

**BAZI 2-SÜBSTİTÜE PERİMİDİN BİLEŞİKLERİNİN  
MUTAJENİK AKTİVİTELERİNİN AMES  
MUTAJENİTE TESTİ İLE BELİRLENMESİ**

**Burcu KORKMAZ**  
Yüksek Lisans tezi

**Anadolu Üniversitesi**  
**Fen Bilimleri Enstitüsü**  
**Biyoloji Anabilim Dalı**  
Ağustos- 2005

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Burcu KORKMAZ'ın "Bazı 2-Süstitüe Perimidin Bileşiklerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames Mutajenite Testi ile Belirlenmesi" başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi ..... / ..... / 2005 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul / edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Mehtap KUTLU	.....
Üye	: Prof. Dr. Ahmet ÖZATA	.....
Üye	: Yard. Doç. Dr. Hüseyin BERBER	.....

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

**ÖZET****Yüksek Lisans Tezi****BAZI 2-SÜBSTİTÜE PERİMİDİN BİLEŞİKLERİNİN MUTAJENİK  
AKTİVİTELERİNİN AMES MUTAJENİTE TESTİ İLE BELİRLENMESİ****Burcu KORKMAZ****Anadolu Üniversitesi****Fen Bilimleri Enstitüsü****Biyoloji Anabilim Dalı****Danışman: Doç. Dr. Mehtap KUTLU****2005, 99 sayfa**

Bu çalışmada, 8 perimidin türevlerinin mutajenik etkileri, ayrıca metabolik aktivasyon olmadan ve olarak Ames/ *Salmonella*/ Mikrozom testi yoluyla araştırılmıştır. Deneyde *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. TA 98 çerçeve kaymasına yol açan mutajenlerin, TA 100 ise baz çifti değişimine yol açan mutajenlerin belirlenmesi için kullanılmıştır. S9 yokluğunda pozitif kontrol olarak TA 100 için sodyum azid, TA 98 için 4-nitro-*o*-fenilendiamin, S9 varlığında ise her iki suş için 2-Aminofluoren kullanılmıştır. Test sonuçları iki deneyin ortalaması alınarak değerlendirilmiş ve pozitif ve negatif kontrol grupları ile karşılaştırılmıştır. Buna göre, genel bir tarzda maddeler toksik etkili bulunmuşlar ve mutajeniteleri toksisiteleri yoluyla maskelenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Mutajenite, Ames test, Mikrozom, Perimidin, *Salmonella typhimurium*.

**ABSTRACT****Master of Science Thesis****DETERMINATION OF MUTAGENIC ACTIVITIES OF SOME 2-SUBSTITUTED PERIMIDINE COMPOUNDS BY AMES MUTAGENICITY TEST****Burcu KORKMAZ****Anadolu University****Graduate School of Sciences****Biology Program****Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehtap KUTLU****2005, 99 pages**

In this study, the mutagenic effects of these 8 perimidine derivatives were also investigated by Ames/ *Salmonella*/ Microsome test in the absence and presence of metabolic activation. TA 98 and TA 100 strains were used in experiments. TA 98 is designed for frame-shift mutagens and TA 100 is designed for base-pair mutagens. At the absence of S9, Sodium Azide was used as a positive control for TA 100, 4-Nitro-o Fenilendiamin was used for TA 98. At the presence of S9, 2-Amino fluorene was used as a positive control for both test strains. Solvent Dimethyl sulphoxide (DMSO) and spontaneous control groups were used as a negative control. Results of experiments were compared with positive and negative control groups data. So that, in a general manner the compounds were found to have toxic effects and their mutagenicity may be masked by their toxicity.

**Keywords:** Mutagenicity , Ames assays, Microsome, Perimidine, *Salmonella typhimurium*.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesinde, değerli bilgilerini, yardım ve önerilerini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mehtap KUTLU' ya, ve bölümün tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Fen Fakültesi Dekanı hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ÖZATA' ya, yüksek lisansa girmeme öncü olan Yard. Doç. Dr. Filiz SUSUZ' a, değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. İlhan IŞIKDAĞ' a, her zaman değerli fikir ve bilgilerinden yararlandığım, ayrıca yardımlarını gördüğüm Araş. Gör. Gözde AYDOĞAN ve Araş. Gör. Volkan KILIÇ' a teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Çalışmamın laboratuvar aşamasında bana yardımcı olan Sayın Uzman Erdoğan ÇAKIR' a özellikle çalışmamın her aşamasında bana yardım eden, beni destekleyen sevgili arkadaşım Yüksek Biyolog Sinem Yüksel' e ve emeği geçen tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

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

Burcu KORKMAZ

Ağustos-2005

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa No:</b>
<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>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Mutasyon .....	4
1.1.1. Kromozom Mutasyonları .....	5
1.1.1.1. Kromozom sayı değişimleri .....	5
1.1.1.2. Kromozom yapı değişimleri (Kromozom mutasyonları) .....	8
1.1.2. Gen Mutasyonları (Nokta Mutasyonu) .....	12
1.1.2.1. Gen mutasyonlarının sınıflandırılması .....	13
1.1.2.2. Mutasyonların oluşum şekilleri .....	14
1.2. Kimyasal Mutajen ve Kanserojenler .....	19
1.3. Metabolik Aktivasyon.....	22
1.3.1. Mikrozomal enzimler .....	23
1.3.2. Faz I reaksiyonları .....	25
1.3.3. Faz II reaksiyonları .....	27
1.4. Mutajenite Test Sistemleri .....	28
1.4.1. Sitogenetik yöntemler .....	32
1.4.1.1. Yapısal kromozom bozulma analizi (CA).....	32
1.4.1.2. Mikronükleus testi (MN).....	32
1.4.1.3. Comet testi .....	33
1.4.1.4. HPRT mutasyon yöntemi .....	33
1.1.1.5. Kardeş kromatid değişim yöntemi(SCE) .....	33
1.4.2. Bakteriyal Yöntemler. ....	34

1.4.2.1. UMU (SOS) test sistemi .....	34
1.4.2.2. <i>E.Coli</i> lac I mutasyon test sistemi.....	35
1.4.2.3. <i>Salmonella</i> /mikrozom (Ames) test .....	35
1.5. Perimidin'in yapısı ve genel sentezi.....	38
1.5.1. Perimidin'in yapısı ve genel özellikleri .....	38
1.5.2. Perimidin'in genel sentez yöntemi .....	40
<b>2. MATERYAL VE METOD .....</b>	<b>42</b>
2.1. Materyal .....	42
2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler .....	42
2.1.2. <i>Salmonella typhimurium</i> test suşları .....	42
2.1.3. Test maddeleri (Dozları ve hazırlanışı) .....	42
2.1.4. Deneyde kullanılan ortamların içerikleri ve hazırlanmaları .....	45
2.2. Metod .....	52
2.2.1. <i>Salmonella</i> suşlarının kültürlerinin ve master plaklarının hazırlanması .....	52
2.2.2. <i>Salmonella</i> suşlarının stoklanması ve stok kültürlerinin açılması .....	52
2.2.3. <i>Salmonella</i> suşlarının kontrol testlerinin yapılması (Bakterilerin genotip kontrollerinin yapılması).....	54
2.2.3.1. Histidin gereksinimi kontrolü .....	54
2.2.3.2. <i>uvrB</i> mutasyonu kontrolü .....	55
2.2.3.3. <i>Rfa</i> mutasyonu kontrolü .....	56
2.2.3.4. R faktör varlığının kontrolü .....	57
2.2.3.5. Spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü .....	58
2.2.4. Sıvı kültürün ml'sindeki bakteri sayısının belirlenmesi .....	59
2.2.5. Test maddelerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi .....	60
2.2.6. Memeli karaciğer mikrozomlarının hazırlanması .....	60
2.2.7. Ames mutajenite testinin yapılması.....	61
2.2.8.1. S9' suz (-)deney .....	61
2.2.8.2. S9' lu (+) deney .....	62
2.2.8.3. Sonuçların değerlendirilmesi .....	63

<b>3. BULGULAR .....</b>	<b>64</b>
<b>4. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>81</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>86</b>



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa No:</b>
1.1. Kromozom değişmeleri (Delesyon çeşitleri) .....	10
1.2. Kromozom değişmeleri (Duplikasyon, inversiyon, translokasyon) .....	11
1.3. Kimyasal madde tarafından uyarılmış nokta mutasyonunun şematik olarak gösterilmesi .....	12
1.4. Çerçeve kayması mutasyonunun şematik olarak gösterilmesi .....	16
1.5. Replikasyon ve yapısal hatalarından dolayı 5- Bromurasil keto formundan, enol formuna transizyonu.....	17
1.6. Sitokrom P 450 tarafından substratın hidroksilasyonu .....	25
1.7. 2- substitüe perimidin' in genel formülü.....	39
1.8. Perimidin' in genel reaksiyon denklemi .....	40
1.9. Perimidin' in reaksiyon mekanizması .....	41
2.1. a. TA 98 suşunun master plaklarda üremesi.....	53
2.1. b. TA 100 suşunun master plaklarda üremesi.....	53
2.2. a. TA 98 suşunda histidin gereksinimi kontrolü sonucunda HB b. plaklarında üreme .....	54
2.2. c. TA 100 suşunun histidin gereksinimi kontrolü sonucunda d. HB plaklarında üreme .....	55
2.3. a. TA 98 suşunda <i>uvrB</i> mutasyonu kontrolü.....	56
2.3. b. TA 100 suşunda <i>uvrB</i> mutasyonu kontrolü .....	56
2.4. a. TA 98 suşunda <i>Rfa</i> mutasyonu kontrolü.....	57
2.4. b. TA 100 suşunda <i>Rfa</i> mutasyonu kontrolü.....	57
2.5. a. TA 98 suşunda R faktör varlığının kontrolü.....	58
2.5. b. TA 100 suşunda R faktör varlığının kontrolü.....	58
2.6. a. TA 98 suşunda spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü.....	59
2.6. b. TA 100 suşundan spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü.....	59
2.7. Ames testinin yapılışı.....	62
3.1. TA98 ve TA 100 suşlarının metabolik aktivasyon olmadan (S 9' suz) kimyasal test maddeleriyle verdiği doz cevap eğrileri.....	73

3.2. TA98 ve TA 100 suşlarının metabolik aktivasyon varlığında (S9'lu) kimyasal test maddeleriyle verdiği doz cevap eğrileri.....	77
--	----

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

	<b>Sayfa No:</b>
1.1. İnsan popülasyonunda görülen aneuploid anomaliler .....	8
1.2. İnsanlarda kanser yaptığı belirlenmiş olan kimyasal maddeler, endüstriler veya endüstriyel prosesler .....	21
1.3. Kimyasal mutajen / kanserojen maddelerin saptanmasında kısa zamanlı testlerden bazıları .....	30
1.4. TA 98 ve TA 100 suşlarının mutasyon parametreleri.....	36
1.5. Mutajenitesi araştırılan kimyasal test maddelerinin isimlendirilmeleri ve kimyasal formülleri .....	43
3.1. TA 98 suşu kullanılarak metabolik aktivasyon olmadan (S9'suz) elde edilen sonuçlar.....	65
3.2. TA 98 suşu kullanılarak metabolik aktivasyon varlığında (S9' lu) elde edilen sonuçlar.....	67
3.3. TA 100 suşu kullanılarak metabolik aktivasyon olmadan (S9'suz) elde edilen sonuçlar.....	69
3.4. TA 100 suşu kullanılarak metabolik aktivasyon varlığında (S9' lu) elde edilen sonuçlar.....	71

## 1.GİRİŞ

Yaşadığımız yüzyılda insan sağlığında biyolojik, genetik ve fiziksel yapı gibi faktörlerin yanı sıra çevresel faktörlerin de önemli bir yer tuttuğu vurgulanmaktadır. Son yıllarda hızlı nüfus artışı, aşırı kentleşme, teknolojik gelişmeler ve bunlara bağlı olarak yaşam düzeyinin yükselişi doğal kaynakları olumsuz yönde etkilemiş ve canlıların yaşam ortamlarında bozulmalara, dengesizliklere neden olmuştur.

Çevremizde biyolojik etkileri bilinmeyen ve sayıları milyonları bulan sentetik ve doğal kimyasal maddeler bulunmaktadır. ACS (American Chemical Society) raporlarına göre bu maddelerin günlük kullanımda da yer alması, çok ayrıntılı olarak ele alınmasına sebep olmaktadır ve özellikle kanserojenik potansiyelleri açısından test edilmesi sağlığımız açısından gereklidir [1-6].

Günlük yaşama önemli ölçüde giren X ışınları, gamma ışınları ve radyasyon kaynaklarının (televizyon , telsiz telefon, radyoaktif atıklar, nükleer silahlar, nükleer santraller vb.) hatalı ya da kötü amaçlarla kullanımının biyolojik sistemlere zarar verdiği kanıtlanmıştır [7]. Buna karşın birçok araştırmacı mutajen kimyasalların, radyasyondan çok daha zararlı olduğunu savunmaktadır. Çünkü radyasyon kaynağını tespit etmek, korunma önlemi almak ve miktarını ölçmek mümkün iken; birçok kompleks kimyasal madde karışımına maruz kalan bireylerin uğradığı zararın analizi çok daha zor olmaktadır. Hatta kimyasal maddenin mutajenik etkisi varsa bile maruz kalan kişide ve de yavrusunda da görülmeyebilir. Ancak resesif bir allelin, nesiller sonra ortaya çıkma olasılığı vardır. Çok küçük dozları mutasyona neden olabileceği gibi kanserojen de olabilir [8,9]. Diğer bir taraftan da kimyasal mutajen kaynaklarının sınırsız oluşu durumu daha da zor konuma sokmaktadır.

Mutajenlerle yüz yüze gelmenin çeşitli yolları vardır. Bunlardan birincisi; diyetimizde bulunan doğal kimyasalları almamız, ikincisi; endüstriyel kimyasallar, pestisidler, saç boyaları, kozmetik ve ilaçlar gibi yapay kimyasalları kullanmamız, üçüncüsü ise; sigara dumanı, su ve havadaki kirleticiler gibi karmaşık bileşiklerle yüz yüze gelmemizdir.

Kimyasal maddelerin mutajenik aktivitelerini araştıran ilk alışmalar İkinci Dünya Savaşı'ndan hemen sonra bir grup kimyasal üzerinde yapılmış ve ilk olarak mustard gazının etkili bir mutajen olduğu tespit edilmiştir. Dünyanın hemen her yerinde yapılan deneylerle, diğer bazı kimyasallara dikkat çekilmiştir. 1972 yılında yapılan bir araştırmada yiyecekleri renklendirme, koruma ve diğer amaçlarla kullanılan 2500 kadar katkı maddesi olduğu tespit edilmiştir. Yiyeceklere bulaşarak vücuda giren pestisidler ve çeşitli amaçlarla kullanılan ilaçlar üzerinde durulmuştur. Bu sayede pek çok mutajenite test sistemi geliştirilmiştir [10].

Mutajenlerin etki mekanizması kesin olarak aydınlatıldıktan sonra belirli çevresel mutajenlerin insanda kansere sebep olabileceği şüphesi doğmuştur. Mutajenite ve karsinojenite arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma ile bilinen 175 karsinojenik maddelerin 157'sinin aynı zamanda mutajen olduğu ve karsinojenite ve mutajenite arasında % 90 oranında bir bağlantı olduğu ileri sürülmüştür. Bu sebeple kimyasal maddeleri "mutajen" ve "kanserojen" olarak iki grupta incelemek yerine, mutajen/ kanserojen olarak incelemek daha doğru olduğu kabul edilmektedir [11].

Mutasyon genetik materyallerin doğrudan etkilenmesiyle ortaya çıkabilmesine rağmen, kanser çok basamaklı karmaşık biyolojik olaylar sonucu ortaya çıkabilmektedir [2]. Dolayısıyla her kanserojen mutajendir, ama her mutajen kanserojen değildir. Örneğin; sodyum nitrit çok etkili bir mutajen olmasına rağmen kanser yaptığı henüz gösterilememiştir [12].

Çevredeki mutajen ve kanserojenlerden başka insan vücudunda da normal metabolik süreçler sonunda sentezlenen kanserojenler bulunmaktadır. Nitröz aminler ve diğer azotlu nitrozolü bileşikler, disülfidler, hidroksil aminler bu şekilde oluşan endojen mutajenlerdir [12].

İnsanlar için kanserojenik bulunan kanserojenler aromatik aminler, benzidin, naftil-amin, asbestos, krom, akilleyici ajanlar, konjuge östrojenler, radon, nikel ve ziftlerdir.

İnsanlar için muhtemel (ılımlı) karsinojenler de vardır. Kadmiyim, nikel, aflotoksin, oramin, karbontetraklorür, dimetil sülfat, etilen sitrat gibi [12].

Kanseri doğuran nedenleri dış faktörlerde arama gereği ilk kez XVII. yüzyıl sonlarında Sir Pervical Pott' un klinik gözlemleriyle başlamıştır. Bu araştırmacı Londra' da baca temizleyicileri arasında görülen skrotal kanser sıklığının yüksek olma nedenini, bu işçilerin derilerine bulaşan baca işlerine bağlamıştır. Kimyasal maddelerin kanser oluşturabileceği ise deneysel olarak ancak, 1915 yılında Yamagiwa ve Ichikawa isimli iki Japon araştırmacının, tavşan derisine sürekli ve lokal olarak katran uygulandığında cilt kanserini gözlemleri ile başlamıştır [8]. Yapılan bir araştırmada da, Çin'de erkeklerde ve sigara içmeyen kadınlarda yüksek oranda akciğer kanserinden ölümlerin gözlemlenmesinin nedeninin çevredeki kömür madeni olduğu belirlenmiştir [13]. Diğer yandan asbest içeren topraklarda çalışan işçilerde yada asbestli madde kullananlarda görülen asbestozis' in de özellikle sigara içenlerde daha kolay akciğer kanseri oluşturması sigaranın kanser üzerine etkisini ortaya koymaktadır [9]. Sigaranın kok kömürü fırınında çalışanlarda üriner mutajeniteyi arttırıcı etkisinin istatistik olarak da önemli olduğu görülmüştür [14].

Karsinojenler genellikle DNA, RNA ve proteinlerdeki nükleofilik (elektronca zengin) gruplara kolaylıkla saldırabilen elektrofiller (elektronca fakir)' dir [15]. Karsinogenezin başlangıç aşaması kimyasallarla nükleik asitlerin karşılaşmasıdır. Kimyasallar diğer hücrel organellerle de bağlanabilirler. Fakat nükleik asitlerle bağlanması genetik bilgiyi bozması bakımından önemlidir. Karsinogenezin başlangıç aşamasında bağlanma olayından sonra bazı faktörlerin de etkisi gereklidir. Bu faktörlerden bazıları; nükleik asitlerin onarımı, inhibisyonu ve genetik yatkınlıklardır. Bu faktörlerin de etkisiyle olay kansere dönüşür. Yani kanser multifaktöriye bir hastalıktır [12].

Kimyasal maddelerin karsinogenik risklerini ortaya çıkarmak için en akılcı yaklaşım deney hayvanlarında tümör indüksiyonudur. Ancak bu testlerin sonuçlanması uzun zaman almakta ve maliyetleri yüksek olmaktadır. Bu nedenle araştırmacılar karsinogenite araştırmalarına esas olabilecek, kısa zamanda sonuç verebilen ve düşük maliyetli birçok kısa zamanlı test sistemleri geliştirmişlerdir. Bu testler kimyasal maddelerin mutajenik etkilerini belirlemeye yöneliktir. Kısa zamanlı testlerden en yaygın olarak kullanılanları bakteriyel testlerdir. Bakteriyel

testler bakterilerin basit üreme ortamlarında hızlı üreyebilmeleri, basit, çabuk ve ucuz uygulanabilir olmaları nedeni ile tercih edilmektedir.

Karsinojenlerin taranmasında mutajenitenin esas alınmasının sebebi genetik kodun, genetik sistemin evrensel oluşu ve mutajenite ile karsinojenite arasındaki korelasyonun yüksek oluşudur [16].

Kanser hastalığının hala yaygın olması ve günümüzde teknolojinin ilerlemesine karşın bu hastalığın ortadan kaldırılamaması kanserin temelini oluşturan maddelerin belirlenmesi gereğini ortaya koymuştur [3]. Her gün artan kimyasal maddelerin mutajenik, kanserojenik etkilerinin saptanması çalışmalarına katkıda bulunmak için sekiz ayrı perimidin türevlerinin mutajenik aktivitesinin kısa zamanlı test sistemi olan Ames / *Salmonella* / Mikrozoom testi uygulanarak araştırılması amaçlanmıştır.

## 1.1. Mutasyon

Bir çok genetik kavramın geliştirilmesinde, kalıtsal materyalin yapı ve içeriğinin dölden döle geçerken değişmediği kabul edilir. Her ne kadar, genler dikkati çekecek kadar kararlı ve yeni döllere bütün özelliklerini koruyarak katılıyorsa da zaman zaman doğal ve yapay koşullar altında mutasyon dediğimiz değişikliklere uğrarlar. Mutasyon kalıtsal materyalin türe özgü normal kombinasyonunu değiştirmeyen, kalıtsal yapıdaki her hangi bir değişikliktir [2,16-17]. Genotipte meydana gelen bu olay bir yada daha fazla karakterdeki değişimle kendini belli eder. Böyle bir değişikliğin ürünü “mutant” olarak adlandırılır. Bu terim bir gen, bir hücre veya birey için kullanılabilir.

Mutasyon olayı çok eski yıllardan beri bilinmekte, yetiştiriciler ve ıslahçılar tarafından bitki ve hayvan ırklarının ıslahında kullanılmaktadır. Darwin çalışmalarında bu olayın önemine eğilmiş, Mendel de ünlü deneylerinde çeşitli mutantları kullanmıştır. 1980 yılında *Oenothera lamarckiana* (eşek çiçeği) üzerinde inceleme yapmaya başlayan Vries, bu bitkiler arasında, seyrek olarak yeni ve farklı tiplerin meydana geldiğini gördü ve böylece değişmeler için ilk defa mutasyon terimini kullandı [16,19,20].

Mutasyonlar doğada kendiliğinden meydana gelebildiği gibi “mutajen” adı verilen fiziksel ve kimyasal dış etkenler tarafından da meydana gelebilirler. Mutasyonlar genellikle organizma için öldürücü, ender olarak da değişen çevre koşullarında bir seleksiyon avantajı olarak yararlı olur. Mutasyon populasyonlardaki çeşitliliğin oluşmasından sorumlu etkenlerden biri olması ve sonuçta türlerin evriminde rol oynaması nedeni ile, genetik ve biyolojik açıdan çok önemli bir olaydır [11,16,20-22].

