bu verilerle elde edilen student-t testinin sonuçları Ek' de gösterilmektedir.

TA98 (S9-)

DMSO 22+28+27+20+18+24

A₁ 6+7+2+5+8+3

A₁₀⁻¹ 27+26+26+20+21+20

A₁₀⁻² 32+36+30+33+24+24

A₁₀⁻³ 31+30+24+20+20+22

A₁₀⁻⁴ 24+20+21+18+24+22

TA98 (S9+)

DMSO 30+25+34+32+29+28

A₁ 25+21+13+28+23+25

A₁₀⁻¹ 18+12+15+19+10+11

A₁₀⁻² 23+27+20+28+19+28

A₁₀⁻³ 26+28+25+27+21+23

A₁₀⁻⁴ 24+21+30+18+22+20

TA100 (S9-)

DMSO 141+81+136+128+138+119

A₁ 90+101+94+84+91+93

A₁₀⁻¹ 120+105+147+206+172+187

A₁₀⁻² 129+178+180+127+142+130

A₁₀⁻³ 140+115+121+110+129+127

A₁₀⁻⁴ 95+90+107+96+88+110

TA100 (S9+)

DMSO 139+135+141+126+144+129

A₁ 104+102+107+140+98+106

A₁₀⁻¹ 138+151+144+146+127+156

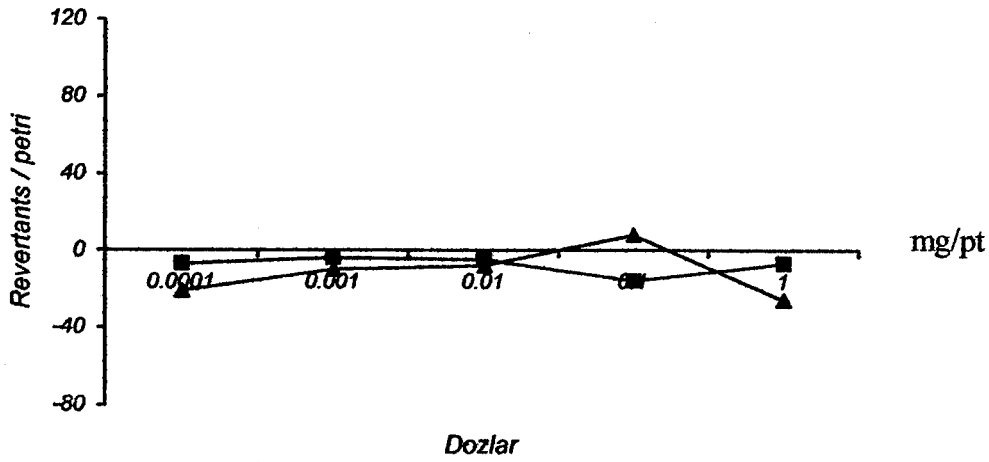
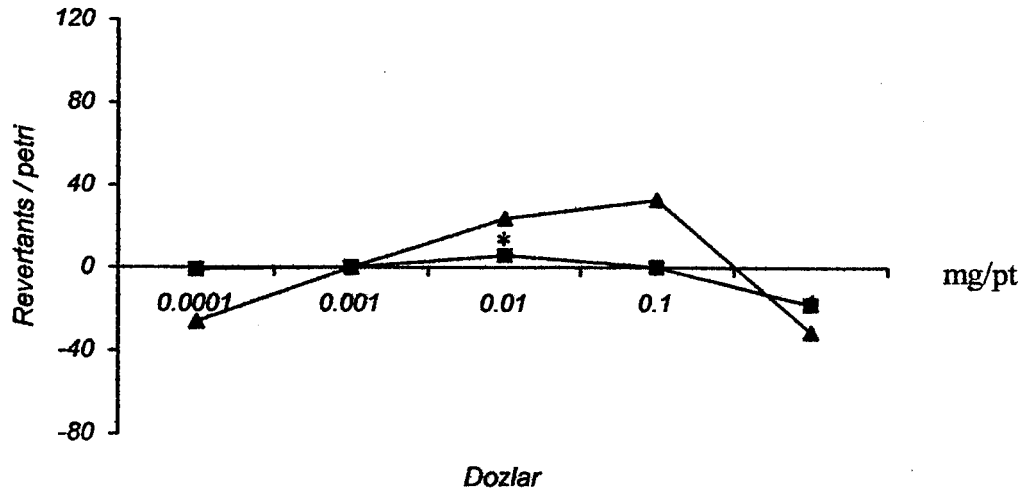
A₁₀⁻² 145+107+121+119+133+139