Mutasyon vücut (somatik) hücrelerinde yada üreme (germ) hücrelerinde görülebilir. Vücut hücrelerinde olan mutasyona “somatik mutasyonlar” denir. Bu mutasyonlar hastalıklara, dejenerasyonlara yol açarak gelişmeyi ve metabolizmayı olumsuz etkileyebilirler. Birçok kanser türünün somatik hücrelerde genellikle bir mutasyon nedeni ile ortaya çıktığı bilinmektedir. Somatik dokulara ait hücrelerdeki mutasyonların etkisi meydana geldiği bireyin genotipinde gözlenebilir, fakat döle geçemediği için ortadan kalkar. Üreme hücrelerinde görülen mutasyona ise “germinal mutasyonlar” denir. Üreme hücrelerinin DNA’ında görülen değişimler genetik içeriğin farklılığına yol açar ve bu mutasyon kalıtsal olarak yeni nesillere aktarılır [16,22-24].

Mutasyon kapsamına giren değişimler kolay anlaşılması için iki grup altında toplanabilir. Bunları “kromozom mutasyonları” ve “gen mutasyonları” olarak sıralayabiliriz. Kromozom mutasyonları da “kromozom sayı değişimleri” ve “kromozom yapı değişimleri” şeklinde 2 gruba ayrılır [2,23-25].

### **1.1.1. Kromozom mutasyonları**

#### **1.1.1.1. Kromozom sayı değişimleri ( Genom mutasyonları )**

Organizmanın kromozom sayıları türlere göre farklılık gösterir, ancak her tür için sabittir. Bir bireyin her hücresi onun ait olduğu türe özgü sayıda kromozom taşır. Eşeyli üreme gösteren canlılarda, gametlerde bulunan kromozomlara “takım” yada “genom” adı verilir ve “n” sembolüyle gösterilir. Eukaryotların çoğu diploiddir, yani somatik hücrelerinde iki takım kromozom bulunur. Kromozomlar bazen mitoz veya 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 [18,24,26]. Bu olayda kromozomun bir parçası değil tümü yok olur yada sayıca artar. Euploidi ve aneuploidi olarak 2 şekli vardır [20].

### **A. Euploidi**

Euploidi kromozom takımı sayısındaki değişimlerdir. Bir takımdaki kromozomların hepsinin birden sayısının tam katlar halinde yükselmesi veya organizmada tek takım kromozom bulunması biçiminde olabilir [16,18,20]. Değişik şekilleri vardır:

**1) Monoploidi:** Normalde diploid olan hayvan ve bitki hücrelerinde ender olarak bazı bireylerin hücrelerinde sadece bir takım yani  $n$  sayıda kromozom bulunur. Bu olaya monoploidi, böyle bireylere monoploid denir. Monoploidler genellikle döllenmemiş yumurtanın gelişmesiyle oluşurlar. Bu olay kendiliğinden olabileceği gibi dış etkenlerle de gerçekleşebilir [16].

**2) Poliploidi:** Bir takımdaki kromozom sayısının hepsinin birden ikiden fazla kata, yükselmesidir. Bu olay sonunda  $3n$ ,  $4n$ ,  $5n$  ve daha yüksek katsayılı kromozomlara sahip bireyler meydana gelir. İnsanda poliploidi ender bir olaydır. Çünkü düşüklere ve ölü doğumlara neden olmaktadır. Daha çok bitkilerde bulunan birkaç tipi vardır:

**a) Autopoliploidi:** Bir poliploidin sahip olduğu kromozom takımlarının hepsi aynı türe ait ise olaya "Autopoliploidi"(otopoliploidi) adı verilir. Diploid bir bitki örneğin AA genomuna sahipse burada  $4A$  yada daha farklı sayıda olur.

**b) Allopoliploidi:** Bir poliploidin sahip olduğu genomlar birden fazla türe ait ise olaya "Allopoliploidi" denir. Burada bir tür yada cinsin genomu AA, diğeri de BB ise AABB poliploidisi görülür.

**c) Endopoliploidi:** Hücre genelde bölünme yeteneğini kaybetmesine rağmen kromozomlar mitoz olayında olduğu gibi sürekli bölünerek çoğalır. Çekirdek zarı parçalanmadığı için, kromozomlar birlikte kalacakları için kromozom takımı sayısı  $2n'$  in üzerine çıkacaktır [16,18,20].

## **B. Aneuploidi**

Bir takımdaki kromozomlardan birinin veya birkaçının sayısının değişmesi olayına ‘‘Aneuploidi’’ denir [16,18,20]. Çeşitli tipleri vardır:

**1) Monosomi:** Diploid bir bireyde tek bir kromozomun eksik olması durumudur. Böyle bir birey, mayoz sırasında kromozomların ayrılması nedeniyle oluşmuş ve bir kromozomu eksik ( $n-1$ ) olan bir gametle, normal ( $n$ ) bir gametin birleşmesi sonucu meydana gelir ve kromozom sayısı  $2n-1$  olur.

**2) Nullisomi:** Bir takımda bir kromozom homoluğu ile birlikte eksik olması yani bir kromozom çeşidinin hiç bulunmamasıdır. Bu tip diploid bireyler  $2n-2$  formülü ile gösterilirler.

**3) Polisomi:** Bir takımdaki kromozomların birinin veya birkaçının artmasıdır. Trisomik fertlerde kromozom sayısı  $2n+1$ , tetrasomiklerde  $2n+2$ , polisomiklerde ise  $2n+3$  şeklindedir.

**4) Somatik aneuploidi:** Vücut hücrelerinin mitozu sırasında bazı kromozomlar birbirinden ayrılmayabilir. Yavru hücrelerin birinde monosomi, diğerinde trisomi ortaya çıkar. Eğer bu bozukluk erken embriyo evrelerinde meydana gelirse, hücrelerin mozaik gelişiminden dolayı erginde büyük bir bölgeyi kapsayacak şekilde anormal kromozom sayısı görülür. Eğer embriyonun geç evrelerinde yada doğumdan sonra bu anormallik ortaya çıkarsa, etkilediği vücut bölgesi daha küçük olacağından dolayı ya görülmez yada önemsiz bir şekilde kendini gösterir. Ancak kanser ayrıcalık gösterir. Bu hastalığın bazı çeşitleri aneuploididir ve geç evrelerde çıkarsa etkisini gösterir [16,18,20,28].

Aneuploidinin bütün formları mayoz sonrası ciddi sonuçlar doğurur. Memelilerde X kromozomunun aktivasyonundan dolayı gametik kromozomlarındaki aneuplodizasyon, otozomlarda olandan çok daha sık görülmektedir. İnsanda otozomal monosomi ( $2n-1$ ) çok nadir olarak, gelişmeden ölen embriyolarda görülmektedir [28]. Buna karşın fetal ölümlere sebep olan aneuploidi anomalinin yarısını, otozomal trisomi ( $2n+1$ ) oluşturmaktadır. Sadece birkaç otozomal trisomi tipinde canlı doğumlar görülür, ancak bunların çoğunda erken ölüm meydana gelmektedir. Sadece 21. kromozomun trisomisi olan Down sendromunda bireyler yetişkinlik çağına gelebilmektedir (Çizelge 1.1 ) [24].

Çizelge1.1. İnsan popülasyonunda görülen aneuploid anomaliler [27]

<b>Kromozomlar</b>	<b>Sendrom</b>	<b>Doğumda görülme sıklığı</b>
<b><u>Otozomlar</u></b>		
Trisomik 21	Down	14.3 / 10.000
Trisomik13	Patav	2 / 10.000
Trisomik 18	Edwards	2.5 / 10.000
<b><u>Seks kromozomu (kadın)</u></b>		
XO , monosomik	Turner	4 / 10.000
XXX , trisomik	Yaşayabilir	14.3 / 10.000
XXXX , tetrasomik	“	“
XXXXX , pentasomik	“	“
<b><u>Seks kromozomu (erkek)</u></b>		
XYY , trisomik	Normal	25 / 10.000
XXY , trisomik	Klinefelter	40 / 10.000
XXYY , tetrasomik	“	“
XXXY , tetrasomik	“	“

#### **1.1.1.2. Kromozom yapı değişimleri (Kromozom mutasyonları)**

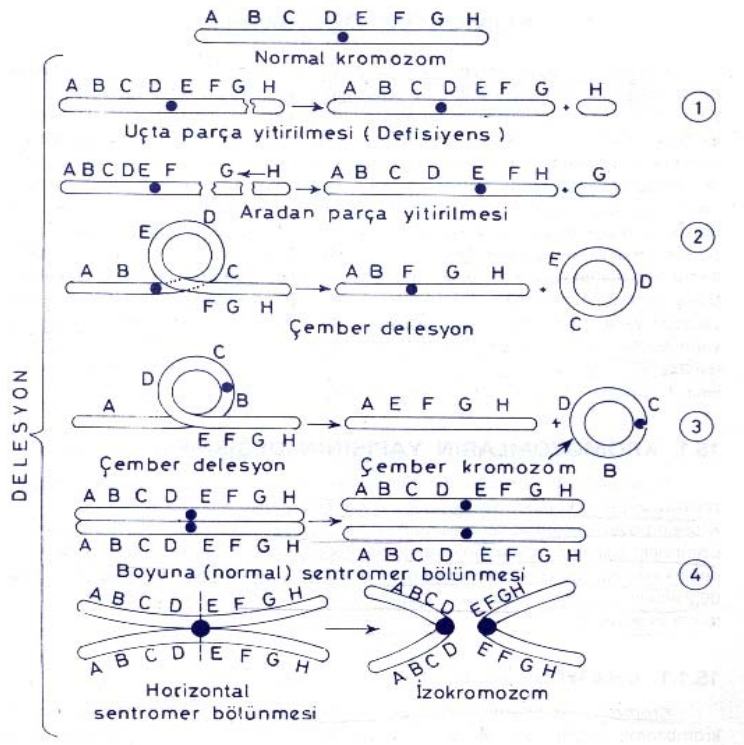
Kalıtsal bilgide değişmelere yol açan olaylar kromozomların yapılarındaki değişimler sonucunda da oluşabilirler. Bu olaylarda kromozom sayısı aynı kalır. Ancak kromozomlarda bazı parçaların kaybolması, artması yada yer değiştirmesi şeklinde kalıtsal madde değişikliğe uğrar [18,24]. Yapı değişmelerinin hepsinde önce kromozomda ya da kromozomu oluşturan kromatidlerden birinde, bir ya da birden fazla noktada kırılmalar olur. Kırılma kendiliğinden oluşabileceği gibi; X ışını, UV , gamma ( $\gamma$ ) ışınları ve kimyasal

maddeler gibi dış etkenler tarafından da oluşturulabilir. Kromozom kırıklarına yol açan etkenlere “Radiometrik etkenler” adı verilir [16].

Kromozom yapı değişimindeki kırılmalar iki şekilde gerçekleşir. Bunlardan biri “kromatid tipi” kırılmalarlardır. Kromozomun yalnız bir kromatidinde kırılma olur. Kopan parça, sağlam olan kardeş kromatidir, yanında ve ona çok yakın olarak kalır. Bu tip kırılmaların çoğunda kırık uçlu parçalar yeniden birbirine yapışır. İkinci tip kırılmalarda “kromozom tipi” kırılmalarlardır. Kromozomun her iki kromatidi aynı noktada kırılır, iki kırık uç meydana gelir ve kromozomun biri sentromerli (sentrik), diğeri sentromersiz (asentrik) olmak üzere iki parçaya ayrılır. Bu kromozom yapı değişiklikleri farklı şekillerde meydana gelebilir [16].

#### **A. Delesyon**

Kromozomun parça kaybetmesi olayıdır. Bazı araştırmacılar kromozomun ucundan bir parçanın kopup kaybolmasına “Defisiyans” aradaki herhangi bölgeden bir parçanın kopup kaybolmasına “Delesyon” olarak adlandırmışlardır (Şekil 1.1) [16]. Delesyon olayında eğer hücre diploid ise, kaybolan genlerin allelleri kardeş kromozom üzerinde bulunacağından öldürücü olmaz. Fakat gen dengesinin ve sonuçta fonotipin değişmesine neden olur. Eğer yitirilen parça çok büyük ise gen dengesi tamamen bozulur ve sonuçta ölüm meydana gelir. Erkeklerin X kromozomunda meydana gelecek bu şekilde bir parça yitilmesi, Y kromozomu üzerinde alleli olmadığı için ölümle sonuçlanabilir. Parça yitilmesi ile birlikte bazı canlıların parazit yada saprofit yaşama uyum gösterdikleri savunulmuştur. Bu yolla bazı enzimler yitirilince, zorunlu olarak parazitizm veya saprofitizm ortaya çıkar [16,18,20].



Şekil 1.1. Kromozom değişimleri (delesyon çeşitleri)

## B. Duplikasyon

Duplikasyon Latince, duplikatio = eşleme anlamına gelir. Burada bir kromozomun belirli bölgesinin çift olması anlamında kullanılır. Bir kromozomun herhangi bir parçayı fazla taşımasına “Duplikasyon” adı verilir. Bu olayda delesyonun tersine parça çoğalması vardır (Şekil1.2 ) [16,18,20].

## C. İnversiyon

İnversiyon Latince, inversio = tersine dönmek kelimelerinden gelir. Bir kromozomun içinden kopan bir parçanın dönerak koştuğu yere ters yönde yeniden yapışmasına “İnversiyon” adı verilir. (Şekil1.2 ) İnversiyon sonucunda invertelenen segment, sentromer içeriyorsa “perisentrik İnversiyon”, içermiyorsa “parasentrik İnversiyon” olarak adlandırılır. Böylece, gen sayısı ve niteliği aynı olmasına karşın, diziliş sırası değişmiş olur. Normal bir kromozomla sinaps yaptığı zaman, allel genler karşı karşıya gelemedikleri için düzensizlikler ortaya çıkar. Krosing-over meydana gelmez ve gen kombinasyonlarında azalma ortaya çıkar. Çok yakın türler ve alt türler arasında meydana melezlemelerden bazı uygun olmayan sinapsların ortaya çıkmasının en büyük nedeni, doğada kromozom

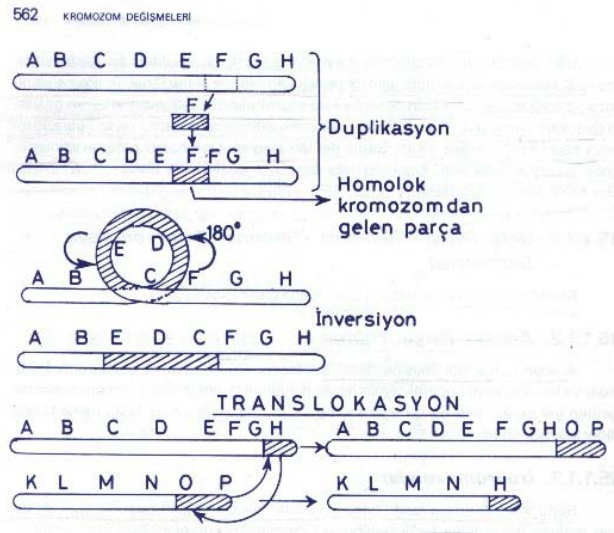
değişiminin en yaygın şekli olarak görülen inversiyonlar olduğu saptanmıştır [16,18,20].

#### D. Translokasyon

Homolog olmayan kromozomlar arasında kromozom parçalarının yer değiştirmesine “Translokasyon” denir (Şekil1.2 ) [16].

Basit translokasyonda, bir kromozomda tek bir noktada kırılma olur ve parçalardan biri bir başka kromozomun ucuna yapışır. Kromozom uçlarının yapışkan olmama özelliği nedeniyle basit translokasyon oldukça ender görülür. İnterkalar translokasyonda kromozomların birinde iki yerde, bir başkasında ise tek noktada kırılma olur ve aradan çıkan parça tek noktada kırığın olduğu kromozomun o bölgesine eklenir. Karşılıklı translokasyon ise en fazla rastlanılan ve en iyi araştırılmış olanıdır. Bu tipte, iki ayrı kromozomda birer kırılma olur ve kopan parçalar birbirinin yerine geçer [18,20,29].

Translokasyonlar, yeni gen kombinasyonlarını ve hücrede DNA miktarının değişmesini sağladığı için evrimsel olarak önemlidir [18,20]. Translokasyonlar, insanda çoğu kez çeşitli fenotipik anormallikler meydana getirirler, düşüklere veya doğumdan sonra birkaç ay içinde ölüme yol açarlar [29].



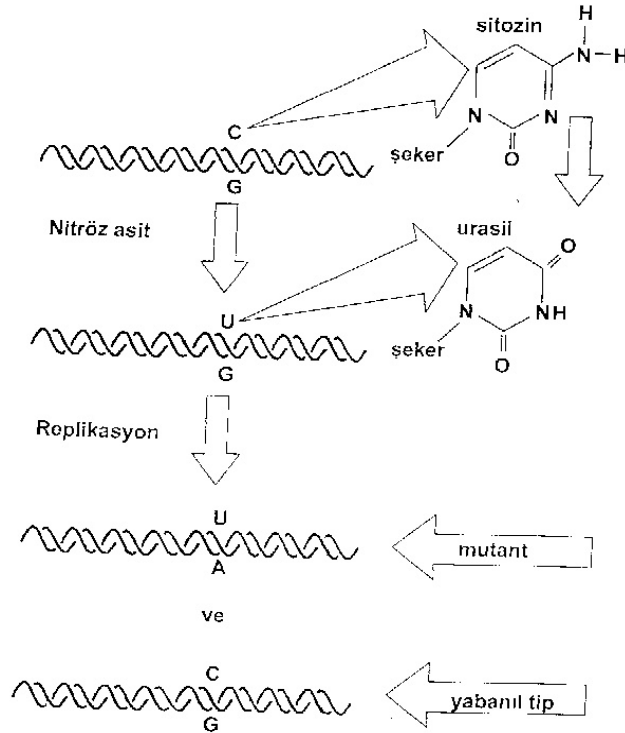
Şekil 1.2. Kromozom değişimleri (duplikasyon, inversiyon,translokasyon)

### 1.1.2. Gen mutasyonları ( Nokta mutasyonları )

Bir genin, genomdaki sayısı veya kromozom üzerindeki yeri değişmeksizin, yapısının değişmesi olayına “Gen Mutasyonu” olayı adı verilir. Genomda çok küçük bir bölgedeki değişimi kapsadığı için gen mutasyonuna “Nokta Mutasyonu” da denir. Gen mutasyon mekanizmasının esasını, dış etkilerle AT / GC oranında veya bazların diziliş sırasında meydana gelen değişiklik oluşturur (Şekil1.3) [16,19,30].

Genlerde değişiklik, bir nükleotidin kazanılması, kaybedilmesi ya da yer değiştirmesi kadar basit olabileceği gibi, normal DNA dizisi içinde birkaç nükleotidin eklenme yada çıkarılması gibi karmaşık da olabilir.

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 çeşidi olur [18].



Şekil 1.3. Kimyasal madde tarafından uyarılmış nokta mutasyonunun şematik olarak gösterilmesi

### 1.1.2.1. Gen mutasyonlarının sınıflandırılması

Gen mutasyonları birkaç şekilde sınıflandırılabilirler. Bu sınıflandırma şekilleri birbirinden tamamen ayrı değildir ve mutasyonun hangi özelliğini tanımladığına bağlıdır. Buna dayanarak üç farklı grupta sınıflandırma yapılabilir [16,31].

#### A. Kendiliğinden olan ve uyarılmış mutasyonlar

Kendiliğinden olan mutasyonlar sadece doğada olan mutasyonlardır. Oluşumlarıyla ilgili olarak hiçbir özgün etken yoktur ve genellikle genlerin nükleotid dizilerinde rast gele olan değişiklikler olarak kabul edilir. Bu mutasyonların çoğu, genlerin azotlu bazlarının yapısını değiştiren organizmadaki normal kimyasal süreçlerle ilişkilidir. Spontan mutasyonlarının çoğunun DNA replikasyonu süresince oluştuğu düşünülmektedir. Genetik şifrede bir hata olduğunda, bu hata kodlanan proteinin amino asit dizisine yansımaktadır. Eğer değişen amino asit molekülün yapısı veya biyolojik aktivitesi için kritik olan bir pozisyonda ise fonksiyonel bir değişiklik ortaya çıkar.

Bu tür spontan olayların aksine, herhangi bir yapay faktörün etkisi sonucu oluşan mutasyonlara ise “Uyarılmış Mutasyonlar” denir. Genellikle, hücrelerdeki kimyasal etkileşmeyi arttıran herhangi bir doğal fenomenin mutasyonları uyaracağı kabul edilmektedir. Örneğin, kozmik ve mineral kaynaklardan sanılan radyasyon ve güneşten gelen ultraviyole radyasyonu mutasyonlara sebep olan faktörlerdir. Mutasyonların yapay olarak uyarıldıklarına dair ilk örnek Muller’in X ışınlarının *Drosophila*’da mutasyona yol açtığını rapor ettiği 1927 yılında gösterilmiştir. Radyasyonun çeşitli formlarına ek olarak, kimyasal maddelerin çoğu da mutajeniktir [31].

#### B. Gametik ve somatik mutasyonlar

Eukaryotik organizmalarda mutasyonların etkileri değerlendirilirken, değişikliğin somatik hücrelerde mi yoksa gametik hücrelerde mi olduğunun ayrımı önemlidir. Somatik hücrelerde oluşan mutasyonlar gelecek nesillere aktarılamamaktadır. Somatik hücrelerde resesif alleller oluşturan mutasyonlar organizma için nadiren önemlidir. Bu tür mutasyonların çoğunun ifadesi



genellikle dominant allel tarafından maskelenir. Gametler ve gamet oluşturan dokulardaki mutasyonlar yeni nesillere aktarıldıklarından çok daha önemlidir. Yeni neslin tüm hücrelerinde ifade potansiyelleri bulunur [31].

### **C. Mutasyonun diğer kategorileri**

Köken veya oluşum nedenlerine ek olarak, mutasyonlar fenotipik özelliklerine göre de sınıflandırılabilir. Tek bir mutasyon birden fazla kategoriye girebilir. Gözle en kolay görülen mutasyonlar, “Morfolojik bir özelliği etkileyen mutasyonlar”dır. Mutasyonların ikinci büyük kategorisi “Besinsel veya biyokimyasal varyasyonlar gösteren mutasyonları” kapsar. Bakteri ve mantarlarda tipik bir besinsel mutasyon, bir aminoasit veya vitamini sentezlemedeki yetersizliktir. Bu organizmalarda, bu tür mutasyonlar her zaman için özgün bir morfolojik özelliği etkilemese bile, bireyin genel sağlık durumu ve yaşam kalitesi üzerinde genel bir etkiye sahip olabilirler.

Mutasyonlar bir organizmanın davranış özelliklerini de etkileyebilir. Örneğin, hayvanların günlük ritimleri veya eşleşme davranışları değişebilir. Bunlara da “Davranış Mutasyonları” denir. Diğer bir mutasyon tipi de “Regülatör Mutasyonlar”dır. Bu mutasyonlar genlerin regülasyonunu yani düzenlenmesini etkileyebilirler. Başka bir grup mutasyon da “Letal (öldürücü) Mutasyonlar” olarak adlandırılır. Besinsel ve biyokimyasal mutasyonlar da letal olabilir. Örneğin, bir amino asidi sentezleyemeyen bir bakteri, o amino asitin olmadığı bir ortamda üreyemez.

Son olarak, yukarıdaki mutasyon kategorilerinden herhangi biri “koşullu mutasyon” olarak bulunabilir. Yani bir organizmanın genomunda mutasyon olabilir, fakat varlığı ancak belli koşullar altında fark edebilir [31].

#### **1.1.2.2. Mutasyonların oluşum şekilleri**

Mutasyonları moleküler düzeyde dört tip değişimden köken alarak oluşurlar [2,30].

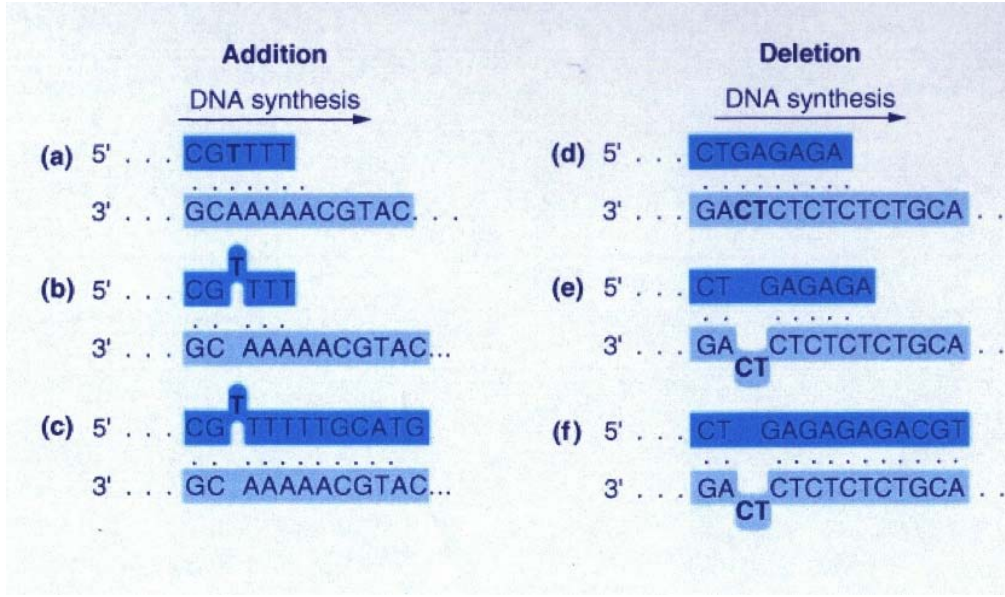
### **A. Baz çifti değişimleri (base-pair)**

Bu tip değişimler nokta mutasyonları oluştururlar. Genin içindeki bir ya da birkaç baz çiftinin yerini başka baz çiftinin almasıyla meydana gelirler. Bu tip mutasyonlarda değişimler pürin-pürin değişimleri yani “transizyon” şeklinde olabileceği gibi pürin-pirimidin değişimleri yani “transversiyon” şeklinde de olabilir. Bunun dışında bazın kimyasal yapısındaki değişimle eşleşme sırasında yapılan hidrojen bağlarının sayısı değişir ve yanlış eşleşme yapılır. Bazın kimyasal yapısının değişmesi iki şekilde meydana gelebilir. Geçici tautomerik değişimde genlerin yapısında bulunan bazların halka yapısındaki atomların yer değişmesi ile replikasyon sırasında bazlar arasında yanlış eşleşmeler yapılabilir. Örneğin; A bazı hatalı olarak G bazı 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 [2].

### **B. Çerçeve (kodon) kayması mutasyonları (frame-shift)**

Genin ürününü belirleyecek bölgede kodonların kayması ve genin ürününe ait bilginin değişmesi şeklinde olur. Bu mutasyonlar bir baz çiftinin aradan çıkması (delesyon) şeklinde olabileceği gibi yeni bir baz çiftinin yapıya girmesi (adisyon) şeklinde de olabilir (Şekil 1.4 )

Her iki şekilde de gerçekleşen mutasyon sonucu mutasyonun meydana geldiği noktadan itibaren tüm kodonlar değişime uğrar ve genin ürünündeki değişiklik oldukça fazla olur. Bu nedenle çerçeve kayması ile oluşan mutasyonun fenotipte ortaya çıkma olasılığı baz çifti değişimi ile oluşan mutasyonların ortaya çıkma olasılığına göre daha yüksektir [25,30,31].



Şekil 1.4. Çerçeve kayması mutasyonunun şematik olarak gösterilmesi

### C. Bazlar arasında bağların oluşması (Dimerizasyon)

Primidin 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 kısalır. Buna bağlı olarak DNA zincirinde yamulmalar ortaya çıkar ve bu bölgeler transkripsiyon sırasında atlanır [25, 30, 31].

### D. Bazlarla şekerler ve şekerlerle fosforlar arasında bağların kopması

Bu tip mutasyonlarda DNA zincirinin bütünlüğü bozulur. Bu mutasyonlar şu durumlarda oluşabilirler [31].

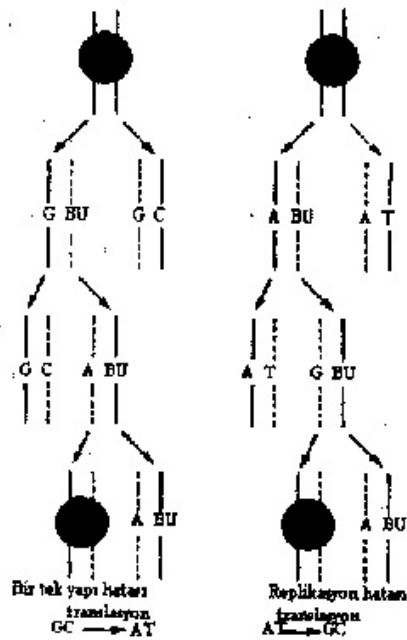
#### 1) Tautomerik değişmeler:

Watson ve Crick DNA' daki pürin ve pirimidinlerin tautomerik formlarda yani azotlu bir bazın her birinin, molekülde sadece tek bir protonun kayması ile farklılık gösteren, yapısal izomerler olarak adlandırılan alternatif kimyasal formları halinde bulunabileceğini ileri sürdüler. Biyolojik bir öneme sahip olan tautomerler, sitozin ve adeninin amino-imino formları ile timin ve guaninin keto-enol formlarını içerir. Bu tür bir kayma molekülünün bağ özelliğini

değiştireceğinden, tautomerik kaymaların baz çifti değişimlerine veya mutasyonlara yol açacağı ileri sürülmüştür [31].

## 2) Baz analogları:

Nükleik asit biyosentezi sırasında, pürin ve pirimidinler yerine geçebilen moleküllere “baz analogları “ denir. Bunlar genellikle mutajenik kimyasallardır. Örneğin, urasilin bir türevi olan 5-bromourasil (5-BU) timin analogu olarak davranır ve pirimidin halkasının 5 numaralı pozisyonunda halojenlenir. Metil grubu yerine brom atomunun bulunması, tautomerik bir kaymanın gerçekleşme olasılığını artırır. Eğer 5-BU timin yerine DNA’ ya girerse ve enol formuna neden olan tautomerik bir kayma olursa, 5- BU guanin ile eşleşir. Bir replikasyon döngüsünden sonra, A=T yerine G≡C şeklinde bir transisyon oluşur (Şekil 1.5). Mutajenik olan diğer baz analogları da vardır. Örneğin, 2-amino pürin (2-AP), adenin analogu olarak başarıyla hizmet verebilir. Timinle eşleşme yatkınlığına ek olarak, replikasyonu takiben sitozin ile de eşleşerek A=T’ den G≡C’ ye transisyonlara yol açar [31].



Şekil 1.5. Replikasyon ve yapısal hatalarından dolayı 5-Bromurasil keto formundan enol formuna transisyonu

### 3) Akilleyici ajanlar:

II. Dünya Savaşı'nda keşfedilen kükürt içeren hardal gazları, kimyasal savaş araştırmalarında tanımlanan ilk kimyasal gruplardan biriydi. Hardal gazları alkilleyici ajanlardır. Nükleotidlerdeki amino veya keto gruplarına  $CH_3$  veya  $CH_2$  gibi bir alkil grubu eklerler. Etilmeton sülfonat (EMS), guaninin 6 numaralı ve timinin 4 numaralı pozisyonundaki keto gruplarını alkiler. Baz analoglarında olduğu gibi, baz- eşleşme yatkınlıkları değiştirilmiş ve sonuçta transisyon mutasyonları “akridin boyaları” adını alan kimyasal mutajenler çerçeve kayması mutasyonlarına neden olur. Proflavin ve akridin sarısı (oranj) akridin boyalarından en çok çalışılan mutajenlerdir ve aromatik organik moleküller grubuna girer [31].

### 4) Apürinik bölgeler ve diğer lezyonlar :

Mutasyonun diğer bir tipi de, sağlıklı bir çift sarmal DNA molekülündeki azotlu bazlardan birinin, genellikle guanin ya da adeninin, spontan olarak kaybedilmesiyle ilgilidir. Pürin halkasının 9 nolu azotu ile deoksiribozun 1 nolu karbonu arasındaki glikozidik bağın kırılmasıyla oluşan bu bölgelere “Apürinik bölgeler” (AP bölgeleri) denir. Bir AP bölgede bir azotlu bazın yokluğu, eğer ilgili zincir transkripsiyon ve translasyona uğramaktaysa genetik kodu değiştirecektir. Eğer replikasyon olursa, AP bölge kalıp olarak uygun olmayacak ve replikasyonun durmasına neden olabilecektir. Eğer yapıya bir nükleotid girmişse, bu nükleotid genellikle yanlışır ve diğer bir mutasyonun oluşmasına neden olur. Neyse ki, hücreler genellikle bu tip lezyonlara karşı onları onaracak tamir sistemlerine sahiptir [31].

### 5) Ultraviyole radyasyonu ve timin dimerleri:

Nükleik asitlerin analiz ve tanısında yararlanılan bir özeliği, pürin ve pirimidinlerin ultraviyole (UV) radyasyonunu yaklaşık 260 nm dalga boyunda yoğun olarak absorbe ettikleridir. 1934'de *Drosopila* yumurtaları ile yapılan çalışmaların bir sonucu olarak, UV radyasyonunun mutajenik olduğu keşfedilmiştir. UV radyasyonunun zararlı etkisi, özellikle iki timin bazı arasında dimerlerin oluştuğu pirimidinler üzerinedir. Sitozin- sitozin ve timin-sitozin dimerleri de oluşabilir, fakat sayıları daha azdır. Dimerler DNA konformasyonunu bozar ve normal replikasyonunu durdurur. Replikasyonun durması, UV

radasyonunun mikroorganizmalar üzerindeki öldürücü etkisinin sorumlusu olarak görülmektedir [31].

## 1.2. Kimyasal Mutajen ve Karsinojenler

Kimyasal mutajenler, DNA molekülünde neden oldukları değişmelere göre üç tipe toplanabilir. Tahrip edici, katılma (addison) ve yerini alma (substitüsyon)

**Tahrip edici mutajenler:** Bu mutajenlere örnek olarak hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve nitröz asit verilebilir.  $H_2O_2$  , virüs ve bakterilerde nokta mutasyonlarına neden olur. Bu madde tekstil ve kağıt hamurunun ağartılmasında ve plastik endüstrisinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Nitröz asit, bakteri ve mantarlarda mutajeniktir. İnsanlarda mutajenik potansiyeli görülmemiştir. İnsan için tehlikesi , nitrik tuzları ile mide asiditesinde oluşan nitröz asitin sekonder ve tersiyer aminlerle kuvvetli kanserojen nitrozaminleri oluşturulması ile ilgilidir [8].

**Katılma şeklinde etki gösteren mutajenler:** Bu gruptaki mutajenlere alkilendirici etkenleri örnek gösterebiliriz. Alkilendirici etkenler, (kükürt ve azot mustardlar, epoksitler, dialkilsülfatlar ve laktonlar gibi) alkil gruplarını DNA molekülüne eklerler yani alkilendirilirler. Histolojide nükleik asitlerin boyanmasında kullanılan akridin boyaları DNA moleküllerine eklenerek mutasyona neden olmaktadır [8].

**Yerini alma şeklinde etki gösteren mutajenler:** DNA yapısında değişmeye neden olan bu kimyasal mutajenlere nükleik asit baz analogları örnektir. 5- bromurasil (BU), 2- aminopürin, 6- merkoptopürin ve 5- fluorodeoksiüridin bunlardandır [8].

Kanserojenozis, somatik hücrelerin baskısız bir şekilde büyüüp çoğalması olarak tarif edilir. Kanselerde görülen kötü tabiatlı büyüme olayının kaynağını yani başlangıcının gen kökenli bir DNA değişikliği yani bir tür mutasyon olduğu için düşünülmektedir. Nitekim bazı kanselerde değişikliğe uğramış bazı kromozom görünümüleri çizilebilmiştir [8,32].

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 [6].

Kimyasal kanserojenleri üç grup altında toplayabiliriz:

**Primer veya doğrudan etkili kanserojenler:** Bu kimyasallar molekül yapıları itibariyle kimyasal ve biyolojik olarak aktif bileşiklerdir. Genellikle elektrofilik (elektron eksikliği olan) özellikte veya serbest değişken (freeradical) olabilen bu moleküller, hücrel makromoleküler (DNA, RNA, Protein) ile doğrudan reaksiyona girebilir ve onların yapılarında değişmelere neden olabilirler. Bu gruba alkilleyici maddeler, inorganik kimyasallar ve trifenil metan boyaları girer [2,6].

**Sekonder kanserojenler:** Kanserojenlerin çoğu bu gruba girer. Bu moleküller kimyasal, biyokimyasal veya biyolojik yolla hidrolize olarak aktif kanserojen haline dönerler. Bazıları özgül metabolik aktivasyonlar sonucu primer kanserojen haline çevrilir. Metabolik aktivasyonu yürüten enzimler organizmaların organ ve dokularına göre nitelik ve nicelik bakımından farklılıklar gösterdiklerinden herhangi bir prokansorejen maddenin etkisi de enzim aktivitelerine paralel olarak çeşitli organizmalarda ve aynı organizmanın farklı organlarında değişik etkiler gösterirler. Sekonder kanserojenler grubuna polinükleer aromatik ve heterosiklik hidrokarbonlar, aromatik ve heterosiklik aminler, azobayaları, nitroaril, nitrofuran türevleri, nitrosaminler, nitrosamidler, nitrosoüreler, nitrosokarbamatlar, alkil triazinler, dialkil hidrazinler, asetamid, klorlu hidrokarbonlar, aflotoksinler ve karbamatlar girer [2,6,8].

**Ko-kanserojenler:** Bu gruptaki kimyasal maddeler kendileri; kanserojenik etkiye sahip değildirler. Fakat primer ve seconder kanserojenlerin etkilerini arttırırlar, bazen çok yüksek düzeye çıkarırlar. Sigara dumanı, is, katran gibi kompleks kanserojen bileşiklerin ko-kanserojen içerdikleri bilinmektedir. Ko-kanserojenler arasında forbal esterleri, n-dodekan, antralin, katekol, benzo(a)-piren gibi moleküller sayılabilir (Çizelge 1.2) [2,6,8,12].

Çizelge 1.2. İnsanlarda kanser yaptığı belirlenmiş olan kimyasal maddeler, endüstriler veya endüstriyel prosesler [2]

<b>Kimyasallar</b>	<b>Endüstriler veya Endüstriyel Prosesler</b>
<b>A-Endüstriyel kimyasallar</b> Aromatik aminler 1. 4-Aminobifenil 2. Benzidin 3. 2-Naftilamin Diğerleri 4. Benzen 5. Bis (klorometil) benzen 6. Vinil klorid	<b>A-Üretim endüstrisi</b> 15. Auramin 16. İzopropil alkol 17. Çizme, ayakkabı ve diğer dericilik işletmeleri 18. Mobilya üretimi
<b>B-İnorganik maddeler</b> 7. Arsenik ve bileşikleri 8. Asbestos 9. Krom ve bileşikleri	<b>B-Diğer endüstriyel prosesler</b> 19. Nematit madenciliği (Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ,) 20. Nikel saflaştırma çalışmaları 21. Petrol, katran ve baca dumanlarına maruz kalma
<b>C-İlaçlar</b> 10. Alkilleyici ilaçlar 11. Melfalan 12. Hardal gazı Hormonlar 13. Di etilstilbestrol 14. Konjuge estrogenler	



### 1.3. Metabolik Aktivasyon

Metabolizma, yaşam için gerekli olan ve organizmada meydana gelen bütün kimyasal reaksiyonlar olarak tanımlanabilir. Biyolojik sisteme giren yabancı maddeler, metabolize edilerek, orijinal bileşiklere oranla suda daha çok çözünebilen farklı ürünlere dönüşebilir. 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. Çeşitli yollarla organizmaya giren kimyasal maddeler enzimlerin katalitik etkisi ile kimyasal reaksiyonlara girerler ve metabolitlere dönüşürler. Yani metabolizmanın amacı, ilaçların daha az toksik hale dönüşmesi (detoksifikasyon=zehirsizleştirme) ve organizmadan kısa sürede atılmasıdır [2,8,15]. Bu da daha polar bileşiklerin oluşmasıyla, biyotransformasyon ile mümkündür [2,32-37]. Biyotransformasyon, ilaç etkisinin ortadan kalkması toksisitenin azalması ve ilacın vücuttan daha kolay atılması olaylarını gerçekleştirir [36,37]. Buna rağmen ilaç metabolizma reaksiyonları sadece zehirsizlenme değildir, çünkü bazı ilaçların biyolojik aktivitesi metabolitinde de görülmektedir ve bunlara “aktifmetabolit” denir. Bu bileşikler bazı durumlarda değişik aktiviteye sahip bir yapıya çevrilebilmektedir. Kendileri inaktif olup biyotransformasyon sonucu etkili metabolite dönüştürülen ilaçlara “ön ilaç” (prodrug) denir ve prontosil, kloroguanid, klormezanon, kloramfenikol, palmitat bunlara örnek olarak verilebilir [38,39]. Bazı bileşiklerin oluşan metabolitleri de toksik etki gösterebilir. Örneğin organizmada dapson, N-hidroksi dapson’u oluşturmakta ve bu metabolit methemoglobi nemi’ye sebep olmaktadır.

İnsanlar, endüstriyel ve çevresel ksenobiyotiklerin sürekli olarak etkisinde kalmaktadır. Örneğin çevremizdeki sularda bulunan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), dioksinler, alkilitin bileşikleri, kimyasal endüstrilerinin her geçen gün artan ürünlerinden deterjanlar, pestisidler, insektisidler, kozmetik ürünleri, tekstil boyaları, nitrozamin ve aflotoksin gibi bileşikler, besinlerle alınan boyalar, antioksidanlar, insektisid 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) çalışırlar [5,32-36,38-41].

Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu, genellikle spesifik olan kompleks enzimlerle gerçekleşir. Bu enzimlerin önemli bir kısmı karaciğerde yerleşmiştir. Karaciğerde bulunan mikrozomal enzimlerin yaptığı oksidasyon olayına P-450 sitokromuna bağlı değişik etkili oksidazlar (monooksijenazlar) rol oynar. Ayrıca akciğer, böbrek, gastrointestinal flora, barsak lümenindeki mikroflora ve daha az ölçüde olmak üzere hemen hemen bütün dokular içerdikleri enzimlerle biyotransformasyona yardımcı olurlar [38,40].

Biyotransformasyon çoğunlukla memelilerde, karaciğerde bolca bulunan enzimler tarafından belli başlı iki evrede katalizlenir. Faz I reaksiyonlarında toksik maddede oksitlenme, indirgenme veya hidroliz sonucu polar bir grup oluşur. Yani toksik maddeye fonksiyonel grup ilave edilir. Faz II reaksiyonların da ise fonksiyonel gruba başka bir madde bağlanarak birleşme gerçekleşir [38,39,42].

### **1.3.1. Mikrozomal enzimler**

Karışık fonksiyonlu oksidasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzim sistemi, hücrenin endoplazmik retikulumundan elde edilen mikrozomlarda yerleşmiştir. Mikrozomları elde etmek için doku homejenatı, 9000- 12000 g.'de 30 dakika santrifüj edilir. Süpernetan çözelti alınarak 105000g'de 1 saat santrifüj edilir. Sediment mikrozom fraksiyonu olup, karışık fonksiyonlu oksidaz (KFO= monooksidazlar) enzimlerini içerir. Bu enzimler başlıca karaciğer mikrozomlarında olduğu gibi, başka dokularda da bulunmaktadır [8].

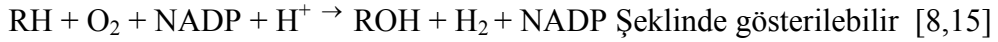
Bu enzim sisteminin başlıca komponenti olan sitokrom P-450 bir hemoproteindir. Protein ilk defa 1958 yılında Garfinkel ve Klinberg tarafından CO bağlayan bir pigment olarak tanımlandığından, pigmenti ifade etmek için P ve 450 nm'de bir tepe değeri verdiği için ilk kullanıldığı isim değiştirilmeden P-450 olarak adlandırılmıştır. Sitokrom P-450'nin karaciğer ER' da bazı steroidler gibi endojen bileşiklere ek olarak muhtelif ilaçlar, karsinojenler ve diğer ksenobiyotiklerin çok farklı çeşitleri üzerine etki edebilen, her biri çok geniş ve

bir bakıma birbirini aşabilen substrat özgülüklerine sahip en az altı yakın türü vardır. bu türlerden biri olan sitokrom P-448, polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) ve ilişkili moleküllerin metabolizması için spesifiktir [12,15,33,35,36,38].