A₁₀⁻³ 123+132+135+114+122+127

A₁₀⁻⁴ 107+101+119+121+116+120

A: Test kimyasalı (1-Etil-4,5-Difenil-1H-İmidazol türevi)

3.BULGULAR



Şekil 3.1 Metabolik aktivasyon yokluğunda (a) ve metabolik aktivasyon varlığında (b) 1-Etil-4,5-Difenil-1H-İmidazol tarafından indüklenen revertantların doz-yanıtlı eğrileri. Sonuçlar iki ayrı çalışmadan alınan altı petrinin ortalamasıdır. Çözücü kontrol değerleri çıkartılmıştır. Her konsantrasyonların sonuçları student-t vasıtası ile yapılan çözücü kontrolleri ile karşılaştırılmıştır
* $P \leq 0,05$

Tablo 3.1 1-Etil-4,5-Difenil-1H-İmidazol türevinin metabolik aktivasyon yokluğunda ve metabolik aktivasyon varlığında yapılan mutajenite analizlerinin ortalama sonuçları ve değerlendirmesi

Örnekler mg/pt	TA98			TA100		
	Rev/pl	P	M	Rev/pl	P	M
S9(-)						
Negatif kontrol	23,1±3,9			123,83±22,4		
Test Kimyasalı						
10 ⁰	5,1±2,3	0	+	92,1 ±5,5	0	+
10 ⁻¹	23,3±3,3	0,93	-	156,1±39,2	0,11	-
10 ⁻²	29,8±4,9	0,02	+	147,6±24,8	0,11	-
10 ⁻³	24,5±4,8	0,76	-	123,6±10,7	0,98	-
10 ⁻⁴	21,5±2,3	0,39	-	97,6±8,9	0,02	+
S9(+)						
Negatif kontrol	29,6±3,1			135,6±7		
Test Kimyasalı						
10 ⁰	22,5±5,2	0,01	+	109,5±15,2	0	+
10 ⁻¹	14,1±3,7	0	+	143,6±10,2	0,14	-
10 ⁻²	24,1±4,07	0,02	+	127,3±14,1	0,22	-
10 ⁻³	25 ±2,6	0,01	+	125,5±7,5	0,03	+
10 ⁻⁴	22,5±4,1	0	+	114 ±8,1	0	+

Rev/pl: Revertant koloni sayısı/petri.

P: Student -t testi sonuçlarına göre sig (2-tailed) sonuçları.

M: Mutajenite.

S9(-): Metabolik aktivasyon yokluğunda

S9(+): Metabolik aktivasyon varlığında

Tablo 3.2. Metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda *Salmonella* mutajenite testinde çözücü kontrol ve pozitif kontrollerinin sonuçları

Kimyasallar(μg / plate)	Revertant / petri	
	- S9	+ S9
DMSO	23 \pm 3.9 ^a	30 \pm 3.1 ^a
	123 \pm 22.4 ^b	136 \pm 7.0 ^b
4-NPD (20)	1223 \pm 74.2 ^a	
AZS (1.5)	586 \pm 51.4 ^b	
2-AF (10)		714 \pm 16.4 ^a
		692 \pm 41.8 ^b

-S9 : metabolik aktivasyonsuz; +S9: metabolik aktivasyonlu; DMSO: dimetilsulfoksit, (çözücü kontrol); 4-NPD: 4-nitro-*o*-fenilen diamin; AZS: sodyum azid; 2-AF: 2 aminofloren (pozitif kontroller); a: TA 98; b: TA 100

Tablo 3.3. 1-Etil-4,5-difenil-1H-imidazol türevinin mutajenik aktiviteleri

Test kimyasalı	TA 98		TA 100	
	-	-S9 / +S9	-S9 / + S9	
1-Etil-4,5-difenil-1H-imidazol		+ ^{TD} +	+ ^{TD}	+ ^{TD}

-S9 : metabolik aktivasyonsuz; + S9: metabolik aktivasyonlu; -: mutajenik değil, +: mutajenik, TD: dos-ilişkili toksisite, +^{TD}: mutajenik etkiden sonra en yüksek doz toksiktir

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde çok miktarda kimyasal maddeyle iç içe olduğumuzdan dolayı kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılması oldukça önem taşımaktadır. Yaşadığımız ortamları kirleten iç ve dış etkenlerin olup olmadığı , bu kirlilik derecesinin Dünya Sağlık Örgütünün belirlediği sınırlar içinde olup olmadığı ve olası mutajenik etkileri çeşitli test yöntemleriyle araştırılmaktadır. [2,13]

Bu çalışmada 1-Etil-4,5-difenil-1H-imidazol türevinin mutajenik aktivitesi *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları kullanılarak araştırılmıştır. Sitotoksik değer belirlenerek bu değer altındaki dozlar denenmiştir. Deneyle 5 ayrı dozda yapılmıştır. Her doz için 3 ayrı plak kullanılıp aritmetik ortalamaları alınmıştır.