Oksidasyon reaksiyonlarında sitokrom P-450'nin rolü şöyledir. İlk aşamada sitokrom P-450( $Fe^{+3}$ ) ile substrat (R-H) arasında bir kompleks oluşur. Bunu NADPH  $H^1$  dan bir elektron kopmasıyla  $Fe^{+3}$ 'ün  $Fe^{+2}$ 'ye dönüşmesi izlemektedir. Bir kademe sonra sisteme  $O_2$  molekülü karışır. P-450  $Fe^{+2} O_2$  haline dönüşür. Bir kademe sonra bir elektron daha girer. Bu elektronun tam olarak nerden geldiği bilinmemektedir. Substrat hidroksile edilerek ayrılır, sistemden bir molekül su çıkar, P-450 ( $Fe^{+3}$ ) halinde yeni bir reaksiyonda kullanılmak üzere değişmeden ayrılır (Şekil 1.6 ) [9,38]. Basit şekilde bu reaksiyon basamakları şu şekilde yazılabilir:

- (1)  $NADP + H^+ + \text{sitokrom P-450 } (Fe^{+3}) \rightarrow NADP^+ + \text{sitokrom P-450 } (Fe^{+2})$
- (2)  $\text{sitokrom P-450 } (Fe^{+2}) + O_2 \rightarrow \text{Aktif oksijen kompleksi}$
- (3)  $\text{Aktif oksijen kompleksi} + RH \rightarrow ROH + H_2O + NADP$

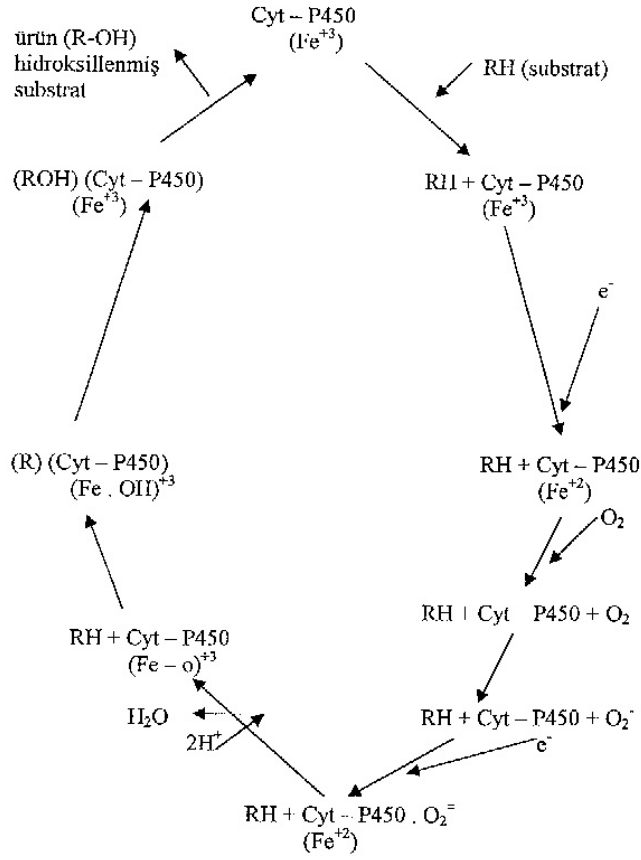
Toplu reaksiyon ise:



Karışık fonksiyonlu oksidaz sistemi pek çok substratı hidroksile ederek suda çözünür hale getirerek redükte glutatyona, glukuronik asite ve sülfatlara bağlanarak vücuttan atılmasını sağlamaktadır. Bu sayede pek çok toksik madde detoksifiye edilerek vücuttan atılmaktadır. Karışık fonksiyonlu oksidaz sistemleri, morfin, kodein, fenobarbital amfetaminler, steroid hormonlar, insektisidler ve PAH'lar gibi bir çok bileşiği substrat olarak kabul etmektedir. Bu bileşiklere ya oksijen katmakta veya hidroksite etmektedir [43].

Sitokrom P-450 monooksijenaz sisteminin üç bileşeni vardır. Bunlar NADP-sitokrom c redüktaz (veya NADP-sitokrom P-450 redüktaz), bir hemoprotein olan sitokrom P-450 ve fosfolipittir [2,8]. Hemoprotein yapısında olan enzim, sistein amino asidine bağlı "Hem demiri" içerir. Yabancı bileşiklerin oksidasyonu genelde bu demir grubu üzerinden gerçekleşir. İnsanda, çeşitli

promutajen ve prokanserojenlerin biyoaktivasyonunda etkili olan temel enzimlerin CYPS (P450) 1A1, 1A2, 1B1, 2C9, 2D6, 2E1 ve 3A4 olduğu bildirilmiştir [44].



Şekil 1.6. Sitokrom P450 tarafından substratın hidroksilasyonu [2]

### 1.3.2.Faz I reaksiyonları

Faz I reaksiyonları, oksidasyon(yükseltgenme), redüksiyon(indirgenme) ve hidrolizdir.

## **A- Oksidasyon**

Karışık fonksiyonlu oksidazlar, birçok oksitlenme reaksiyonlarını kataliz ederler. Mikrozoal oksidasyon tiplerinden bazıları şunlardır:

**a) Aromatik hidroksilasyon ve epoksit oluşumu:** Bir insektisid olan aldrinin dayanıklı epoksidi olan dieldrine dönüşümü benzoprenin kanserojen aktif metabolitleri olan 7,-diol-9,10 epoksit izomerlerine dönüşümü mikrozoal enzimlerin, aromatik halka oksidasyonlarına örnektir.

**b) Dealkilasyon:** Alkil grubunun uzaklaştırıldığı ortama bağlı olarak N-dealkilasyon, O-dealkilasyon ve S-dealkilasyon şeklinde isimlendirilirler. O-dealkilasyon yolu ile oksitlenen ilaçlardan kodein ve fenasetin örnek verilebilir. N-dealkilasyon ise yaygın bir biyotransformasyon şekli olup aminopirin, asetanilid gibi ilaçlar örnek verilebilir. 6-metiltiyopürin gibi bir çok tiyoeterler ise S- dealkilasyonla oksitlenir.

**c) N-dealkilasyon:** 2-asetilaminoflu orenin kanserojen N-hidroksi-2-asetil-aminofluoren metabolitleri N-oksidasyonla oluşurlar.

**d) Oksidatif deaminasyon:** Tavşan karaciğerinde amfetaminlerin fenilasetona dönüşmesi en iyi örnektir.

**e) Tersiyer azot oksidasyonu:** Toksikolojik açıdan önemli olan nikotinin, nikotin-1'-N-oksid'e dönüşmesi örnek verilebilir [8].

## **B- Redüksiyon:**

Bu reaksiyonlar hem mikzoal hem de sitolojik redüktazlar tarafından katalizlendiği gibi, redüktaz ihtiva eden bağırsak bakterileri tarafından da katalizlenebilir. Nitro, diazo, karbonil, disülfür, sülfoksit ve alkon gibi fonksiyonel gruplar organizmada indirgenebilirler [8].

## **C- Hidroliz:**

Ester, amid veya substitüe ve fosfat ester bağını içeren ksenobiyotiklerin büyük bir kısmı organizmada hidroliz olabilir. Esterler esterazlar tarafından, amidler ise amidazlar tarafından hidrolizlenir. Bu enzimler genel olarak bir çok dokuda hücre sitozolünde bulunur [45]. Böylece bir ester veya amidin hidrolizi

ile oluşan asit, alkol veya amin ya doğrudan veya Faz II reaksiyonları ile konjuge olarak vücuttan atılırlar [8].

### **1.3.3. Faz II reaksiyonları**

Konjugasyon reaksiyonları olarak da bilinen bu reaksiyonlar, polar bir grubun yabancı moleküllere eklenmesi ile meydana gelmektedir. Bu polar grup, ya bileşik üzerinde hazır bulunan bir gruba ya da Faz I reaksiyonları sonucunda oluşan hidroksil gibi gruplara konjuge olabilir. Polar gruplar , yabancı molekülleri suda daha çözünür kılar ve böylece vücuttan uzaklaştırmayı kolaylaştırarak toksik etkide de bir azalmaya sebep olur. Konjugasyon reaksiyonları aşağıda kısaca açıklanmıştır.

#### **A. Sülfatlama**

Bir hidroksil grubuna sülfat eklenmesi, yabancı maddelerin konjugasyonunda izlenen önemli bir yoldur. Bu reaksiyon, sitozolik bir sülfotransferaz enzim tarafından katalizlenmektedir. Reaksiyonun meydana gelebilmesi için fosfoadenozin fosfosülfat koenzimi de kullanılmaktadır. Aromatik ve alifatik hidroksil grupları yanında N-hidroksil grupları ile amino grupları da sülfatla konjuge olabilirler [46].

#### **B. Glukuronidasyon**

Glukuronik asit, polar ve suda çözülebilen bir molekül olup hidroksil, karboksilik, amino ve tiol gruplarına kolayca eklenebilir. Bu reaksiyon mikrozomal enzimler olan glukuronosil transferazlar tarafından katalizlenir. Diğer karbonhidratlar da konjugasyonda görev alabilirler. Riboz ve ksilozun da benzer biçimlerde kullanıldıkları bilinmektedir [43].

#### **C. Glutatyon konjugasyonu**

Toksikolojik açıdan, özellikle reaktif ara ürünlerin uzaklaştırılmasında önemli bir fonksiyona sahip, temel bir hücre içi sülfidril bileşeni olan glutatyon, bir çok memeli dokusunda bulunan ve üç peptitten oluşan bir bileşiktir.

Glutatyonda sistein aminoasitinden kaynaklanan sülfhidril grupları, reaktif veya elektrofilik metabolitlere bağlanmaktadır. Bu reaksiyonlar, glutasyon transferazlar tarafından katalizlenir. Ayrıca çeşitli sitozolik yada mikrozomal glutasyon-S-transferaz enzimleri ile de katalizlenebilir [47,48].

Ksenobiyotiklerin P 450 ile oksidasyonunun ardından atılabilir duruma geldikleri glutasyon konjugasyonu, genellikle bir detoksifikasyon işlemi olarak kabul edilmektedir. Bu enzim sınıfının önemi, alkil, aldehit ve keton gibi elektrofilik grupların metabolize edilmesinde rol almasıdır [49].

#### **D. Amino asit konjugasyonu**

Yabancı organik bileşikler amino asitlerle konjugasyon yapabilirler. Bu işlevde kullanılan amino asit türden türe farklılıklar göstermekte ve benzer bir evrimsel gruba dahil türlerin aynı amino asidi kullandıkları görülmektedir. Glisin, en çok kullanılan amino asittir ve yabancı organik bileşiklerle konjugasyonu mitokondride bulunan açılaz enzimi tarafından katalizlenir [45].

#### **E. Metilasyon**

Moleküllerdeki hidroksil, amino ve tiol grupları metiltransferaz enzimlerinden biri tarafından metillenebilirler. Bu reaksiyonlar, özellikle normal olaylarda oluşmakla birlikte, yabancı bileşikler aynı zamanda substrat olarak da kullanılabilir [45].

### **1.4. Mutajenite Test Sistemleri**

Sayıları milyonları bulan sentetik ve doğal maddenin kanserojenik potansiyelleri açısından test edilmesi sağlığımız açısından gerekmele birlikte, laboratuvar hayvanları ile yapılan kanserojenite deneylerinin hem çok zaman almaları, hem de çok pahalı olmaları nedeniyle başarılamayacak bir durum arz etmektedir [1-6].

Uzun zamanlı testler, uygun hayvan türleri seçilerek hayvansal maddenin uygulanmasını takiben yapılan otopside patolojik ve histolojik çalışmalarla ölçülmektedir [2,3]. Ayrıca hayvan deneylerinde seks faktörü, yaş, veriliş biçimi

ve farklı türler farklı sonuçlara neden olmaktadır. Dolayısıyla sağlıklı sonuçlar elde edilememektedir [12].

Memelilerde mutasyon testlerinin yapılmasında en önemli zorluk memelilerin bu test sistemlerine oldukça az duyarlı olmaları yüzündendir. Bunun yanında mikroorganizmalar mutajenlere karşı çok daha fazla duyarlıdır [8].

Canlı hayvan deneyleri yerine kimyasal maddelerin kanserojenik potansiyelerini ölçebilmek için son yıllarda bir çok *in vitro* test sistemi geliştirilmiştir. Kısa zamanlı testler (short-term tests) diye bilinen bu testlerle kimyasal maddelerin belirli genetik sistemlerde belirli sonuçlar verip vermedikleri ölçülmekte ve elde edilen sonuçlarla maddelerin kanserojenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmaktadır [2]. Kısa dönemli *in vitro* çalışmalar, kimyasal maddenin bakterilerde mutajenik etkisinin hücrelerde değişmeye neden olup olmadığı, DNA değişim ve tamiri üzerindeki etkisi memelilerde mutajenik etkisinin araştırılmasını kapsar [8].

Kısa zamanlı testlerin çoğunda, memelilerdeki metabolik transformasyonlar da göz önüne alınarak ilave edilen metabolik aktivasyon sistemleri yer alır (Çizelge 1.3). Bunlar:

(1) Rodent veya insan karaciğerinden elde edilen mikrozomlar (*in vivo*)

(2) Metabolik aktivasyon yapabilen rodent hücreleri

(3) Memeli organizmaların kullanıldığı konakçı aracılığıyla *in vitro* test gibi aktivasyon sistemleridir [2].



Çizelge 1.3. Kimyasal mutajen/ kanserojen maddelerin saptanmasında kullanılan kısa zamanlı testlerden bazıları

Test	Takip edilen fenetik/biyokimyasal sonuç	
Salmonella mutasyon testi	$His^- \rightarrow His^+$	Post-mitokondriyal karaciğer fonksiyonları (S9,mikrozomlar)
Bakterilerde:		
a)Flutasyon testi	$His^- \rightarrow His^+$ (s.typhimurium) $Trp^- \rightarrow trp^+$ (E.coli)	Sıçan karaciğer hücreleri
b)DNA onarım testi	İnhibisyon zonlarının ölçülmesi	-
c)Profaj indüksiyonu	(1)Faj sayımı (2)konakçı hücre lizisi	-
d)Saccharomyces cerevisiae	Mutasyon, gen değişimi ve metabolik rekombinasyon	-
e)Neurospora crassa	$Ade^- \rightarrow Ade^+$	-
f)Drosophila melanogaster sekse bağlı resesif letal mutasyon testi	Erkek sineklerin ölümü	-
g)soğan veya fasulye kök ucu hücreleri	Kromozom anomalileri	-
h)İnsan periferel kan lenfositleri testi	Kromozom anomalileri	-

Memeli hücre kültürlerinde mutasyon:		-
a)Çin hamsteri ovaryum veya akciğer hücreleri ile	HGPRT-lokusunda mutasyon	Rodent karaciğer mikrozomları
b)Fare karaciğer epitel hücreleri ile	8-azaguanine dirençlik	Hepatositlerle beraber kültür yapma
c)Çin hamsteri hücreleri ile	Kardeş kromatid değişimleri, kromozom anomalileri	Rodent karaciğer mikrozomları <i>in vivo</i> olarak
d)DNA hasarı ve onarımı çeşitli rodent dokularında <i>in vivo</i> muameleler ile	Tek zincir kopmaları	Rodent karaciğer mikrozomları <i>in vivo</i> olarak
e)Hela hücreleri, fare hepasitleri,insan deri fibroblasları	Programsız DNA onarımı	-
f)İnvivo DNA sentezi	Hata sıklığının artması	-
Hücre transformasyonu: (invitro)		-
a)Suriye hamsteri embriyo hücreleri	Marfolojik değişme	-
b)şıçan embriyo hücreleri	Marfolojik değişme	Rodent karaciğer mikrozomları
c)Yeni doğmuş Suriye hamsteri böbrek hücreleri (BHK21)	Agardu büyüme	Rodent karaciğer mikrozomları

Kısa zamanlı testlerde “sitogenetik metodlar” ve “bakteriyel yöntemler” kullanılmaktadır.

#### **1.4.1. Sitogenetik yöntemler:**

Sitogenetik çalışmaları, çevresel olarak yada çalışma ortamında klastojenlere ve radyasyona maruz kalan belirli populasyonlar için [50], bireysel olarak etkilenme dozunu saptamak için kullanılabilir [51-53]. Kimyasalların mutajenliğini araştırmada kullanılan en yaygın sitogenetik yöntemler, yapısal kromozom bozukluğu (CA), kardeş kromatid değişimi (SCE) ve mikronükleus (MN) testleridir [54]. Bu testler *in vivo* olarak laboratuvar hayvanlarında [55,56] , *in vitro* olarak da insan kan lökositleri, mesane yanakimide nasal ve sperm hücreleri ile çeşitli kültür hücrelerinde uygulanabilmektedir [57].

##### **1.4.1.1. Yapısal kromozom bozulma analizi (CA=Chromosome Aberration)**

Aneuplidi ve poliploidi gibi sayısal kromozom bozulmaları ile kromozom tipi, kromatid tipi kopmalar ve anormal birleşme gibi yapısal bozulmalar çok yaygın olarak, bölünen hücrelerin metafazda olanlarını kolsemid yada kolşisin gibi bir tübülün polimerizasyon inhibitörü kullanarak tutuklama ile saptanmaktadır. Bu test kısaca hücreler metafaz safhasında incelenerek kromozom hatalarının ortaya çıkarıldığı sitogenetik bir yöntemdir [17,58-60].

##### **1.4.1.2. Mikronükleus testi (MN)**

Mikronükleus hücre çekirdeğinin dışında sitoplazmada yer alan çekirdek orjinli küçük küresel bir oluşumdur. Mikronükleus mitotik hücrelerde kromozom fragmentlerinden yada anafazda geç kalarak her iki kardeş çekirdeğe dahil olmayan kromozomlardan kaynaklanır. Mikronükleus içeren hücre sayısındaki artış, maruz kalınan klastojenik (DNA'yı hedefler, kromozom kırılmalarına neden

olur) veya aneujenik (kromozom sayısının değişimine etkilidir, genellikle DNA'yı hedef almaz) ajanların genetoksik etkilerini yansıtan bir biomarkerdir.

Mikronükleus testi bölünme yeteneğine sahip tüm hücrelerde yapılabilen bir testtir. 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 [5,58,63-66].

#### **1.4.1.3. Comet testi (Single cell gel electrophoresis)**

Bu yöntem iplik kıvrılmaları, çapraz bağlanma, alkali labile site gibi DNA hasarlarını ve kesme-çıkarma onarım bölgelerindeki hataları bir jel sistemi kullanılarak belirleyebilmektedir [67,68]. Uygulamada kan lökositleri, mesane, yanak, mide, nasal ve sperm hücrelerindeki DNA hasarını belirlemek amacıyla kullanılmaktadır [54]. Comet testi hücre metafaz safhasında incelenerek kromozom hatalarının ortaya çıkarıldığı bir sitogenetik bir yöntemdir [61,62].

#### **1.4.1.4. HPRT mutasyon yöntemi**

HPRT yöntemi, somatik gen mutasyonlarının *in vivo* ortamlarda pozitif olarak seçilmesi prensibine dayanır. DNA baz çifti değişimleri, büyük yada küçük çaptaki delesyonları, inversiyonları ve heterolog kromozom rekombinasyonları gibi genetik değişimleri büyük ölçüde yansıtmaya özelliğine sahiptir.

#### **1.4.1.5. Kardeş kromatid değişim yöntemi (SCE)**

SCE testi toksik madde-DNA etkileşimini açığa çıkarmadaki duyarlılığı ve genetoksik kimyasalların kültüre edilmiş yada muamele edilmiş hayvanlardan alınan örneklerinde SCE sayısını önemli ölçüde arttırması sebebi ile bireysel olarak maruz kalınan genetoksik karsinogenlerin kan lenfositlerinde yarattığı DNA hasarını belirleyen bir indikatör olarak kullanılmaktadır [69].

SCE yönteminin 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 gözlemlendiğinden dolayı SCE yöntemi sınırlı amaçlar için kullanılabilir [5,58,60,70-72].

#### **1.4.2. Bakteriyal yöntemler**

Fiziksel yada kimyasal ajanların DNA'da meydana getirdiği hasar, bakteriyal mutasyonları ölçebilen kısa zamanlı testlerle saptanmaktadır [42]. Bakteriler gecelik kültürlerinde çok sayıda gelişirler ve nadir mutasyonel olayların saptanmasına olanak tanır. Ayrıca bakteriyal genetik bilgi ve deneyimlerin artışı, çeşitli ajanlara karşı yabani tiplerinden daha hassas olan özel bakteri mutanlarının oluşturulmasına olanak sağlamıştır. Ayrıca bakterileri kimyasal ve fiziksel ajanlarla mutasyona uğrama açısından daha hassas hale getirebilmek için, çeşitli işlemler uygulanmaktadır [42].

##### **1.4.2.1. UMU (SOS) test sistemi**

UMU test sistemi, kimyasal ajanların genotoksik etkilerini saptamak amacıyla kullanılan kolorimetrik, bakteriyal bir test sistemidir [73]. SOS cevabı esas alınarak geliştirilmiştir ve regülatör bir sistem olan SOS sistemi, DNA hasarı ile indüklenebilen sistemler içerisinde ilk olarak karakterize edilmiş olan en kapsamlı, en kompleks ve en iyi anlaşılmiş sistemdir [74,75]. UMU test sistemi, diğer SOS-cevap genlerinden çok daha dolaysız bir şekilde mutajenesisle ilgili olduğu düşünülen UMU operonunun ifade edilme düzeyini saptamaya dayanır.

Bu test için 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 [34].

#### 1.4.2.2. *E. Coli* lac I mutasyon test sistemi

Bakterilere meydana gelen mutasyonların genetik ve moleküler analizinde kullanılan bir ileri mutasyon yöntemi olup ilk kez 1983’ de Miller ve arkadaşları tarafından *E. coli*’ de geliştirilmiştir [76].

Bu sistemde laktoz operonundaki repressörü kodlayan lac I geninde oluşan mutasyonun fenotip üzerindeki yansıması belirlenerek değerlendirilmektedir. Lac I mutasyonlarını içeren gen bölgesi bakteriden alınarak bir plazmite ya da M 13 fajı klonlama vektörüne aktarılacak da, vektörler çoğaltılarak çok sayıda mutant DNA kopyası elde edilerek, dizi analizi yapılmaktadır [45,77].

#### 1.4.2.3. *Salmonella* / mikrozom (Ames) test

Ames testi 1970’ lerin başında Prof.Dr Ames ve Dr.Maron tarafından geliştirilen ve daha sonra yaygın olarak uygulanmaya başlayan bir mutajenite testidir [6,5,71,72,78,79]. Ames testi bakteriyal mutasyon testleri içinde detayları en iyi bilinen ve karakterize edilen, geçerliliği, uygulanma kolaylığı ve hassaslığı nedeniyle en fazla kabul görerek tercih edilen ve günümüzde de sıklıkla kullanılan bir yöntemdir [27,42,76]. Bu testin devam eden popülaritesi DNA’ya zarar veren tehlikelerin (genotoksik) teşhis edilmesi ve yüksek hassasiyetteki mutajenesis biyokimyasal mekanizmaların açıklanması yeteneği ile bağlantılıdır [34,136].

Test organizması olarak kullanılan *Salmonella typhimurium*, histidin geninde oluşturulan farklı mutasyonlarla (his G, his C yada his D) gelişmek için histidin gereksinimi duyan değişik tipte oksotrofik mutantlara dönüştürülmüştür. Ayrıca histidin mutantlarına ek olarak bu mutantlara bazı diğer mutasyonlar ilave edilir (Çizelge 1.4).

Çizelge 1.4. TA98 ve TA100 suşlarının mutasyon parametreleri

Bakteri Kodu	Histidin Mutasyonları	Lipopolisakkarid Mutasyonu	DNA Onarım Mutasyonu	Direnç Plazmid Türü
TA98	HİS D 3052	rfa	uvrB	pKM 101
TA 100	HİS G 46	rfa	uvrB	pKM 101

Bu testin temeli, yapay *Salmonella typhimurium*'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 dönüşmesine 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 koloni sayısı sayılması gerekir [6,22,80].

Bir mutant suş, tek bir baz değişimi şeklinde nokta mutasyona sahip iken, kendiliğinden ya da bir mutajen uyarısıyla yabani tipe dönüştüğünde, transisyon ya da transversiyon şeklinde mutasyon geçirmiş olmaktadır.

Ames Testi *Salmonella typhimurium*'un TA ve YG suşları ile uygulanabilmektedir. En çok kullanılan bakteri suşları TA 97, TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535, TA 1538 suşlarıdır [41,81-84].

Reversiyon test yöntemi uygulamalarında, farklı özelliklerde geliştirilen ve çeşitli amaçlarla kullanılan *Salmonella typhimurium* test suşları dışında *E.Coli*'nin bazı suşları da yer almaktadır. Bu bakteri kültürleri de aynı prensibe uygun olarak, triptofan E lokusunda oluşturulan mutasyonla, oksotrof hale getirilmiştir. Bu şekilde geliştirilen *E.coli* WP2 uvr A (pKM 101) ve *E.Coli* WP2 (pKM101) suşları A T baz çifti mutasyonu taşımaktadır [42].

*Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla elde edilmiş suşlarının genetik özellikleri aşağıda belirtilmiştir.

**(1) Histidin mutasyonu:** Her test suşu histidin operonunun değişik bölgelerinde ya operondaki baz değişimleri ya da çerçeve kaymasına yol açan adisyon-delesyon mutasyonları ile mutant hale getirilmiştir.

His G 46 mutasyonu: His G geni bakteriler tarafından histidin sentezinde kullanılan ilk enzimi kodlayan gendir. Bu mutasyon TA 1535 ve TA 100 mutantlarında vardır. His G geninde lösin amino asidinin kodunu –GAG- baz çifti değişimi sonucu prolin amino asidi kodunu olan –GGG- dönüşmüştür. Bu mutasyon her iki mutantda da baz çifti değişimlerine neden olan mutajenik kimyasallar tarafından geri dönüştürülür.

His D 3052 mutasyonu: His D geni de histidin sentezinde kullanılan histidinol dehidrogenaz enzimi kodlamaktadır. Bu mutasyon gendeki tek bir nükleotidin eksikliği sonucu ortaya çıkmış olan çerçeve kayması tipinde bir mutasyondur. TA 98 ve TA 1538 mutantlarında vardır.

His D 6610 mutasyonu: Bu mutasyon gene bir nükleotid eklenmesi sonucu ortaya çıkmış olan çerçeve kayması tipinde bir mutasyondur. Mutasyonda etkilenen bölgede beş yerine altı sitozin dizisi bulunmaktadır.

His G 428 mutasyonu: "ochre" stop kodonu varlığından dolayı His G geni inaktif durumdadır.

Başlangıçta geliştirilen His<sup>r</sup> mutantlarının çeşitli test maddelerine karşı duyarlılığını arttırmak için bu suşlara Aşağıdaki mutasyonlar eklenmiştir.

**(2) Rfa mutasyonu:** Bu mutasyon bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasını kodlayan genlerde meydana gelmiştir. Lipopolisakkarit tabakanın kısmen yok olması ile normalde hücre içine giremeyen büyük moleküller hücre içine girmektedir.

**(3) UvrB mutasyonu:** Bu mutasyon DNA onarım sisteminde kesip-çıkarma (excision repair) görevini üstlenen enzimini kodlayan UvrB genindeki delesyon sonucu oluşmuştur. Delesyon sonucu "chl" ve "bio" genleride çıkarılmıştır. Bio geni bakterinin biotin sentezinden sorumlu bir enzimi kodlamaktadır. Dolayısıyla bakterilerin üreyebilmeleri için histidin amino asidinde olduğu gibi biyotin amino asidine ihtiyaç vardır.

**(4) R faktörü:** Amplicin dirençlilik geni olup bu geni taşıyan bakterilerde normalde hücrelerde bulunan ve hata frekansı yüksek olan "error-prone" DNA onarım yolunun aktivasyonuna ve gerek pozitif sonuçlarının artmasına, gerekse spontan olan mutasyonların artmasına neden olur. R faktörüne sahip olmayan suşlar zayıf mutajenik sonuçlar verirken R faktör genini taşıyan



pKM 101 plazmidine sahip yeni suşlar oldukça kuvvetli sonuçlar vermişlerdir [85-87].

Diğer bakteriyal testlerde olduğu gibi Ames testinde de eksik olan unsur, memelilerde detoksifikasyon mekanizmasını gerçekleştiren enzim sisteminin olmayışıdır. Bu sistem pek çok kimyasal grubu reaktif olmayan hale getirirken, bazı bileşikleride DNA ile etkileşime girebilen yüksek ölçüde elektrofilik, mutajenik hatta karsinojenik forma dönüştürmektedir [88]. Mutajenik etkisi test edilen herhangi bir ajanın bu enzim aktivasyonunun etkisi ile nasıl bir potansiyele sahip olacağını belirlemek kaçınılmazdır. Bu yöndeki sakıncanın giderilmesi için memeli laboratuvar hayvanlarından izole edilen karaciğer enzim ekstraktı bakteriyal sisteme dahil edilerek testler prosedüre uygun olarak tekrarlanmaktadır. En yaygın olarak kullanılan enzim preparatı, sıçanların, enzim aktivasyonu uyarılmış olan karaciğer dokularından homojenize edilen post mitokodriyal süpernatandır [89,90]. Bu materyal, ilaç metabolize edici enzimlerin bir çeşidini, sitokrom bağımlı monooksijenazları, sitokrom bağımsız oksidazları, amidaz, esteraz, glutatyon-S-transferaz, sülfotransferaz, açıl transferaz, metil transferaz, dehidrogenaz ve penoksidazları içermektedir. Enzim özütü, kofaktörler, tuzlar ve tampon sistemle tamamladığında, S9 karışımı adını almaktadır.

Ames yönteminde pozitif sonuç veren bir ajan için, insan yada diğer memeliler de mutajenik veya karsinojeniktir denilemez. Bakteriyal mutasyonun pozitif olması, ajanın potansiyel zararı konusunda bir ön uyarı anlamı taşır. Ayrıca yüksek organizmalarda yapılacak olan daha kapsamlı çalışmaları yönlendiren önemli bir belirteçtir. Ames testi bu sebeple dünya çapında pek çok laboratuvar rutin olarak uygulanmaktadır.

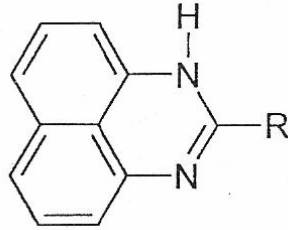
## **1.5. Perimidin' in Yapısı ve Genel Sentezi**

### **1.5.1. Perimidin' in yapısı ve genel özellikleri**

Ana yapısı perimidin çekirdeği taşıyan türevlere ait sentez çalışmaları 1908'li yıllarda başlamıştır. Sentezlenen genellikle aromatik aminler (1,8-naftalendramin) ile karbonil grubu türevleri kondansasyona sokulmuştur.

Perimidin ilginç bir maddedir. Çünkü bir çok önemli sınıfları üretilmektedir. Çoğu biyolojik aktivitede faydalı sonuçlar sergilemektedir. Perimidin bileşikleri heterosiklik sistemlerde birçok biyolojik aktivite gösterirler [97].

Bu konuda ilk çalışma 1908 yılında Franz Sachs tarafından yapılmış ve 1,8 -naftalendraminin formik asit, asetik asit, propiyonik asit veya bütirik asit ile 30 dakika geri çeviren soğutucu altında kaynatılarak, sırası ile perimidin (e.d. =222 °C ), 2- metil perimidin (e.d. = 161° C ), 2 – etil perimidin (e.d. = 140°C ) ve 2- propil perimidin (e.d.=157°C ) bileşikleri elde edilmiştir [98].



Şekil 1.7. 2- süstitüe perimidin' in genel formülü

1940 yılında E.C. Wagner, 1,8- naftalendramin ile formik asidi, esterleştirme reaksiyonuna sokarak perimidin bileşiğini elde etmiştir (Şekil 1.7) [99].

1958 yılında Christoph S. Grundmann ve Alfred Kreutz Berger, s-triazinin süstitüe aminler ile reaksiyonu sonucu, heterosiklik bileşik verdiği ortaya koymuşlardır. 7gr etilendraminin 3gr S-triazini ile oda sıcaklığında karıştırılması ve üzerine NH<sub>3</sub> ilave edilmesiyle reaksiyon kendi kendine yürümüş sonra karışım soğutulup 2 saat 80°C'de kaynatılmış, bu süre sonunda ürün soğutularak , 2-imidazolin bileşiği çöktürülmüştü. Aynı yöntem ile perimidin (e.d. =224°C ) bileşiği elde edilmiştir [100].

1967 yılında R. Barchet ve arkadaşları, 1,8-nafhalan dramın'den E+OCH : C [COOEt]<sub>2</sub> veya Et OCH = C [CN] COOEt ile, yüksek ekzotermik bir reaksiyon sonucu, perimidin bileşiğini ( e.d.= 222°C ) elde etmişlerdir [101].

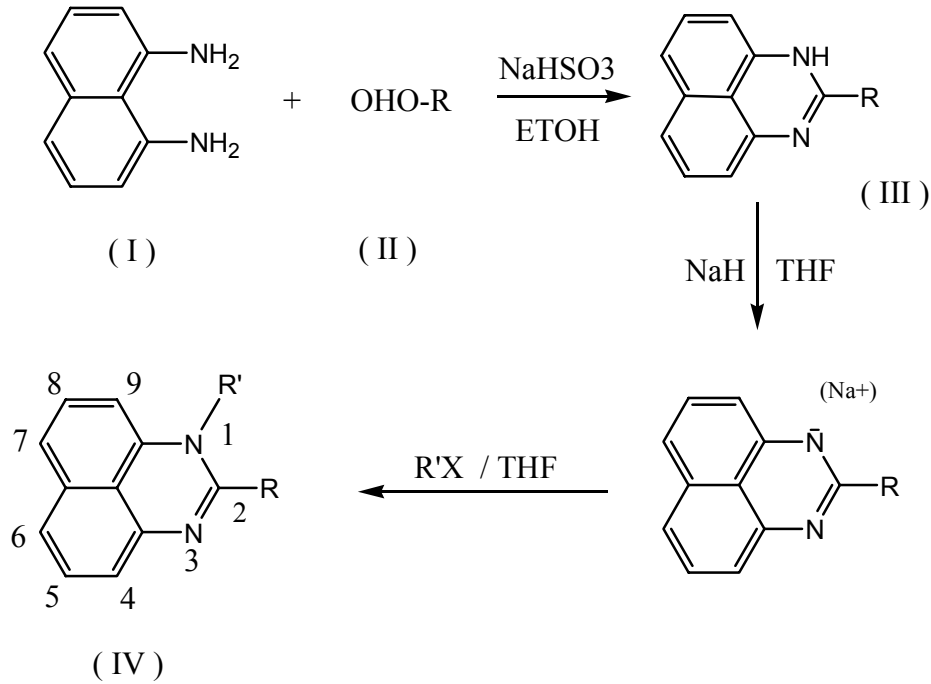
1973 yılında Pershin G.N. ve arkadaşları, perimidin ve 7 türevini hazırlayıp, bu bileşiklerin orta kuvvetli bakteriostatik (özellikle insan ve kümes hayvanları tüberkulozuna karşı ) etkili olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca fungustatik etkilerinin olduğu fakat antiviral etkilerinin olmadığını açıklamışlardır [102].

1976 yılında Drus Yatskaya S.K. ve arkadaşları, 1,2 –dimetil –perimidini uygun bir aldenit (RCHO ) ile reaksiyona sokarak, % 80 -100 verimle vinil-perimidin türevlerini sentezlemişler ve bu türevlerin G. Spumosa ajanı üzerindeki etkilerinin kısa olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca toksisitelerini inceleyerek, 2-(2-fril) vinil- perimidin adlı bileşiğin diğerlerinden daha toksik olduğunu gözlemişlerdir [103].

1,8 -naftalen daiminin p-triflorometil benzoil klorür ile reaksiyonu sonucu, 2- (p-trifloro.fenil )- perimidin türevi hazırlamışlardır. Ayrıca 2-(4-triflorometil fenil)-perimidin türevinin, immün sistem üzerindeki baskılayıcı etkisi ve farelerde idrar yolu taşlarına karşı etkili olduğu ortaya koyulmuştur [109].

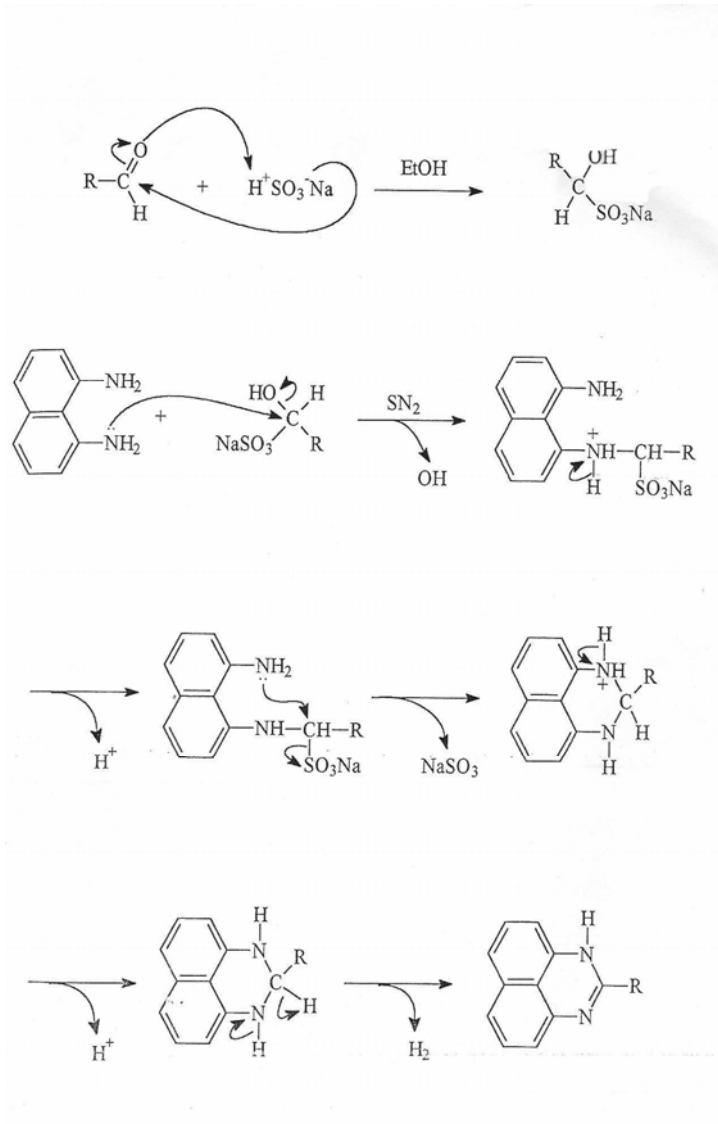
Ayrıca perimidin nükleusu olan bileşimler antitümör [104,105], sitotoksik [106], anorektik [107,108] ve CRF reseptör (kotropin serbest bırakma faktörü) ile antagonist [125-127] faaliyetler göstermişlerdir.

### 1.5.2. Perimidinin genel sentez yöntemi



Şekil 1.8. Perimidin'in genel reaksiyon denklemi

Hesap edilmiş miktarlarda sodyumbisülfid ve aldehid yeterli miktar etanol içinde 15-20 dakika kaynatılır. Reaksiyon karışımına hesaplanan miktarlarda 1,8- fenilendiamin ilave edilir, 3-5 saat geri çeviren soğutucu altında ısıtılıp karıştırılır. Reaksiyon sonunda balon içeriği kuruluğa kadar evapore edilir, kalıntı su ile yıkanır, süzülür, kurutulur ve butilasetatta kristallendirilir (Şekil 1.8, Şekil1.9).



Şekil 1.9. Perimidin' in reaksiyon mekanizması

## 2.MATERYAL VE METOD

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

4-Nitro-o-fenilendiamin (Aldrich), S9 karışımı, sitrikasit monohidrat,  $K_2HPO_4$ , NaOH (Codex carloerba), Bacto Agar (Difco),  $MgSO_4 \cdot H_2O$ , NaCl (Fluka), L-Histidin .HCl (F.W.191,7), D-Biyotin (F.W.247,3), Ampisilin trihidrat (sigma), sodyum azid (Merck), Nutrient Broth No:2 (oxid), 2-Aminofluorene, KCl,  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ , 3-Metil kolantren (sigma)' dan temin edilmiştir.

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

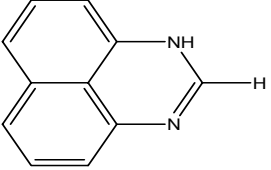
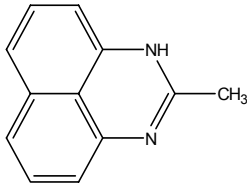
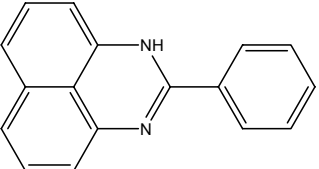
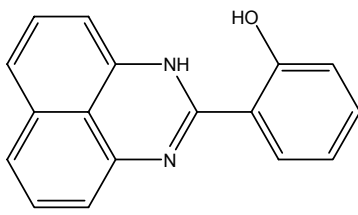
Deneyde Ames ve arkadaşları tarafından *Salmonellen typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla geliştirilen TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmış olup, bu suşlar Hacettepe üniversitesinden temin edilmiştir.

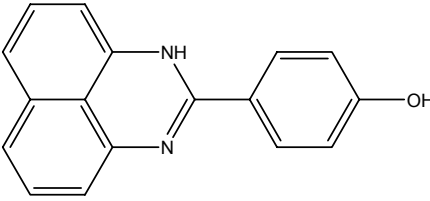
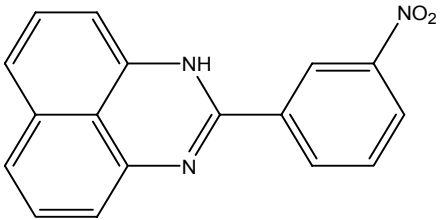
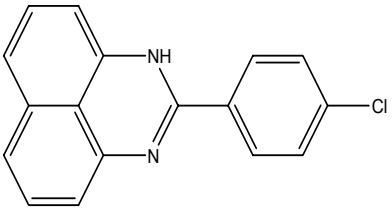
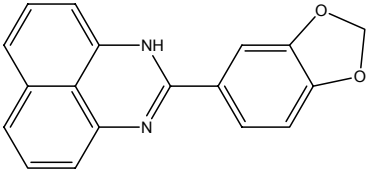
#### 2.1.3. Test maddeleri (Dozları ve hazırlanışı)

Bu çalışmada 8 ayrı perimidin bileşiğinin mutajenik etkileri Ames / *Salmonella* / Mikrozom test yöntemiyle araştırılmıştır. Test maddeleri perimidin'in 8 ayrı türevidir ve Prof.Dr.İlhan Işıkdag (Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasotik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi) tarafından sentezlenmiştir. İsimleri; perimidin, 2-metil perimidin, 2-fenil perimidin, 2-(2-hidroksifenil) perimidin, 2-(4-hidroksifenil) perimidin, 2-(3-nitrofenil) perimidin, 2-(4-klorofenil) perimidin, 2-(3, 4metilendioksifenil) perimidin' dir (Çizelge 2.1.).

Bu maddeler dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülmüşler ve oda sıcaklığında saklanmışlardır. Uygulanacak dozları belirlemek için maddelerin 10 µg/plak, 500 µg/plak, 1000 µg/plak, 2500 µg/plak ve 5000 µg/plak konsantrasyonları, hazırlanıp bakteriler üzerinde denenmiş ve 100 µg/100 µl konsantrasyonunun üzerindeki konsantrasyonların toksik etki yaptığı görülmüştür.

Çizelge 2.1. Mutajenitesi araştırılan Kimyasal Test Maddelerinin İsimlendirilmeleri ve Kimyasal Formülleri

KİMYASAL MADDE	AÇIK FORMÜL	KAPALI FORMÜL	KİMYASAL İSİMLERİ
1.MADDE		$C_{11}H_8N_3$	Perimidin
2.MADDE		$C_{12}H_{10}N_2$	2- Metil perimidin
3. MADDE		$C_{17}H_{12}N_2$	2-fenil perimidin
4.MADDE		$C_{17}H_{12}N_2O$	2-(2-hidroksi fenil) perimidin

5. MADDE		$C_{17}H_{12}N_2O$	2-(4-hidroksi fenil) perimidin)
6. MADDE		$C_{17}H_{11}N_3O_2$	2-(3-nitro fenil) perimidin
7. MADDE		$C_{17}H_{11}N_2Cl$	2- (4- klorafneil) perimidin
8. MADDE		$C_{18}H_{10}N_2O_2$	2-(3,4 metilen dioksi fenil) perimidin

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

##### **(50x) Vogel Bonner Medium (Tuz)**

**Kullanım:** MGA, HB, ve HBA (master) plakları.

MgSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	2.5 g
Sitrik asit monohidrat	25 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	125 g
NaH <sub>2</sub> NH <sub>4</sub> (PO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O)	43.75 g
Distile su (45°C)	167.5 ml

Maddeler yukarıda belirtilen sıra ile distile suyun (45°C) içine eklenir ve hacim 250 ml' ye tamamlanır. 250 ml' lik 2 kaba bölünerek 121 °C' de 20 dakika süre ile otoklav edilir. Oda sıcaklığında saklanır.

##### **( 0.5 mM ) Histidin / Biotin solüsyonu**

**Kullanım:** Mutajenite deneyi (200 µl top agara 200 µl)

D-Biotin (F.W 247,3)	0.0309 g
L- Histidin.HCl (F.W.191,7)	0.024 g
Distile su	250 ml

Maddeler ilk önce biyotin daha sonra histidin olmak üzere distile suyun içinde çözülür. Daha sonra karışım otoklav edilir. + 4 °C' de saklanır.

##### **( % 0,8 / 0,02 M NaOH ) Ampilisin solüsyonu**

**Kullanım:** Ampisiline direnç kontrolü ve HBA plaklarının hazırlanması .

Ampisilin trihidrat	0.89 g
0,02 M sodyum hidroksit	100 ml

Ampisilin trihidrat, 0,02M NaOH içinde çözülür ve 0.22 µm çaplı filtreden geçirilerek steril edilir. + 4 °C' de saklanır.



### **( % 0,1 ) Kristal Viyole**

**Kullanım:** Rfa multasyonun deneme.

Kristal viyole	0.1 g
Distile su	100 ml

Boya ve su karıştırılıp, solüsyon ışık geçirmeyen bir kaba konur ve + 4 °C' de saklanır.