1-Etil-4,5-difenil-1H-imidazol türevinin mutajenitesi Tablo 3.1’de ve Tablo 3.3’de gösterilmiştir. Bir bileşik revertantlarının sayısı bağlantılı doz biçiminde arttığı zaman zayıf mutajen olarak kabul edilmektedir. Revertantlarının sayısının ve doz ilişkili pozitif cevaba eşlik eden çözücü kontrol değerlerinin arasındaki belli farklılık mutajenitenin delili olmaktadır.

Bu çalışmada TA98 ve TA100 suşları bileşiğe farklı mutajenik hassasiyetler sergilemiştir. Genel biçimde test edilen türev TA98 üzerinde TA100’deki cevaplarla karşılaştırdığımızda daha büyük mutajenik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

Test sonuçlarımıza göre 1-Etil-4,5-difenil-1H-imidazol bileşiği ile muamele edilen TA98’ in metabolik aktivasyon yokluğunda revertant koloni sayısı kontrolle karşılaştırıldığında 10^{-2} dozu için istatistiksel açıdan anlamlı sayılabilecek bir fark belirlenmiştir. TA100’ ün ise revertant sayısı doza bağlı artmaktadır. Bu artış mutajenitenin bir diğer göstergesi sayıldığından mutajenik aktivitesinin olduğu düşünülebilir.

Metabolik aktivasyon varlığında her iki suş içinde denenilen dozların tamamına yakınında revertant koloni sayısı negatif kontrolden daha azdır. Bu durum 1-Etil-4,5-difenil-1H-imidazol türevinin metabolitlerinin suşlar üzerinde toksik etki gösterdiğinin kanıtıdır.

Çeşitli imidazol türevleri ile ilgili yapılan pek çok benzer çalışmalar mevcuttur.

Vikse ve arkadaşları 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. [32]

Forster ve arkadaşları tarafından imidazol ve onun metabolitleri olan hidantoim, 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. [33]

Yen ve Chen'de aynı yöntemle çeşitli çay ekstratlarının ve yapraklarının içerdikleri katekin, kafein, folik asitli bileşikler, askorbik asit, karoten ve tokoferoller'in antimutajenik aktivitesini araştırmışlardır. Bunun için, yine heterosiklik imidazol bileşikleri ile bakteriyal mutajenite uyarılmıştır. [34]

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 ($P \leq 0.001$) bulunmuştur. [35]

Britvic ve arkadaşları metimidazol'ün *Salmonella* kullanılarak Ames yönteminde test etmişler ve metabolik aktivasyon için sazan balığının sindirim bezlerinden 56 elde ettikleri fraksiyonu kullanmışlardır. Sonuçta, TA 98 suşunda metimidazol etkisiyle yüksek oranda geri dönüşüm gözlenmiştir. [36]

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 *invivo* mutajenik testler karıştırılarak araştırılmış ve sonuçta, saydığımız bileşiklerin bakteriyal test sistemlerinde daha mutajenik sonuçlar verdikleri Joseph, ve arkadaşları 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. [37]

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. [38]

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. [39]

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. [40]

Bu çalışmanın sonucunda test edilen bileşiğin TA98 ve TA100 suşlarının her ikisi içinde, metabolik aktivasyonsuz ortamda mutajenik özellik gösterdiği belirlenmiştir. Bu mutajenite çerçeve kayması mutasyonu olarak daha güçlü şekilde gözlenmiştir.

Bu maddenin metabolitleri de her iki suş için mutajenik özellikte olup, özellikle TA98 suşu üzerinde toksik etkileride gözlenmiştir.