### **( % 0,13 ) Biotin çözeltisi**

**Kullanım:** Genotip kontrolü ve HBA plaklarının hazırlanması

D-Biyotin	0.00065 g
Distile su	50 ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülür ve 121°C' de 20 dakika otoklav edilir. + 4 °C' de saklanır.

### **( % 0,5 ) Histidin çözeltisi**

**Kullanım:** Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması.

D-Biyotin.HCI (F.W.191,7)	2 g
Distile su	400 ml

Histidin ile distile su karıştırılarak otoklav edilir. + 4 °C' de saklanır.

### **( % 20 ) Glukoz çözeltisi**

**Kullanım:** MGA ve HBA plakları hazırlanması.

Glukoz	20 g
Distile su	100 ml

Glukoz distile su içinde çözülerek 121 °C' de 20 dakika otoklav edilir. 0-4 °C' de saklanır.

#### **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 ısısında saklanır.

#### **Sodyum Azid ( AZS )**

**Kullanım:** Pozitif kontrol .

5 µg/ petri olmak üzere DMSO içinde çözülerek hazırlanır. TA 100 suşu için S9 karışımı gerektirmeyen bir kimyasaldır. Oda sıcaklığında saklanır.

#### **2-Aminofluorene ( 2AF )**

**Kullanım:** Pozitif kontrol.

10 µg/ petri olmak üzere DMSO içinde çözülerek hazırlanır. TA 98 ve TA 100 suşu için S9 karışımı gerektiren bir kimyasaldır. Oda sıcaklığında saklanır.

#### **Top Agar**

**Kullanım:** Mutasyon deneyi

Agar	1.5 g
NaCl	1.25 g
Distile Su	250 ml

Agar ve tuz distile suyun içinde iyice karıştırıldıktan sonra otoklav edilir. Oda sıcaklığında saklanır.

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

**Kullanım:** Histidin gereksinim deneyi

Agar	3 g
% 20 Glukoz	20 ml
Histidin çözeltisi	2 ml
Biyotin çözeltisi	1.2 ml
50 xVB tuzları	4 ml
Distile su	182 ml

Agar ve su karıştırıldıktan sonra otoklav edilir. 45 °C' ye kadar soğutulup sırasıyla % 20 glukoz, 50 xVB tuzları ve histidin çözeltisi eklenir. Solüsyon biraz daha soğuyunca biyotin eklenir. Karıştırılıp, 30' ar ml olarak petrilere dağıtılır.

### **Histidin / Biyotin / Ampisilin plakları (HBA agar)**

**Kullanım:** Ampisiline direnç testi ve "Master Plate" hazırlanmasında.

Agar	3 g
50xVB Tuz	4 ml
% 20 Glukoz	20 ml
Histidin.HCl.H <sub>2</sub> O	2 ml
0.5 mM Biyotin	1.2 ml
(% 0.8/0.02M NaOH) Ampisilin	0.6 ml
Distile su	182 ml

Agar ve su otoklavlanır. 45 °C' ye soğutulup, % 20 glukoz, 50xVB tuzları ve histidin bu solüsyona eklenir. Sıcaklık biraz daha azalınca biyotin ve ampisilin eklenerek petrilere 30 ml olarak dağıtılır. Bu plaklarda bakteriler + 4 °C' de 2 ay süreyle saklanabilir.

### **Minimal Glukoz Agar plakları ( MGA )**

**Kullanım:** Spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü, pozitif kontrol, solvent kontrol (DMSO) ve mutasyon deneyi.

Agar	7.5 g
50xVB tuz	10 ml
% 20 glukoz	50 ml
Distile su	415 ml

Agar ve su karıştırılıp çözülür ve otoklavlanır. 45 °C' ye soğutulup % 20 glukoz ve 50xVB tuzları yavaş yavaş karıştırılarak eklenir, petrilere 30 ml olarak aktarılır.

### **Nutrient Agar plakları ( NA )**

**Kullanım:** Gecelik kültürün ml'sindeki bakteri sayısını bulmak ve genotip kontrollerinde ( Kristal viyole, UV'ye dayanıklılık )

Oxoid Nutrient Broth no:2	2.6 g
Agar	1.6 g
Distile su	100 ml

Agar, broth ve su 250 ml'lik erlende karıştırılır. Otoklavlanıp petrilere 30' ar ml aktarılır.

### **Nutrien Broth sıvı kütür ortamı ( NB )**

**Kullanım:** Bakterilerin gecelik kültürde büyümeler.

Oxoid Nutrient Broth no:2	5 g
Distile su	200 ml
Ampisilin	630 µl

Broth ve su karıştırılıp otoklanılır. +4 °C' de muhafaza edilir.

### **3-Metil kolantren**

**Kullanım:** Metabolik aktivasyon hızlanması.

3. Metil kolontren	64 mg
Mısır yağı	1 ml

80 µg/ kg olmak üzere mısır yağında çözülerek 0,2- 0,5 ml intraperitoneal olarak (IP ) ratlara enjekte edildi.

### **0,1 M NADP Çözeltisi**

**Kullanım:** S9 karışımı

NADP (F.W.765,4)	383 mg
Steril distile su	5 ml

Çözelti 0,22 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edildi.

### **( 0,2M ) Fosfat Tamponu (PH 7.4)**

**Kullanım:** S9 karışımı

0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O (13.8g/500 ml)	60 ml
0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (14.2 g/500 ml)	440 ml

Karışım hazırlanıp 121 °C' de 20 dakika steril edildi.

### **S9 karışımı (% 10'luk)**

**Kullanım:** Metabolik Aktivasyon Deneyi

Mikrozom	1 ml
MgCl <sub>2</sub> -KCl tuzları	0.2 ml
Glukoz-6-fosfat	0.05 ml
0,1 M NADP	0.4 ml

0,2 M fosfat tamponu (PH 7.4)	5 ml
Steril distile su	3 ml

Tüm kimyasallar buz içindeki steril bir kaptaki karıştırıldı.

### **(0,15 M) KCl çözeltisi**

**Kullanım:** Mikrozom izolasyonu

KCl	11.275 g
Distile su	1000 ml

11,25 g KCl alınıp su ile 1 litreye tamamlanarak çözüldü. Karışım 121 °C' de 20 dakika otoklav edildi. +4 °C' de saklanır.

### **KCl-MgCl<sub>2</sub> Tuz çözeltisi**

**Kullanım:** S9 karışımı

KCl	61.5 g
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	40.7 g
Distile su	500 ml

KCl ve MgCl<sub>2</sub> tuzları alınıp distile su ile 500 ml' ye tamamlandı. 20 dakika 121 °C' de otoklav edildi.

### **(1M)Glukoz-6-fostat çözeltisi**

**Kullanım:** S9 karışımı

Glukoz-6-fostat	2.82 g
Steril Distile Su	10 ml

Çözelti 0,22 Mm por çaplı filtreden geçirilerek steril edildi.

## 2.2. Metod

Bu çalışma, Hacettepe üniversitesinde elde ettiğimiz test bakterilerinin stok kültürlerinin hazırlanması, bakterilerin genetik özelliklerinin kontrol edilmesi, mikrozomal fraksiyonunun hazırlanması ve Ames/ *Salmonella* / Mikrozm testi Maron ve Ames'in [6] 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.

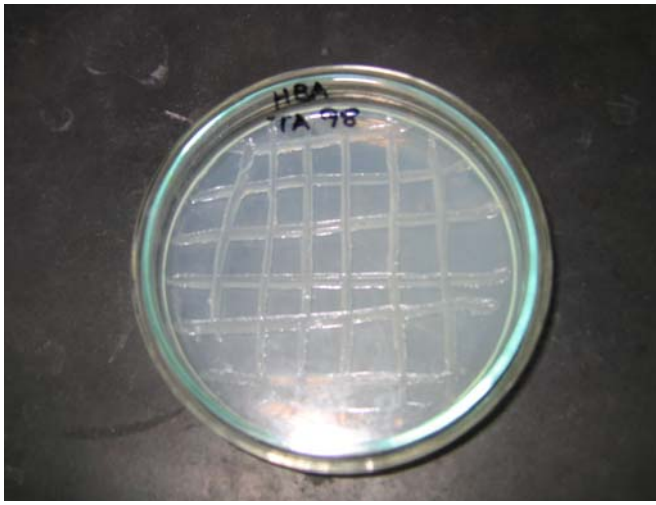
### 2.2.1. *Salmonella* suşlarının kültürlerinin ve master plakların hazırlanması

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, 2 ml 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 yapılmış ve 37 °C' de 48 saat inkübe edilmiştir. Hazırlanan bu plaklar + 4 °C' de iki ay süre ile saklanabilir.

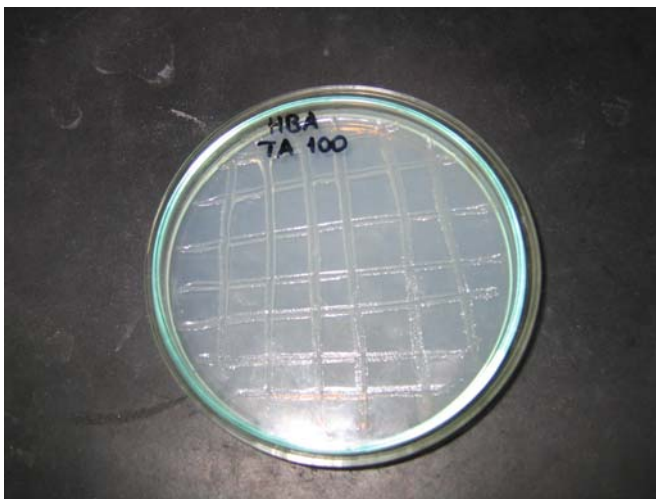
### 2.2.1. *Salmonella* suşlarının stoklanması ve stok kültürlerinin açılması

Test suşlarının uzun süre canlılığını ve mutant özelliklerini koruyabilmeleri için stoklanmaları gerekir. Bunun için HBA (Histidin/Biyotin/Ampisilin Agar) agarda üremiş olan *Salmonella* suşlarından iyi izole olmuş, normal büyülmekteki, bir koloni öze ile alınıp 2 ml Nutreient Broth (NB) içeren tüplerde süspanse edilerek 37 °C' de, bir gece inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda steril ependorf tüp içine 1 ml sıvı bakteri kültürü ve 0,09 ml 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/ Biotin (HB) agar plaklarına paralel ekim yapılmıştır. 37 °C’ de 48 saat inkübe edildikten sonra, HB plaklarında üreyen bakterilerden iyi izole olmuş bir koloni öze ile alınıp Histidin/ Biotin /Ampisilin (HBA) 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 saklanabilir ve gerektiğinde gecelik kültür hazırlamak için kullanılabilir (Şekil 2.1.a. , Şekil 2.1.b.).



Şekil 2.1.a. TA 98 suşunun master plaklarda üremesi



Şekil 2.1.b. TA 100 suşunun master plaklarda üremesi

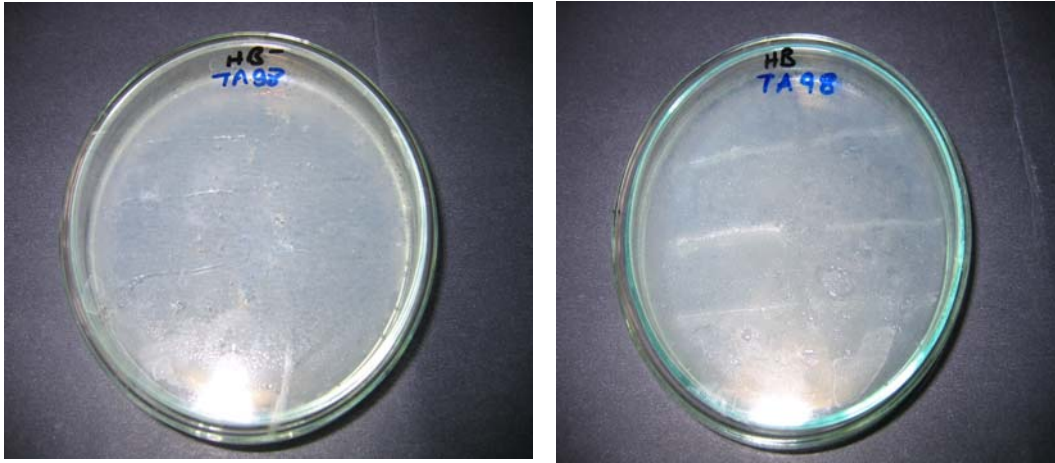


### 2.2.3. *Salmonella* suşlarının kontrol testlerinin yapılması (Bakterilerin genotiplerinin kontrol edilmesi)

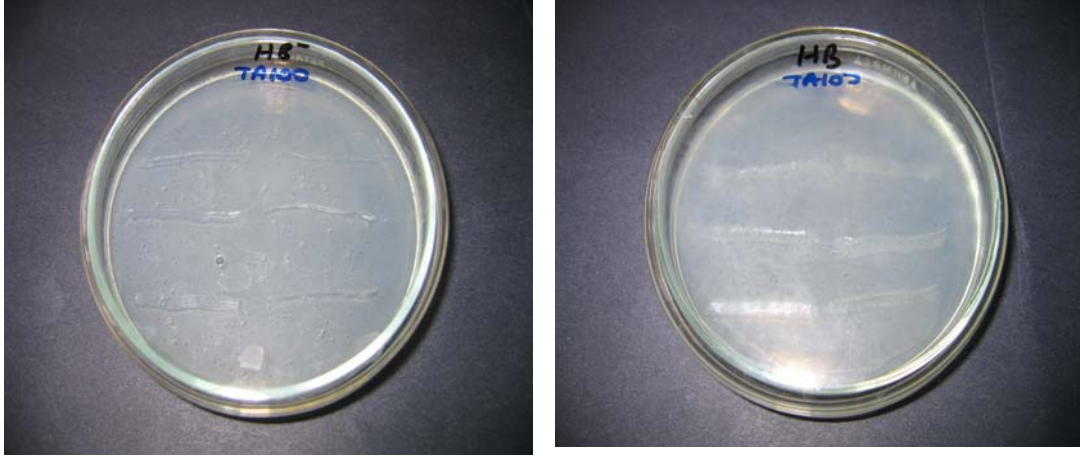
Testin güvenilirliği açısından test suşlarının orijinal mutasyonlara sahip olup olmadığını bilmek gerekir. Bu nedenle bakterilerin genetik özellikleri bazı testlerle kontrol edilmiştir.

#### 2.2.3.1. Histidin gereksinimi kontrolü

Bakterilerin minimal glukoz agar (MGA) üzerine ekilmeleri sonucu his<sup>-</sup> bakteriler his<sup>+</sup>'lerden ayırt edilir. Çünkü MGA histidin ve biyotin içermemesi nedeniyle kontrol plağı olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla NB (nutrient broth)'da, bir gece üretilen bakterilerden MGA ve HB plaklarına çizgi ekim yapılmıştır. 37 °C' de ve 48- 78 saat inkübasyondan sonra HB plaklarında üreme gözlenirken MGA plaklarında üreme gözlenmemiştir (Şekil 2.2.a., Şekil 2.2.b.) Böylece kullanacağım bakterilerin his<sup>-</sup> mutasyonunun taşıdığı anlaşılmıştır.



Şekil 2.2.a. TA 98 suşunun histidin gereksinimi kontrolü sonucu HB plaklarında üreme



Şekil 2.2.b. TA 100 suşunun histidin gereksinimi kontrolü sonucu HB plaklarında üreme

### 2.2.3.2. *uvr B* mutasyonu kontrolü

*uvrB* mutasyonu ile bakterilerin ultraviyole (uv) ışınlarının neden olduğu replikasyon hatalarının düzeltilmesi için gerekli olan “DNA onarım mekanizması” engellenmiştir. Ve bu mutasyonun varlığı UV ışınlarına duyarlılık testi ile tespit edilir. Bu test için, Nutrient Broth (NB)’ da bir gece üretilen bakteri kültüründen bir öze dolusu alınıp Nutrient Agar (NA) plaklarına paralel ekim yapılmıştır. Plağın yarısı (çizgileri kesecek şekilde) plastik bir tabaka ile kapatılıp 15 watt gücünde bir UV lambası ile 33 cm yüksekten 8 sn. süre ile ışınlanmıştır. Işınlamadan sonra petri kapakları kapatılıp 37 °C’ de 24 saat inkübe edilmiştir. Kullanılan UV ışığı dozu, *uvrB* mutasyonu taşıyan bakteriler öldürecek dozdadır. Bundan dolayı UV’ye maruz kalan kısımda üreme olmaz. Plastik kapakla kapatılan kısımda normal üreme gözlenmiştir (Şekil 2.3.a., Şekil 2.3.b). Bu sonuç bize kullanılacak olan bakterilerin *uvrB* mutasyonu taşıdığını göstermiştir.



Şekil 2.3.a. TA 98 suşunda uvrB mutasyonu kontrolü



Şekil 2.3.b. TA 100 suşunda uvrB mutasyonu kontrolü

### 2.2.3.3. Rfa Mutasyonu kontrolü

Bu mutasyon bakteri hücre zarının lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuştur ve hücre zarının geçirgenliği arttırılmıştır.

Varlığı kristal viyole duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için bakteri kültürü Nutrient Broth'da bir gece büyütülen 0,1 ml sıvı kültür, 45 °C' lik su banyosunda ısıtılmış 2 ml top agar üzerine ilave edilip, Nutrient agar (NA) plaklarına dökülerek sekiz işareti hareketi yaptırılmıştır. Donduktan sonra, plağın ortasına 0,5 cm çaplı steril filtre kağıdı diski yerleştirilip diskin ortasına % 0,1'lik kristal viyole karışımından 10 µl damlatılmıştır. Kağıt boyayı emdikten sonra

plaklar 37 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda diskin çevresinde 2,4 cm' lik üreme olmayan zon gözlenmiştir (Şekil 2.4.a., Şekil 2.4.b.). Boya maddesi bakterilerin içine kolayca girip etkilediği için bakterilerin üremeleri engellenmiş ve bakterilerin *Rfa* mutasyonu taşıdığı gösterilmiştir.



Şekil 2.4.a. TA 98 suşunda *Rfa* mutasyon kontrolü



Şekil 2.4.b. TA 100 suşunda *Rfa* mutasyon kontrolü

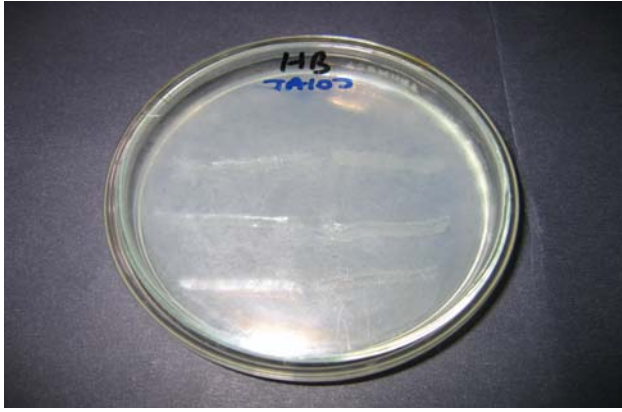
#### 2.2.3.4. R faktör varlığının kontrolü

Test bakterilerinin içerdiği, R faktör taşıyan pKM101 plazmidlerinin kaybolup kaybolmadıkları, ampisiline dirençliliğinin ölçülmesi ile tespit edilmiştir. Bu amaçla büyütülen NB içinde bakteri kültürü, (% 0,8 ampisilin/ 0,02 M NaOH) ampisilin içeren HBA plaklarına çizgi ekim yapılarak, 37 °C' de 24 saat inkübasyonu sonunda plazmid içeren mutant bakterilerin ampisilinli ortamda

büyüdükleri gözlenmiştir (Şekil 2.5.a., Şekil 2.5.b.). Yani bakteriler R faktör plazmidini içermektedir.



Şekil 2.5.a. TA 98 suşunda R faktör varlığının kontrolü



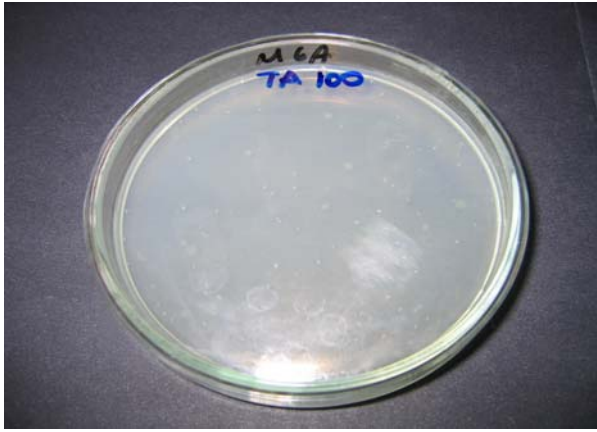
Şekil 2.5.b. TA 100 suşunda R faktör varlığının kontrolü

### 2.2.3.5. Spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü

Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his<sup>-</sup> durumundan his<sup>+</sup> durumuna dönüşmesi belirli sınırları içinde mümkündür. Bu sınırlar TA 98 için 20- 40 revertant/ plak; TA 100 için 80- 100 revertant/ plaktır. Bu test için 37 °C' de NB'de büyütülen gecelik kültürden 0,1 ml alınıp 45 °C' de su banyosunda ısıtılan 2 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra 0,2 ml 0,5 M Histidin/Biyotin solüsyonu da eklenip test tüpü yavaşça çalkalanarak MGA plaklarına yayılmış ve 37 °C' de 48 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır. (Şekil 2.6.a., Şekil 2.6.b.)



Şekil 2.6.a. TA 98 suşunda spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü



Şekil 2.6.b. TA 100 suşunda spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü

#### 2.2.4. Sıvı kültürünün ml'sindeki bakteri sayısının belirlenmesi

Deneyde kullanılan gecelik kültürün ml'sin de bulunan bakteri sayısını bulmak için HBA plaklarından bir koloni alınarak NB içinde süspansiyon edilmiş ve çalkalamalı inkübatörde 37 °C' de bir gece inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda gecelik kültürün,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  olacak şekilde bir dizi seyreltmeleri hazırlanmıştır. Bu seyreltmelerden NA plaklarına 10 µl'lik miktarda 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 650 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülüp saf kültürün ( $10^0$ ) optik dansitesi 0,165 olarak belirlenmiştir.



### **2.2.5. Test maddelerinin sitotoksik etkilerinin saptanması**

Kullanılan test maddelerinin, test bakterileri için öldürücü dozunun saptanması amacıyla top agara 0,1 ml bakteri kültürü ve 0,1 ml 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 ile karşılaştırılarak toksik ve toksik olmayan dozlar belirlenmiştir. Buna göre test bileşiğinin 2500 µg/plak ve 100 µg/plak dozunun toksik olduğu bulunmuş ve 100 µg/plak, 10 µg/plak, 1 µg/plak, 0,1 µg/plak, 0,01 µg/plak olmak üzere 5 doz seviyesinde mutajenite deneylerinin yapılmasına karar verilmiştir.

### **2.2.6. Memeli karaciğer mikrozomlarının hazırlanması**

Test maddelerinin metabolik ürünlerinin mutajen olup olmadığını, araştırmak için kullanılması gereken mikrozom ekstresi wistar cinsi ratlar’ dan hazırlanmıştır. Bunun için ratlara, öldürülmeden 5 gün önce 80 mg/ kg olacak şekilde intraperitoneal olarak 3- metilkolantren enjekte edilerek mikrozomal enzim artışı uyarılmıştır [6].

Mikrozom izolasyonuna başlamadan önce kullanılan tüm malzemeler steril edilmiş ve 0- 2 °C’ de muhafaza edilmiştir. Deneyde kullanılmak üzere 3- Metilkolantren enjekte edilmiş olan 200 gr 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. 1 gr karaciğere 1 ml olacak şekilde soğuk 0,15 M KCl ile karaciğer yıkandıktan sonra, 1 gr karaciğere 3 ml 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 24000 rpm’de homojenize edilerek koyu pembe renk görülene kadar bu işlem tekrar edilmiştir. Homojenat, 9000 Xg’de 0- 2°C’de 10 dak. “Varifüğe ZORF” marka santrifüjde santrifüj edildikten sonra, süpernetant kısım soğuk steril endorf tüplere aktarılmıştır. Kontaminasyonu önlemek amacı ile homojenat 0,25 µm çaplı selüloz filtreler ile filtre edilmiştir. Sterilite kontrolü

için mikrozomal fraksiyondan 0,1 ml alıp NA ve HBA plaklarına yayma ekim yapılarak plaklar 37 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir. Kullanılmak için – 20 °C' de saklanmıştır.

#### S9 Karışımın Hazırlanması:

S9 fraksiyonunda bulunan mikrozomal enzimlerin metabolik aktivasyon reaksiyonlarını yürütebilmeleri için gerekli kofaktörler S9' a eklendi. Bu nedenle deneye başladı: 8 mM MgCl<sub>2</sub> + 33 mM KCl + 5 mM Glukoz-6-fosfat + 4 mM sodyum fosfat (PH:7,4) + 0,1 M NADP + S9 (0,04 ml S9/1 ml S9 karışımı) ilave edildi [6].

### **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. Deneyler farklı zamanlarda iki bağımsız deney şeklinde S9' lu ve S9' suz olarak 2 safhada, her doz için paralel 3 plak halinde yapılmıştır.

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

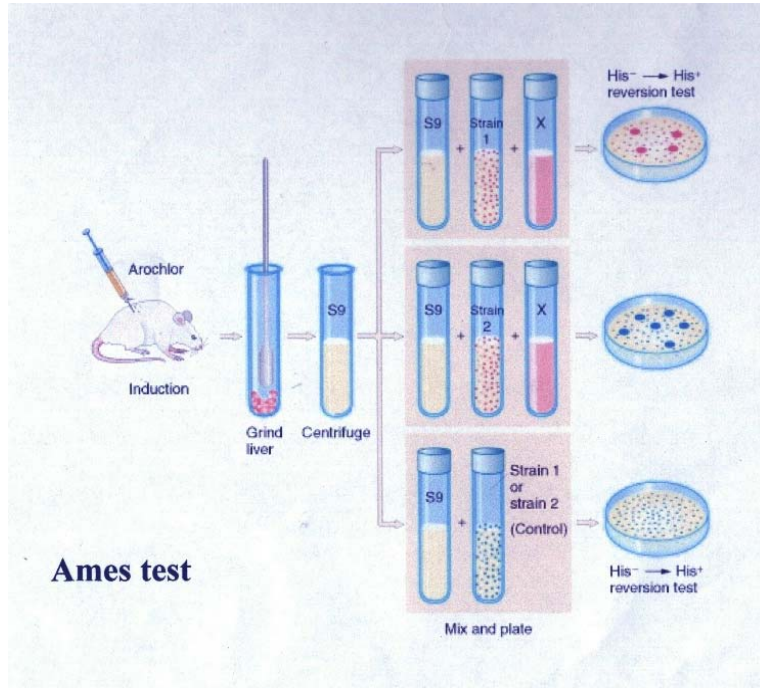
Bu amaçla, içlerine 0,2 ml histidin-biyotin çözeltisi ilave edilmiş 2' şer ml'lik top agar içeren deney tüpleri 45 °C' lik su banyosunda ısıtıp içlerine 0,1 ml test maddesi ve 0,1 ml 12-16 saatlik bakteri kültürü eklenmiştir. Tüpler çalkalanacak 37 °C' ye ısıtılmış MGA (Minimal Glukoz Agar) plaklarına dökülmüş, plaklara hızla 8 işareti yaptırılarak top agarın plak üzerine homojen dağılması sağlanmıştır. 15 dak. donması beklendikten sonra plaklar ters çevrilip 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 TA 98 suşu için 200 µg/ 100 µl 4-nitro-o-fenilendiamin, TA 100 suşu için 1 µg/ 100µl (NaN<sub>3</sub>) sodyum azid [6, 91, 60, 78, 97] kullanılmıştır. Deney sonuçları



standart hata ile birlikte ortalamaları alınarak çizelge 3.1. ve çizelge 3.3.' e kaydedilmiştir.

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

S9'lu (+) deneyde, içinde 0,2 ml histidin biyotin çözeltilisi bulunan 2' şer ml'lik top gar tüpleri 45 °C' de su banyosunda tutulur. Bu tüplere 0,1 ml gecelik bakteri, kültürü, 0,1 ml test edilecek kimyasal madde ve buz içinde beklettiğimiz 0,5 ml. % 10'luk S9 karışımı eklendi. Karışım vorteksle çalkalanıp donmaması için bekletilmeden MGA plaklarına dökülmüş ve homojen dağılımı sağlanmıştır. 15 dak. plakların donması beklendikten sonra, plaklar ters çevrilerek 37 °C' lik etüvde 48-72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kolonilerin sayımı yapıldı (Şekil 2..7) Ve standart hata ile birlikte ortalamaları alınarak çizelge 3.2. ve çizelge 3.4.'e kaydedilmiştir. Ayrıca deneyde TA98 ve TA100'ün kendiliğinden geri dönüş sıklığı (spontan mutasyon), solvent kontrol olan DMSO ve pozitif kontrol olarak her iki suş için 1g/100µl 2-Aminofluoren [6, 5, 40, 78, 91, 93- 96] deneye paralel olarak denenmiş ve sonuçları çizelgelere kaydedilmiştir.



Şekil 2.7. Ames testinin yapılışı

### 2.2.7.3.Sonuçların Değerlendirilmesi

Bu çalışmada sekiz ayrı perimidin türevinin mutajenik aktivitesi *Salmonella typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 mutant suşları ile araştırılmıştır. Her doz, 3 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 Bölümünde alınan "SPSS-WINDOWS" paket programı kullanılmıştır. TA98 için olan deney sonuçları Çizelge 3.1. ve 3.2.'de, TA 100 için olan deney sonuçları ise Çizelge 3.3. ve 3.4.'de verilmiştir. Çizelgelerde, 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 çizelge 3.1., 3.2. ve 3.3., 3.4.'de aynı şekilde gösterilmiştir.

### 3.BULGULAR

#### 3.1. Perimidin Türevlerinin Mutajenik Aktivitesinin Ames Testi ile Ölçülmesi

Materyal ve metod bölümünde açıklandığı gibi, perimidin'in 8 türevinin mutajenik aktivitesi, söz konusu test maddelerinin 5 ayrı dozu ile test edildi. Her doz için 3 ayrı plağa ekim yapıldığından değerler bunların ortalaması olarak verildi. Deney sonuçları deney sonuçları TA 98 için çizelge 3.1. ve 3.2.' de, TA 100 için çizelge 3.3. ve 3.4.'de verilmiştir.

Çizelgelerde test maddelerinin farklı dozlarında tespit edilen revertant koloni sayıları yer almaktadır.

Ayrıca çizelgenin altında pozitif mutajen olarak kullanılan sodyum azid (1,5 µg/ plak), 4-nitro-o-fenilendiamin (20µg/plak) ve 2-amino-fluoren (10µg/ plak) ile verilen cevaplar da çizelgenin altında belirtilmiştir.

Test bakterilerimizin (*S.typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 suşları) kimyasal test maddelerimizle verdiği doz cevap eğrileri ise; TA 98 ve TA 100 için S 9' suz deney sonuçları şekil 3.1. 'de, S 9' lu deney sonuçları şekil 3.2.' de yer almaktadır.

Çizelge 3.1. TA 98 suşu kullanılarak metabolik aktivasyon olmadan (S 9'suz) elde edilen sonuçlar

	<u>DOZLAR</u>	<u>REV /plak</u>	<u>P DEĞERİ</u>
<b>1. MADDE</b>	100	19 ± 2,5	0,48
<b>Perimidin</b>	10	19 ± 4,0	0,63
	1	19 ± 3,5	0,67
	0,1	21 ± 2,5	0,20
	0,01	18 ± 2,0	0,70
<b>2. MADDE</b>	100	21 ± 3,0	0,22
<b>2. Metil perimidin</b>	10	22 ± 3,0	0,15
	1	30 ± 8, 0	0,07
	0,1	17 ± 5, 5	0,87
	0,01	30 ± 10, 6	0,11
<b>3. MADDE</b>	100	32 ± 9,0	0,06
<b>3- Fenil perimidin</b>	10	32 ± 5,6	0,02 *
	1	25 ± 6,2	0,14
	0,1	23 ± 5, 5	0,19
	0,01	25 ± 6,1	0,12
<b>4. MADDE</b>	100	22 ± 2,5	0,17
<b>2-(2-hidroksi fenil)</b>	10	20 ± 3,0	0,39
	1	7 ± 2,6	0,01*
	0,1	35±11,5	0,07
	0,01	23 ± 4,1	0,17

<b>5. MADDE</b>	100	29 ± 4,7	0,03*
<b>2-(4-hidroksifenil) perimidin</b>	10	23 ± 13,2	0,53
	1	17 ± 7,0	0,89
	0,1	30 ± 5,5	0,03*
	0,01	19 ± 11,5	0,85
<b>6. MADDE</b>	100	26 ± 4,0	0,06
<b>2-(3-nitrofenil) perimidin</b>	10	18 ± 1,1	0,89
	1	7 ± 2,6	0,01*
	0,1	24 ± 1,7	0,05*
	0,01	16±5,2	0,74
<b>7. MADDE</b>	100	20 ± 6,0	0,60
<b>2-(4-klorofenil) perimidin</b>	10	15 ± 3,0	0,51
	1	30 ± 8,0	0,07
	0,1	21± 2,6	0,24
	0,01	27 ± 14,9	0,32
<b>8. MADDE</b>	100	17 ± 3,0	1,00
<b>2-(3,4metilendioksifenil)</b>	10	22 ± 9,5	0,47
<b>perimidin</b>	1	17 ± 1,1	0,78
	0,1	27 ± 12,6	0,26
	0,01	28 ± 4,0	0,02*

**Negatif Kontrol (DMSO kontrol) :** 17. 3 ± 3. 7

**Pozitif Kontrol:** TA 98 NPD (20 µg/petri) 1127 ± 114.3

\* işareti standart sapması  $p \leq 0.05$  olan mutajenleri simgelemektedir.

Çizelge 3.2. TA 98 suşu kullanılarak metabolik aktivasyon varlığında (S 9'lu) elde edilen sonuçlar

	<u>DOZLAR</u>	<u>REV /plak</u>	<u>P DEĞERİ</u>
<b>1. MADDE</b>	100	24 ± 7,8	0,82
<b>Perimidin</b>	10	27 ± 3,0	0,69
	1	28 ± 6,6	0,59
	0,1	31 ± 4,0	0,27
	0,01	23± 3,5	0,64
<b>2. MADDE</b>	100	20 ± 5,0	0,30
<b>2- Metil perimidin</b>	10	29 ± 14,0	0,72
	1	22 ± 3,0	0,44
	0,1	19± 7,2	0,33
	0,01	33 ± 6,4	0,22
<b>3. MADDE</b>	100	26 ± 10,0	0,89
<b>3- Fenil perimidin</b>	10	33 ± 7,5	0,24
	1	17 ± 5,1	0,14
	0,1	30 ± 4,5	0,31
	0,01	30 ± 4,7	0,38
<b>4. MADDE</b>	100	28 ± 7,2	0,65
<b>2-(2-hidroksi fenil) perimidin</b>	10	21 ± 3,6	0,35
	1	19 ± 8,0	0,31
	0,1	34±4,5	0,12
	0,01	27 ±2,5	0,74

<b>5. MADDE</b>	100	59 ± 1,1	0,00*
<b>2-(4-hidroksifenil) perimidin</b>	10	30 ± 1,0	0,26
	1	23 ± 1,5	0,50
	0,1	22 ± 1,0	0,40
	0,01	29 ± 3,0	0,36
<b>6. MADDE</b>	100	22 ± 2,0	0,46
<b>2-(3-nitrofenil) perimidin</b>	10	20 ± 1,1	0,19
	1	14 ± 2,3	0,04*
	0,1	17 ± 2,5	0,10
	0,01	13 ± 2,6	0,03*
<b>7. MADDE</b>	100	23 ± 1,5	0,61
<b>2-(4-klorofenil) perimidin</b>	10	20 ± 1,0	0,21
	1	15 ± 5,1	0,08
	0,1	12 ± 3,5	0,03*
	0,01	12 ± 3,0	0,02*
<b>8. MADDE</b>	100	12 ± 2,6	0,02*
<b>2-(3,4-metilendioksifenil) perimidin</b>	10	22 ± 2,0	0,38
	1	12 ± 3,0	0,02*
	0,1	34 ± 5,2	0,13
	0,01	23 ± 4,0	0,60

**Negatif Kontrol (DMSO kontrol) :** 25 ± 6,1

**P ozitif Kontrol:** TA 98 2AF (10µg/ petri) 937 ± 53,6

\* işareti standart sapması  $p \leq 0.05$  olan mutajenleri simgelemektedir

Çizelge 3.3. TA 100 suşu kullanılarak metabolik aktivasyon olmadan (S 9' suz) elde edilen sonuçlar

	<b><u>DOZLAR</u></b>	<b><u>REV /plak</u></b>	<b><u>P DEĞERİ</u></b>
<b>1. MADDE</b>	100	133 ± 32,8	0,31
<b>Perimidin</b>	10	84 ± 3,0	0,13
	1	79 ± 3,0	0,08
	0,1	88 ± 13,5	0,26
	0,01	70 ± 9,6	0,52
<b>2. MADDE</b>	100	104 ± 4,7	0,82
<b>2- Metil perimidin</b>	10	92 ± 3,0	0,30
	1	77 ± 3,5	0,07
	0,1	72 ± 1,5	0,10
	0,01	76 ± 6,5	0,07
<b>3. MADDE</b>	100	105 ± 3,6	0,89
<b>3-Fenil perimidin</b>	10	75 ± 5,5	0,06
	1	70 ± 6,6	0,04*
	0,1	85 ± 24,5	0,30
	0,01	85 ± 4,5	0,14
<b>4. MADDE</b>	100	106 ± 23, 0	0,98
<b>2- (2-hidroksifenil) perimidin</b>	10	97 ± 2,5	0,51
	1	101 ± 7,02	0,69
	0,1	73 ± 1,5	0,10
	0,01	85±4,5	0,17



<b>5. MADDE</b>	100	112 ± 8,1	0,70
<b>2-(4-hidroksifenil) perimidin</b>	10	111 ± 13,8	0,76
	1	106 ± 9,6	0,96
	0,1	91 ± 12,0	0,33
	0,01	105 ± 15	0,91
<b>6. MADDE</b>	100	89 ± 15,8	0,30
<b>2-(3-nitrofenil) perimidin</b>	10	97 ± 7,5	0,50
	1	63 ± 4,5	0,02*
	0,1	97 ± 5,0	0,47
	0,01	91 ± 14,8	0,36
<b>7. MADDE</b>	100	91 ± 2,5	0,31
<b>2-(4-klorofenil) perimidin</b>	10	98 ± 214,0	0,66
	1	101 ± 2,6	0,68
	0,1	117 ± 1,5	0,45
	0,01	84 ± 13,3	0,18
<b>8. MADDE</b>	100	100 ± 4,5	0,63
<b>2-(3,4-metilendioksifenil) perimidin</b>	10	105 ± 2,0	0,88
	1	77 ± 10,5	0,09
	0,1	122 ± 1,5	0,32
	0,01	103 ± 5,5	0,76

**Negatif Kontrol (DMSO kontrol) : 107 ± 20,8**

**Pozitif Kontrol: TA 100 AZS (1,5 µg/ petri) 1127 ± 114,3**

\* işareti standart sapması  $p \leq 0.05$  olan mutajenleri simgelemektedir.

Çizelge 3.4. TA 100 suşu kullanılarak metabolik aktivasyon varlığında (S 9'lu) elde edilen sonuçlar

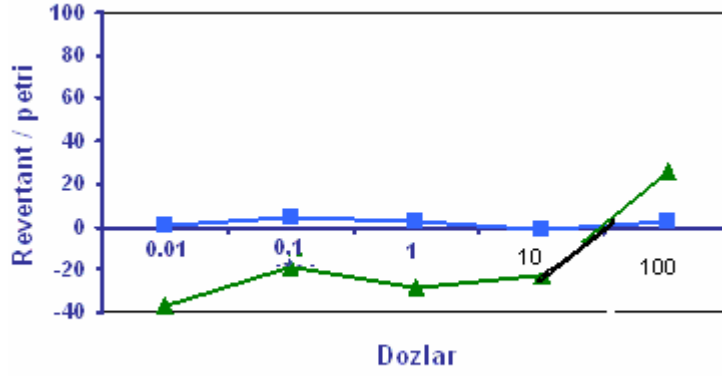
	<b><u>DOZLAR</u></b>	<b><u>REV /plak</u></b>	<b><u>P DEĞERİ</u></b>
<b>1. MADDE</b>	100	159 ± 39,4	0,11
<b>Perimidin</b>	10	196 ± 156,2	0,42
	1	144 ± 74,8	0,44
	0,1	118 ± 28,0	0,58
	0,01	224 ± 157,9	0,32
<b>2. MADDE</b>	100	118 ± 5,5	0,40
<b>2- Metil perimidin</b>	10	129 ± 10,0	0,16
	1	129 ± 11,5	0,18
	0,1	125 ± 10,0	0,23
	0,01	98 ± 20,0	0,68
<b>3. MADDE</b>	100	106 ± 1,5	0,96
<b>3- Fenil perimidin</b>	10	133 ± 1,5	0,10
	1	75 ± 1,5	0,07
	0,1	92 ± 21,8	0,49
	0,01	61 ± 10,5	0,03*
<b>4. MADDE</b>	100	93 ± 11,1	0,42
<b>2- (2-hidroksifenil) perimidin</b>	10	95 ± 1,5	0,44
	1	82 ± 2,6	0,14
	0,1	119 ± 34,5	0,59
	0,01	60±8,3	0,03*

<b>5. MADDE</b>	100	78 ± 6,5	0,10
<b>2-(4-hidroksifenil) perimidin</b>	10	98 ± 13,0	0,61
	1	111 ± 19,2	0,75
	0,1	64 ± 9,0	0,04*
	0,01	72 ± 7,0	0,06
<b>6. MADDE</b>	100	128 ± 25,5	0,32
<b>2-(3-nitrofenil) perimidin</b>	10	103 ± 20,1	0,87
	1	127 ± 2,6	0,17
	0,1	144 ± 30,8	0,15
	0,01	84 ± 19,8	0,27
<b>7. MADDE</b>	100	119 ± 32,3	0,59
<b>2-(4-klorofenil) perimidin</b>	10	87 ± 16,0	0,30
	1	105 ± 38,6	0,98
	0,1	95 ± 17,6	0,56
	0,01	90 ± 7,9	0,31
<b>8. MADDE</b>	100	64 ± 6,6	0,03*
<b>2-(3,4-metilendioksifenil) perimidin</b>	10	63 ± 21,6	0,07
	1	79 ± 7,5	0,12
	0,1	69 ± 4,0	0,04*
	0,01	63 ± 7,5	0,03*

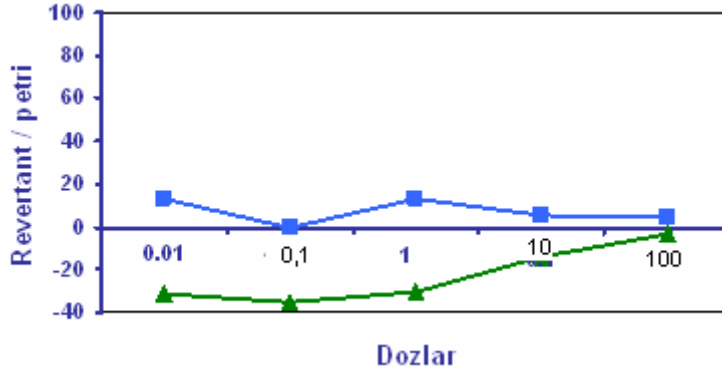
**Negatif Kontrol (DMSO kontrol):** 105,6 ± 22,1

**Pozitif Kontrol:** TA 100 2 AF (10 µg/ petri) 822 ± 36, 9

\* işareti standart sapması  $p \leq 0.05$  olan mutajenleri simgelemektedir.