Ames testi yüksek duyarlılıkta kolaylıkla uygulanabilen , iyi tesis edilen bir test olsa da bazen yanlış negatif ya da pozitif sonuçlar göstermektedir. Bu madde farklı genotip özelliğe sahip test suşları ile ve farklı organizma gruplarının kullanıldığı farklı test yöntemleriyle de test edildikten sonra genel bir sonuca gidilmelidir. Sadece tek bir çalışmaya dayanarak kesin bir sonuç ortaya koymak mümkün değildir. Bu bağlamda imidazol türevlerinin öncül ilaç molekülleri olarak nitelendirilmeden önce, farklı test sistemlerinden gelen sonuçlar ile karşılaştırmak için daha fazla araştırılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] BAĞCI, H., *Yaz Okulu Moleküler Biyoloji Ders Notları*, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Ankara , Türkiye (1985).
- [2] ERGENE, E., *Bazı 2-Substitue 1H-Fenantro[9,10-d] İmidazol Bileşiklerinin Mutajenik Etkilerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (1998).
- [3] KORKMAZ, F., *Bazı imidazol türevlerinin mutajenik aktivitesinin ames test sisteminin plak inkorporasyon ve ön inkübasyon metodları ile araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (1995).
- [4] DÖKMECİ, İ., *Toksikoloji, Akut Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi*, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, Türkiye (1988).
- [5] VURAL, N., *Toksikoloji*, Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, Türkiye, 56,416 (1984).
- [6] MERİÇ, A., *Bazı İmidazol Türevlerinin Sentezleri, Yapı Aydınlatmaları, Fizikokimyasal Parametrelerin Tayinleri ve Aneljezik Etkilerinin Araştırılması Üzerinde Çalışmalar*, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (1997).
- [7] DİLEK, B., *Porsuk Nehri Sedimanının Genotoksik Etkisinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (2004).
- [8] AKMAN, Y., KETENOĞLU, O., EVREN, H., KURT, L .ve DÜZENLİ, S., *Çevre Kirliliği*, Palme Yayıncılık, Ankara, Türkiye (2000).
- [9] DEMİRSOY, A., *Yaşamın Temel Kuralları/Genel Biyoloji*, Cilt 1, Kısım 1, Ankara, Türkiye, (1992.)
- [10] DİRİL, N., DURUSOY, M., ÖKSÜZOĞLU, E., ÖZTURK, K., KARAGÖZ, E.ve KIRTILOĞLU, E., *Kısa Zamanlı Test Sistemleri*, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Yaz Okulu, Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Ders Notları, Ankara, Türkiye (1997).
- [11] SUZUKI, Griffiths, Miller, Lewontin, *An Introduction to Genetic Analysis*, Fourth Edition, New York, USA, (1989).

- [12] ERKAN, S., *Moleküler Biyoloji*, Bornova/İzmir, (1992).
- [13] MARON, D.M. ve AMES, B.N., *Revised Methods for The Salmonella Mutagenicity Test*, Mutation Research, **113**, 173-215 (1983).
- [14] TEMİZKAN, G., *Moleküler Teknik*, İstanbul Üniversitesi yayınları, İstanbul, Türkiye, (1996).
- [15] YEŞİLBAĞ, K., *Mutasyonel Değişimler ve Veteriner Virolojideki Önemi*, Uludağ Üniversitesi Journal of Veterinary Medical, **21**, 125-131, (2002).
- [16] SINGER, B. ve GERUNBERGER, D., *Molecular Biology of Mutagenesis and Carcinogenesis*, 335, (1994).
- [17] KAYAALP, O., *Tıbbi Farmakoloji*, Hacettepe Taş Yayınları, Ankara, Türkiye, (1995).
- [18] ÜN, R., *Halkalı Organik Bileşikler*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, Türkiye, (1977).
- [19] FORSTER, R., BLOWERS, S.D., CİNELLİ, S., MARQUARDT, H., ve WESTENDORF, J., *Mutagenicity Testing of İmidazole and Related Compounds*, Mutat Res, **292**, 71-79, (1992).
- [20] KAYA, E.O., *Biyokimya*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, Türkiye, 16, 410, (1992).
- [21] AMES, B.N., *İdentifying Environmental Chemicals Causing Mutation and Cancer*, Science, **204**, 587-593, (1979).
- [22] AMES, B.N., *Food Constituents as a Source of Mutagens Carcinogens and Antikarsinogens*, Genetic Toxicology of Diet, 3-32, (1986).
- [23] AMES, B.N., *Mutagenesis and Carcinogenesis, Endogenous and Exogenous Factors Environ, Mol Mutagen*, 14(suppl. 16), 66-77, (1989).
- [24] VOUTSINAS, G., KAPPAS, A., DEMOPOULOS, N.A. ve CAMOUTSIS, C., *Mutagenicity of Four Homo-aza-steroidal Esters of m-N, N-bis (2-chloroethyl) Aminocinnamic Acid in the Ames Test*, Mutation Research, **319**, 325-329, (1993)
- [25] AMES, B.N., *Besinsel Karsinojen ve Antikanserojenler, Osijen Radikalleri ve Doku Bozumumları*, **221**, 1256-1264, (1983).

- [26] KALAYCIOĞLU, A.ve ÖNER, C., *Bazı Bitki Özütlerinin Antimutajenik Etkilerinin Ames-Salmonella Test Sistemi ile Araştırılması*, Doğa, Tr.J.of Botany, 117-122, (1994).
- [27] SKOUKIS, N. P., BARBEE, S.J, JACOPSON-KRAM, D., PUTMAN, D.L. ve SAN R.H.C., *Evaluation of the Genotoxic Potential of Zinc Pyrithone in the Salmonella Mutagenicity (Ames) Assay, CHO/HGPRT Gene Mutation Assay and Mouse Micronucleus Assay*, Journal of Applied Toxicology, 13, 4, 283-289, (1993).
- [28] İZBIRAK, A., SÜMER, S. ve DİRİL, N., *Gıdalara Katılan Bazı Azo Boyalarının Mutajenik Etkilerinin Test Edilmesi*, IX. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21/23, Eylül, Bildiri, (1988).
- [29] VOUTSINAS, G., KAPPAS, A., DEMOPOULOS, N.A. ve CATSOULACOS, P., *Comparative Study on the Mutagenicity of Three Structurally Related Substituted Aniline Mustards in the Salmonella/Microsome Assay*, Mutation Research **298**, 261-267, (1993).
- [30] KOLPISSIS, G., *Structure-Activity Relationships of Aromatic Diamines in the Ames Salmonella typhimurium Assay*, Part II, Mutation Research 269, 926, (1992).
- [31] NYLUND, L. ve EINISTÖ, P., *Mutagenicity Testing of Protein –containing and Biological Samples Using the Ames /Salmonella Plate Incorporation Test and the Fluctuation Test*, Mutation Research, **272**, 205-214, (1993).
- [32] VIKSE, R., KLUNGSYR, L. ve GRIVAS, S., *Mutagenic Activity of Three Synthetic Isomers of the Food Carcinogen 2-Amino-3-methylimidazol [4.5-f] quinoline (IQ) in the Ames Test Mutant*, Res., **319**, 273-278, (1993).
- [33] FORSTER, R., BLOWERS, S.D., CINELLI, S., MARQUARDT, P. ve WESTENDORF, J., *Mutagenicity Testing of Imidazole and Related Compounds*, Mutat, Res., **292**, 71-79,(1992).
- [34] YEN, G.C. ve CHEN, H.Y., *Relationship Between Antimutagenic Activity and Ajo Components of Various Teas*. Mutagenesis, Jan; 11, 1, 37-41, (1996).

- [35] WAGNER, E.D., WASILEWSKA, A.C., CONNOLLY, S. ve 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 Plannt and Mamalian Activation*, Mutat. Res 372, 65-74, (1996).
- [36] BRITVIC, S. ve KURELEC, B., *Selective Activation of Carcinogenic Aromatic Amines to Bacterial Mutagens in the Marine Mussel Mytilus Galloprovincialis*, Comp., Biochem., Physiol., 85C, 1, 111-114, (1986).
- [37] JOSEPHY, P.D., GRUZ, P. ve NOHMI, T., *Recent advences in the Construction of Bacterial Genotoxicity Assays*, Mutat. Res., 386, 1-23, (1997).
- [38] HO, T.A., CARTTS, T.M., ROWLAND, I.R. ve ALLDRICK, A.T., *Inhibition of the Metabolism of Mutagens Occurring in Food by Arachidonic Acid*, Mutat. Res., 269, 279-284,(1992).
- [39] DEBNATH, A.K., SHUSTTERMAN, A.J., LOPEZ de COMPEDRE, R.L. ve HANSCH, C., *The Importance of the Hydrophbic Interaction in the Mutagenicity of Organic Compounds*, Mutat. Res., 305, 65-72,(1994).
- [40] GUPTA, R.L., VATS, V. ve JUNEJA, T.R., *Activation of Tinidazole, an Antiprotozoal Druk to a Mutagen by Mamalian Liver S9*, Mutat. Res., 3701, 195-201,(1996).

EKLER

EK-1 Test kimyasalının (a) 10^0 dozunda (b) 10^{-1} dozunda revertant koloni sayılarının TA98' de metabolik aktivasyon yokluğundaki student-t testi sonuçları

a**Grup İstatistikleri**

VAR00002	N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
VAR00001 1,00	6	23,1667	3,9200	1,6003
2,00	6	5,1667	2,3166	,9458

Bağımsız Örneklem Testi

		Levene' in Varyasyonların Eşitliği Testi		Ortalama Eşitliği İçin t Testi				
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Ortalama Farklılığı	Standart Hata Farkları
VAR00001	Varyasyonlar eşit varsayıldığında	2,286	,162	9,683	10	,000	18,0000	1,8589
	Varyasyonlar eşit olmadığı varsayıldığında			9,683	8,113	,000	18,0000	1,8589

b**Grup İstatistikleri**

VAR00002	N	Mean	Standart Sapma	Standart Hata
VAR00001 1,00	6	23,1667	3,9200	1,6003
2,00	6	23,3333	3,3267	1,3581

Bağımsız Örneklem Testi

		Levene' in Varyasyonların Eşitliği Testi		Ortalama Eşitliği İçin t Testi				
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Ortalama Farklılığı	Standart Hata Farkları
VAR00001	Varyasyonlar eşit varsayıldığında	,046	,834	-,079	10	,938	-,1667	2,0989
	Varyasyonlar eşit olmadığı varsayıldığında			-,079	9,742	,938	-,1667	2,0989

Ek-1 (Devamı) Test kimyasalının (c) 10^{-2} dozunda (d) 10^{-3} dozunda revertant koloni sayılarının TA98' de metabolik aktivasyon yokluğundaki student-t testi sonuçları

c

Grup İstatistikleri

VAR00002		N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
VAR00001	1,00	6	23,1667	3,9200	1,6003
	2,00	6	29,8333	4,9160	2,0069

Bağımsız Örneklem Testi

	Levene' in Varyasyonların Eşitliği Testi	Ortalama Eşitliği İçin t Testi						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Ortalama Farklılığı	Standart Hata Farkları
VAR00001	Varyasyonlar eşit varsayıldığında Varyasyonlar eşit olmadığı varsayıldığında	,335	,576	-2,597	10	,027	-6,6667	2,5669
				-2,597	9,528	,028	-6,6667	2,5669

d

Grup İstatistikleri

VAR00002		N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
VAR00001	1,00	6	23,1667	3,9200	1,6003
	2,00	6	22,5000	3,5637	1,4549

Bağımsız Örneklem Testi

	Levene' in Varyasyonların Eşitliği Testi	Ortalama Eşitliği İçin t Testi						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Ortalama Farklılığı	Standart Hata Farkları
VAR00001	Varyasyonlar eşit varsayıldığında Varyasyonlar eşit olmadığı varsayıldığında	,104	,754	,308	10	,764	,6667	2,1628
				,308	9,911	,764	,6667	2,1628

Ek-1 (Devamı) Test kimyasalının (e) 10^{-4} dozunda metabolik aktivasyon yokluğunda (f) 10^0 dozunda metabolik aktivasyon varlığında TA98' de revertant koloni sayılarının student-t testi sonuçları

e

Grup İstatistikleri

VAR00002	N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
VAR00001 1,00	6	23,1667	3,9200	1,6003
2,00	6	21,5000	2,3452	,9574

Bağımsız Örneklem Testi

	Levene' in Varyasyonların Eşitliği Testi	Ortalama Eşitliği İçin t Testi						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Ortalama Farklılığı	Standart Hata Farkları
VAR00001	Varyasyonlar eşit varsayıldığında Varyasyonlar eşit olmadığı varsayıldığında	2,222	,167	,894	10	,392	1,6667	1,8649
				,894	8,173	,397	1,6667	1,8649

f

Grup İstatistikleri

VAR00002	N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
VAR00001 1,00	6	29,6667	3,1411	1,2824
2,00	6	22,5000	5,2058	2,1252

Bağımsız Örneklem Testi

	Levene' in Varyasyonların Eşitliği Testi	Ortalama Eşitliği İçin t Testi						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Ortalama Farklılığı	Standart Hata Farkları
VAR00001	Varyasyonlar eşit varsayıldığında Varyasyonlar eşit olmadığı varsayıldığında	,746	,408	2,887	10	,016	7,1667	2,4822
				2,887	8,215	,020	7,1667	2,4822

Ek-1 (Devamı) Test kimyasalının (g) 10^{-1} dozunda (h) 10^{-2} dozunda revertant koloni sayılarının TA98' de metabolik aktivasyon varlığındaki student-t testi sonuçları

g

Grup İstatistikleri

VAR00002	N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
VAR00001 1,00	6	29,6667	3,1411	1,2824
2,00	6	14,1667	3,7639	1,5366

Bağımsız Örneklem Testi

	Levene' in Varyasyonların Eşitliği Testi		Ortalama Eşitliği İçin t Testi				
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Ortalama Farklılığı	Standart Hata Farkları
VAR00001 Varyasyonlar eşit varsayıldığında	,762	,403	7,745	10	,000	15,5000	2,0014
Varyasyonlar eşit olmadığı varsayıldığında			7,745	9,690	,000	15,5000	2,0014

h

Grup İstatistikleri

VAR00002	N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
VAR00001 1,00	6	29,6667	3,1411	1,2824
2,00	6	24,1667	4,0702	1,6617

Bağımsız Örneklem Testi

	Levene' in Varyasyonların Eşitliği Testi		Ortalama Eşitliği İçin t Testi				
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Ortalama Farklılığı	Standart Hata Farkları
VAR00001 Varyasyonlar eşit varsayıldığında	1,571	,239	2,620	10	,026	5,5000	2,0989
Varyasyonlar eşit olmadığı varsayıldığında			2,620	9,396	,027	5,5000	2,0989

Ek-1 (Devamı) Test kimyasalının (i) 10^{-3} dozunda (j) 10^{-4} dozunda revertant koloni sayılarının TA98' de metabolik aktivasyon varlığındaki student-t testi sonuçları

I Grup İstatistikleri

VAR00002	N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
VAR00001 1,00	6	29,6667	3,1411	1,2824
2,00	6	25,0000	2,6077	1,0646

Bağımsız Örneklem Testi

	Levene' in Varyasyonların Eşitliği Testi	Ortalama Eşitliği İçin t Testi						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Ortalama Farklılığı	Standart Hata Farkları
VAR00001	Varyasyonlar eşit varsayıldığında	,125	,731	2,800	10	,019	4,6667	1,6667
				2,800	9,673	,019	4,6667	1,6667
	Varyasyonlar eşit olmadığı varsayıldığında							

j Grup İstatistikleri

VAR00002	N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
VAR00001 1,00	6	29,6667	3,1411	1,2824
2,00	6	22,5000	4,1833	1,7078

Bağımsız Örneklem Testi

	Levene' in Varyasyonların Eşitliği Testi	Ortalama Eşitliği İçin t Testi						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Ortalama Farklılığı	Standart Hata Farkları
VAR00001	Varyasyonlar eşit varsayıldığında	,266	,617	3,356	10	,007	7,1667	2,1357
				3,356	9,278	,008	7,1667	2,1357
	Varyasyonlar eşit olmadığı varsayıldığında							

Ek-1 (Devamı) Test kimyasalının (k) 10^0 dozunda (l) 10^{-1} dozunda revertant koloni sayılarının TA100' de metabolik aktivasyon yokluğundaki student-t testi sonuçları

k

Grup İstatistikleri

VAR00002	N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
VAR00001 1,00	6	123,8333	22,4447	9,1630
2,00	6	92,1667	5,5648	2,2718

Bağımsız Örneklem Testi

	Levene' in Varyasyonların Eşitliği Testi	Ortalama Eşitliği İçin t Testi						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Ortalama Farklılığı	Standart Hata Farkları
VAR00001	Varyasyonlar eşit varsayıldığında	4,072	,071	3,354	10	,007	31,6667	9,4405
				3,354	5,612	,017	31,6667	9,4405
	Varyasyonlar eşit olmadığı varsayıldığında							

l

Grup İstatistikleri

VAR00002	N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
VAR00001 1,00	6	123,8333	22,4447	9,1630
2,00	6	156,1667	39,2297	16,0154

Bağımsız Örneklem Testi

	Levene' in Varyasyonların Eşitliği Testi	Ortalama Eşitliği İçin t Testi						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Ortalama Farklılığı	Standart Hata Farkları
VAR00001	Varyasyonlar eşit varsayıldığında	3,191	,104	-1,752	10	,110	-32,3333	18,4514
				-1,752	7,957	,118	-32,3333	18,4514
	Varyasyonlar eşit olmadığı varsayıldığında							

Ek-1 (Devamı) Test kimyasalının (m)10⁻² dozunda (n)10⁻³ dozunda revertant koloni sayılarının TA100' de metabolik aktivasyon yokluğundaki student-t testi sonuçları

m

Grup İstatistikleri

VAR00002	N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
VAR00001 1,00	6	123,8333	22,4447	9,1630
2,00	6	147,6667	24,8408	10,1412

Bağımsız Örneklem Testi

	Levene' in Varyasyonların Eşitliği Testi	Ortalama Eşitliği İçin t Testi					
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Ortalama Farklılığı
VAR00001 Varyasyonlar eşit varsayıldığında	,510	,492	-1,744	10	,112	-23,8333	13,6677
01 Varyasyonlar eşit olmadığı varsayıldığında			-1,744	9,899	,112	-23,8333	13,6677

n

Grup İstatistikleri

VAR00002	N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
VAR00001 1,00	6	123,8333	22,4447	9,1630
2,00	6	123,6667	10,7269	4,3792

Bağımsız Örneklem Testi

	Levene' in Varyasyonların Eşitliği Testi	Ortalama Eşitliği İçin t Testi					
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Ortalama Farklılığı
VAR00001 Varyasyonlar eşit varsayıldığında	1,473	,253	,016	10	,987	,1667	10,1557
Varyasyonlar eşit olmadığı varsayıldığında			,016	7,171	,987	,1667	10,1557

Ek-1 (Devamı) Test kimyasalının (o) 10^{-4} dozunda metabolik aktivasyon yokluğunda (p) 10^0 dozunda metabolik aktivasyon varlığında TA100' de revertant koloni sayılarının student-t testi sonuçları

o

Grup İstatistikleri

VAR00002	N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
VAR00001 1,00	6	123,8333	22,4447	9,1630
2,00	6	97,6667	8,9592	3,6576

Bağımsız Örneklem Testi

	Levene' in Varyasyonların Eşitliği Testi		Ortalama Eşitliği İçin t Testi				
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Ortalama Farklılığı	Standart Hata Farkları
VAR00001 Varyasyonlar eşit varsayıldığında	2,063	,181	2,652	10	,024	26,1667	9,8660
Varyasyonlar eşit olmadığı varsayıldığında			2,652	6,554	,035	26,1667	9,8660

Grup İstatistikleri

VAR00002	N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
VAR00001 1,00	6	135,6667	7,0333	2,8713
2,00	6	109,5000	15,2807	6,2383

Bağımsız Örneklem Testi

	Levene' in Varyasyonların Eşitliği Testi		Ortalama Eşitliği İçin t Testi				
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Ortalama Farklılığı	Standart Hata Farkları
VAR00001 Varyasyonlar eşit varsayıldığında	1,009	,339	3,810	10	,003	26,1667	6,8674
Varyasyonlar eşit olmadığı varsayıldığında			3,810	7,027	,007	26,1667	6,8674

Ek-1 (Devamı) Test kimyasalının (r) 10^{-1} dozunda (s) 10^{-2} dozunda revertant koloni sayılarının TA100' de metabolik aktivasyon varlığındaki student-t testi sonuçları

r

Grup İstatistikleri

VAR00002		N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
VAR00001	1,00	6	135,6667	7,0333	2,8713
	2,00	6	143,6667	10,2111	4,1687

Bağımsız Örneklem Testi

	Levene' in Varyasyonların Eşitliği Testi		Ortalama Eşitliği İçin t Testi				
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Ortalama Farklılığı	Standart Hata Farkları
VAR00001	,389	,547	-1,580	10	,145	-8,0000	5,0618
			-1,580	8,873	,149	-8,0000	5,0618

s

Grup İstatistikleri

VAR00002		N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
VAR00001	1,00	6	135,6667	7,0333	2,8713
	2,00	6	127,3333	14,1657	5,7831

Bağımsız Örneklem Testi

	Levene' in Varyasyonların Eşitliği Testi		Ortalama Eşitliği İçin t Testi				
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Ortalama Farklılığı	Standart Hata Farkları
VAR00001	4,475	,060	1,291	10	,226	8,3333	6,4567
			1,291	7,324	,236	8,3333	6,4567

Ek-1 (Devamı) Test kimyasalının (t) 10^{-3} dozunda (y) 10^{-4} dozunda revertant koloni sayılarının TA100' de metabolik aktivasyon varlığındaki student-t testi sonuçları

t

Grup İstatistikleri

VAR00002	N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
VAR00001 1,00	6	135,6667	7,0333	2,8713
2,00	6	125,5000	7,5565	3,0849

Bağımsız Örneklem Testi

	Levene' in Varyasyonların Eşitliği Testi		Ortalama Eşitliği İçin t Testi				
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Ortalama Farklılığı	Standart Hata Farkları
VAR00001 Varyasyonlar eşit varsayıldığında	,006	,939	2,412	10	,037	10,1667	4,2144
Varyasyonlar eşit olmadığı varsayıldığında			2,412	9,949	,037	10,1667	4,2144

y

Grup İstatistikleri

VAR00002	N	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata
VAR00001 1,00	6	135,6667	7,0333	2,8713
2,00	6	114,0000	8,1486	3,3267

Bağımsız Örneklem Testi

	Levene' in Varyasyonların Eşitliği Testi		Ortalama Eşitliği İçin t Testi				
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Ortalama Farklılığı	Standart Hata Farkları
VAR00001 Varyasyonlar eşit varsayıldığında	,250	,628	4,930	10	,001	21,6667	4,3944
Varyasyonlar eşit olmadığı varsayıldığında			4,930	9,791	,001	21,6667	4,3944