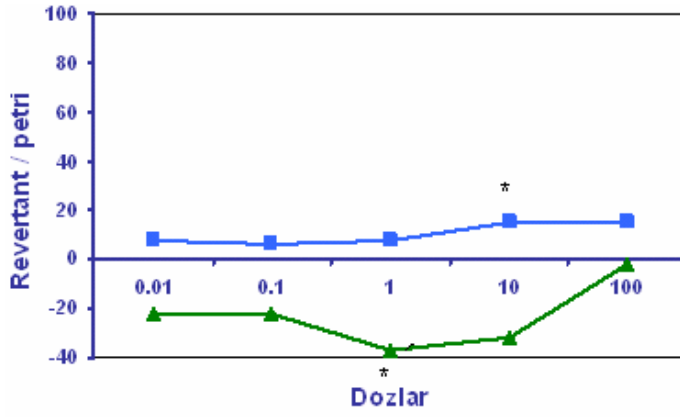


**1. Madde: Perimidin**

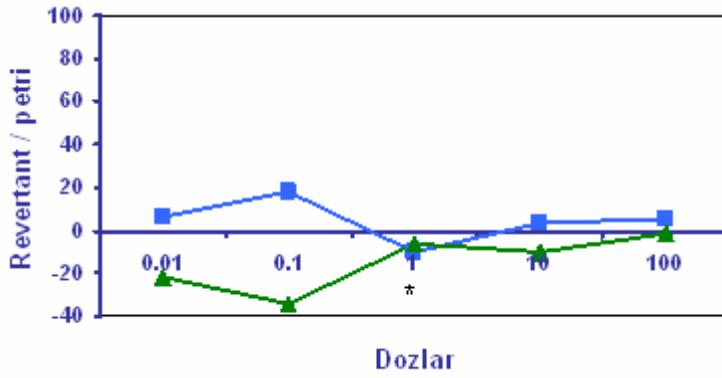


**2. Madde: 2-metil Perimidin**

Şekil 3.1. TA98 ve TA 100 suşlarının metabolik aktivasyon olmadan (S<sup>9</sup> suz) kimyasal test maddeleriyle verdiği doz cevap eğrileri

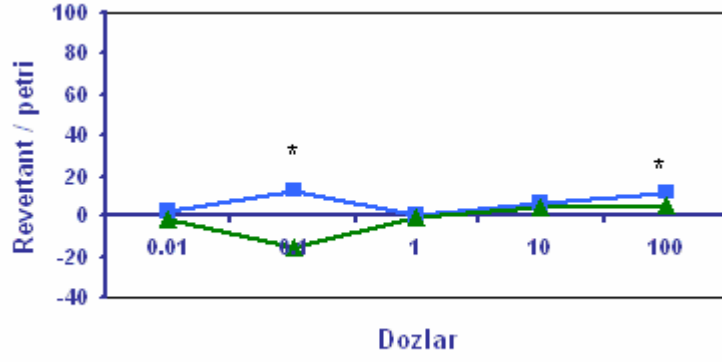


### 3. Madde: 2- fenil Perimidin

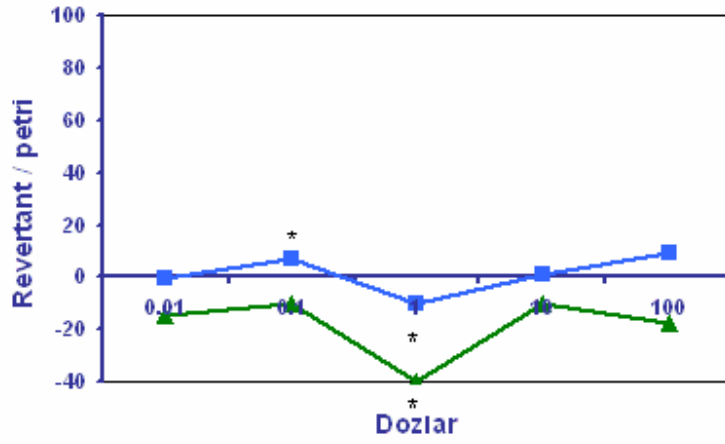


### 4. Madde:2-( 2-hidroksi fenil) Perimidin

Şekil 3.1. (devam) TA98 ve TA 100 suşlarının metabolik aktivasyon olmadan (S 9' suz) kimyasal test maddeleriyle verdiği doz cevap eğrileri

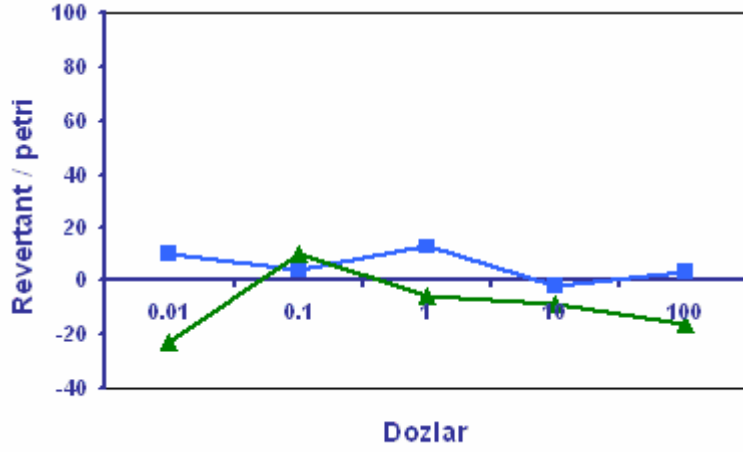


**5. Madde: 2-( 4- hidroksi fenil) Perimidin**

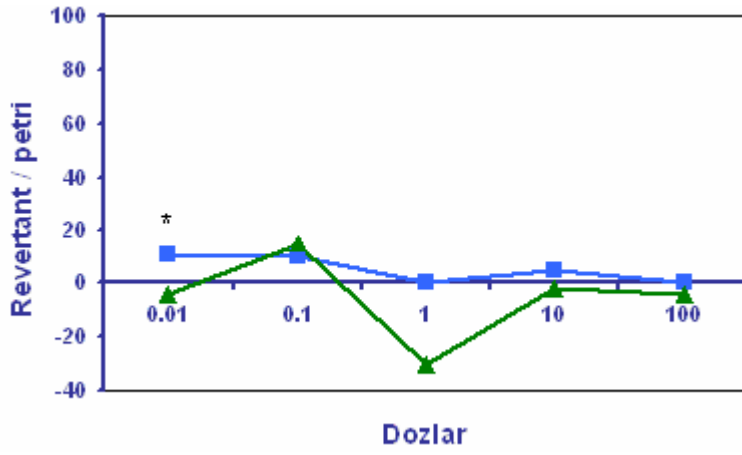


**6. Madde: 2- (3-nitro fenil) Perimidin**

Şekil 3.1. (devam) TA98 ve TA 100 suşlarının metabolik aktivasyon olmadan (S 9' suz) kimyasal test maddeleriyle verdiği doz cevap eğrileri

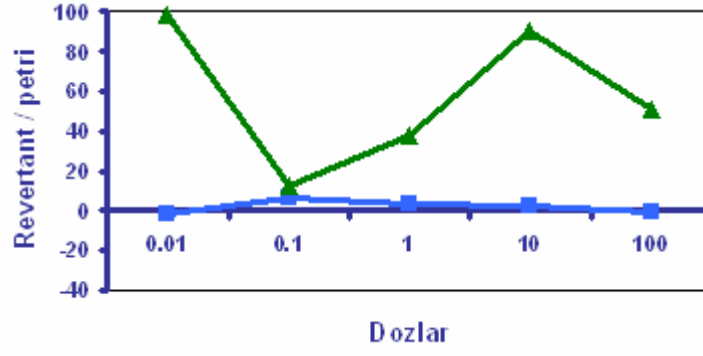


**7.Madde:** 2-(4-kloro fenil) Perimidin

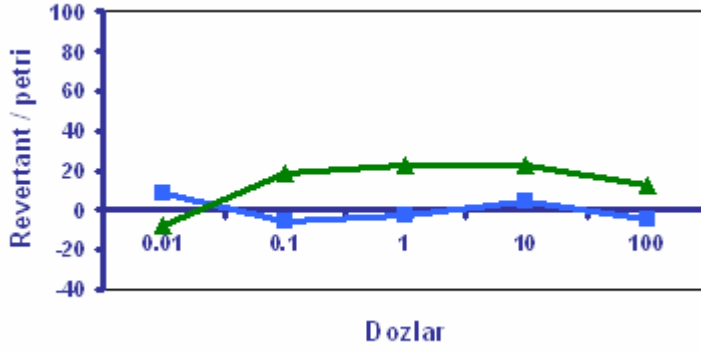


**8.Madde:** 2-(3, 4 metilen dioksifenil) Perimidin

Şekil 3.1. (devam) TA98 ve TA 100 suşlarının metabolik aktivasyon olmadan (S<sup>9</sup> suz) kimyasal test maddeleriyle verdiği doz cevap eğrileri



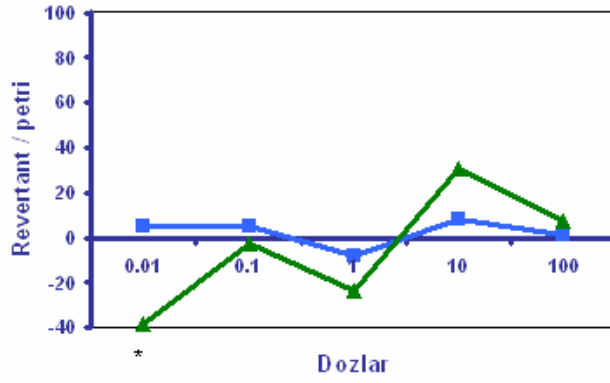
**1.Madde:Perimidin**



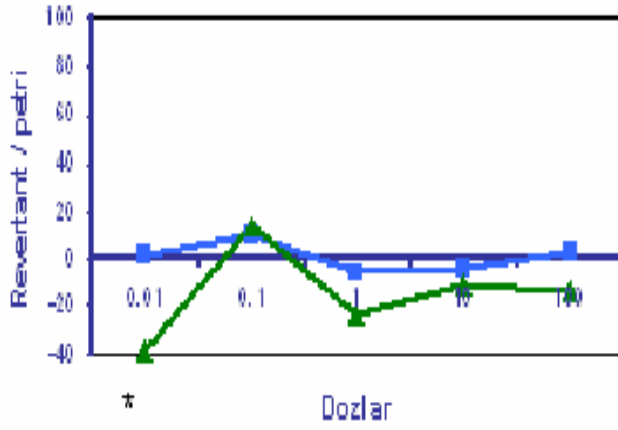
**2. Madde: 2-metil Perimidin**

Şekil 3.2. TA98 ve TA 100 suşlarının metabolik aktivasyon varlığında (S<sup>9</sup> lu) kimyasal test maddeleriyle verdiği doz cevap eğrileri



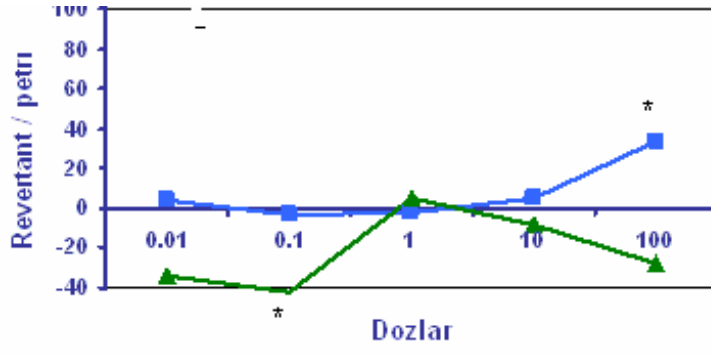


### 3. Madde: 2- fenil Perimidin

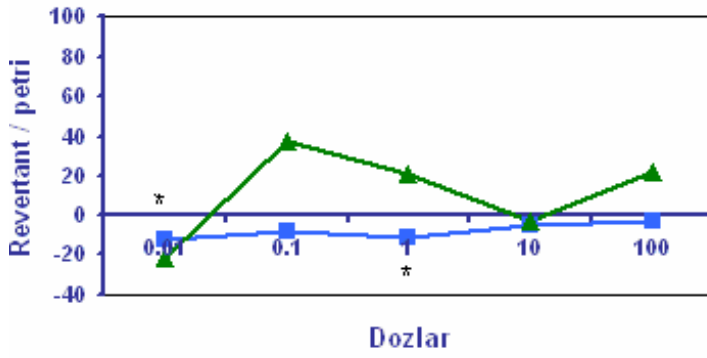


### 4. Madde:2-( 2-hidroksi fenil) Perimidin

Şekil 3.2. (devam) TA98 ve TA 100 suşlarının metabolik aktivasyon varlığında (S 9' lu) kimyasal test maddeleriyle verdiği doz cevap eğrileri

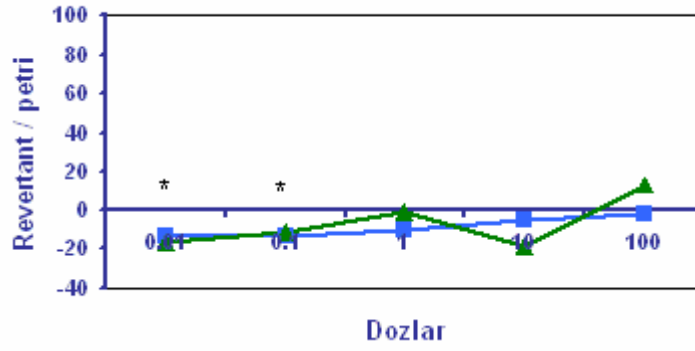


**5. Madde:** 2-(4- hidroksi fenil) Perimidin

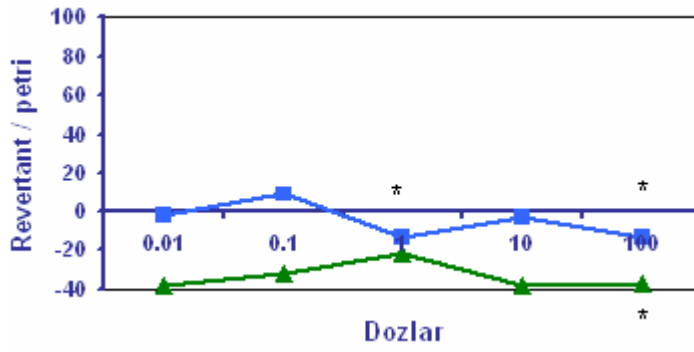


**6.Madde:** 2- (3-nitro fenil) Perimidin

Şekil 3.2. (devam) TA98 ve TA 100 suşlarının metabolik aktivasyon varlığında (S<sup>9</sup> lu) kimyasal test maddeleriyle verdiği doz cevap eğriler



**7.Madde:** 2-(4-kloro fenil) Perimidin



**8.Madde:** 2-(3,4 metilen dioksifenil) Perimidin

Şekil 3.2. TA98 ve TA 100 suşlarının metabolik aktivasyon varlığında (S<sup>9</sup> lu) kimyasal maddeleriyle verdiği doz cevap eğrileri

#### 4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada sekiz ayrı Perimidin türevinin mutajenik aktiviteleri *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 mutant suşları kullanılarak Ames/ *Salmonella* / Mikrozom testiyle araştırıldı. Deneyler her madde için 100 µg/ plak, 10 µg/ plak, 1 µg/ plak, 0.1 µg/ plak ve 0.01 µg/ plak olmak üzere beş dozda yapıldı. 100 µg / plak üzerindeki dozlar bakteriler için toksik etki gösterdiğinden kullanılmamıştır. Sonuçlar, bulgular kısmında çizelge ve grafikler halinde verilmiştir. Pozitif mutajen olarak S9' suz deneyde TA 98 için 4-nitrofenilendiamin, TA 100 için sodyum azid, S9' lu deneyde ise her iki suş için de 2- Aminoflourene kullanıldı. Çizelge 2.1.' de görüldüğü gibi test edilen bileşiklere sıra numarası verilmiştir. Tezin bundan sonra kısmında perimidin türevlerinin açık kimyasal isimleri yerine çizelgede verilen sıra numaraları kullanılacaktır.

Bu çalışmamızda CRF reseptörü (kortikotropin serbest bırakma reseptörü) üzerinde etkili olan sentezlenmiş yeni perimidin bileşiklerinin aktiviteleri Ames/ *Salmonella*/ Mikrozom testi yoluyla araştırılmıştır. Perimidin ayrıca antitümör, sitotoksik ve anorektik aktivitelerine bağlı olarak önemlidir ve ilaç imalatında kullanılmaları düşünülmektedir. Bu nedenle, bileşiklerin mutajenite tespitleri, bu ham materyalin kullanımından önce önemli bir aşamadır.

Genel bir tarzda maddeler toksik etkili olarak bulunmuşlardır. Bu nedenle mutajeniteleri toksisiteleri yoluyla maskenebilir. Perimidin bileşiğinin genel yapısında aromatik halkalar bulunur.

1. ve 2. Madde TA 98 ve TA 100' de metabolik aktivasyonun olması ve olmaması durumlarında mutajenik değildir. Ancak S9' un yokluğunda bu maddeler TA 100' de toksik etkiler göstermişlerdir.

3. maddenin TA 98' de S9' un yokluğunda 10 µg/ plak dozunda standart sapma değeri 0.02, TA 100'de ise metabolik aktivasyon varlığında 0.01 µg/ plak dozunda da standart sapma değeri 0.04 elde edilmiştir. P değeri  $p \leq 0.05$ ' den küçük olduğu için 3. Maddenin bu dozları anlamlı sonuç vermiştir yani mutajen

bulunmuştur. TA 98' de S9' un yokluğunda çerçeve kayması (frame- shift) mutasyonuna, TA 100' de ise S9 varlığında ve de yokluğunda baz çifti değişimi (base-pair) mutasyonuna neden olmuştur.

Bir -OH grubu ile aromatik halkaya sahip olan 4. Madde S9' un varlığında ve yokluğunda toksiktir. TA 98' de S9' un yokluğunda 1 µg/ plak dozunda standart sapma değeri 0.01, TA 100' de ise S9'un varlığında 0.01 µg/ plak dozunda standart sapma değeri 0,03 elde edilmiştir. 4. maddenin bu dozlarının standart sapma değeri  $p \leq 0.05$ ' den küçük olduğu için mutajen bulunmuştur.

Aromatik R grubunda bir -OH grubu bulunan 5. Madde ise TA 98' de S9' un yokluğunda 100 µg/ plak ve 0.1 µg/ plak dozunda standart sapma değeri 0.03, S9'un varlığında 100 µg/ plak dozunda standart sapma değeri 0.00 bulunmuştur. TA 100'de 0.1 µg/plak dozunda standart sapma değeri 0.04 bulunmuştur. P değeri  $p \leq 0.05$ ' den küçük olduğu için bu dozlarda anlamlı yani mutajendir.

Aromatik R grubunda -NO<sub>2</sub> bulunan 6. Madde S9' un yokluğunda TA 100 için toksiktir. TA 98 için ise S9' un varlığında toksik bulunmuştur. Sonuçlarımıza göre, TA 98' de S9' un yokluğunda 1 µg/ plak dozunda standart sapma değeri 0.01, 0.1 µg/ plak dozunda 0.05' dir. S9' un varlığında ise 1 µg/ plak dozunda standart sapma değeri 0.04, 0.1 µg/ plak dozunda 0,03 bulunmuştur. TA 100' de S9' un yokluğunda standart sapma değeri 0,02'dir. P değeri  $p \leq 0,05$  olduğundan bu dozlarda 6. madde mutajen bulunmuştur.

7. Madde S9 varlığında her iki suş için de toksik bulunmuştur. TA 100 için mutajen değildir. Sadece TA 98' de S9' un varlığında 0.1 µg/ plak dozunda p değeri 0.03, 0.01 µg/ plak dozunda ise 0.02 bulunmuştur. Bu nedenle TA 98' in b bu dozlarında  $p \leq 0,05$  olduğu için mutajendir.

8. Madde de TA 100' deki bir dozu için revertantların sayısında, S9 yokluğunda önemli bir fark vardır. Maddenin toksiklik durumu TA 100' de S9 varlığında görülmüştür. TA 98'de S9' un yokluğunda 0.01 µg/plak dozunda standart sapma değeri 0.02, S9 varlığında ise 100 µg/ plak ve 0.1 µg/ plak dozunda da 0.02 bulunmuştur. TA 100' de S9' un varlığında p değeri 100µg/ plak

ve 0,01 µg/ plak dozlarında 0.03, 0.1 µg/ plak dozunda ise 0,04 bulunmuştur. Bu maddenin bu dozların da  $p \leq 0,05$  olduğu için sonuçlar anlamlıdır yani mutajendir.

Kullandığımız test maddelerinin sitotoksik etkilerinin MTT metoduyla incelendiği bir çalışmada; 1. ve 2. maddenin yüksek miktarda toksisite gösterdiği, 3., 4. ve 5. maddelerin az oranda toksik bulunduğu ve substituent bakımından benzerlik gösteren bu üç bileşiğin toksik etkilerinin hidroksil grubuna ve bu grubun fenil yapısı üzerindeki pozisyonuna bağlı olarak değiştiği söylenmiştir. 6. madde de yüksek oranda sitotoksik etki gösterdiği ve bu etki maddenin taşıdığı nitro grubuna bağlanmıştır. 7. maddenin toksisitesi ise klor iyonuna bağlı olarak değiştiği savunulmaktadır. 8. maddenin de yüksek toksisite gösterdiği vurgulanmıştır ve ayrıca bu çalışmada 4. ve 8. maddenin toksisiteleri MTT yöntemiyle saptandıktan sonra, maddelerin antikanser etkileri kolorimetrik immunotest yöntemiyle de araştırılmıştır. Bunun sonucunda 4. maddenin kanserli hücrelerin DNA sentezini baskılayıcı (inhibisyon) [109,110] etkiye sahip olduğu bulunmuş, 7. maddenin ise normal hücrelerde de inhibisyona neden olduğundan kanserli hücelere spesifik bir etkiye sahip olduğu söylenememiştir [113].

Sonuçlarımız bu araştırmayla benzerlik göstermektedir. Bütün maddelerimiz toksik etkili bulunmuştur. 1. ve 2. madde mutajen değildir. Özellikle 2. madde de bulunan metil grubu bilinen bir mekanizmayla alkilleyici ajan olarak DNA'yı etkileme yoluna gidebilmektedir. Metil grubu, halkayı etkinleştirici ve orto- para konumundaki halkaya diğer molekülleri bağlayıcı rol oynar. Metil grubu daha çok hidrofobik karakterde olduğundan etkileşimde de bu yönde görev yapar [129,130,134]. Bu nedenle bu maddelerin mutajenitelerinin toksisiteleri yoluyla maskelendiği düşünülmektedir.

Substituent bakımından benzerlik gösteren 3., 4. ve 5. maddelerin mutajenliğini yapılarında bulunan fenil gruplarına bağlayabiliriz. Çünkü fenil gruplarının zayıf mutajenik potansiyele sahip olduğu bilinmektedir [131].

Aromatik R grubunda - NO<sub>2</sub> bulunan 6. maddenin mutajenliği ise taşıdığı - NO<sub>2</sub> grubuna bağlanmaktadır. Hrelia ve arkadaşları 1998'de [103] nitro grubu taşıyan bileşiklerin mutajenik aktivitelerini açıklamışlardır. NO<sub>2</sub> grubu (nitro) elektron çeken bir gruptur ve rahatlıkla elektron bağlayan özelliği ile kimyasal

olarak aktiftir [132]. Schuetzhe ve arkadaşları [133] tarafından 1985'de yapılan bir çalışmada da, poliaromatik hidrokarbonlara bağlı hidroksi nitro gruplarının mutajenik aktivitesi Ames testi ile gösterilmiştir. Biz de bu bulgular ışığında -NO<sub>2</sub> taşıyan 6. maddenin ve hidroksi taşıyan 4. ve 5. maddenin mutajenik aktivitesini bu gruplara bağlayabiliriz.

Ames testi birçok kimyasalın mutajenik aktivitesinin tespitinde kullanılmaktadır. Örneğin; yapılan bir çalışmada, ilaç ön maddesi olarak sentezlenmiş olan on farklı 9- aril substitue fenantren türevi Ames testi kullanılarak *Salmonella typhimurim* TA 98 ve TA 100 suşları yardımı ile mutajenik potansiyelleri açısından test edilmiş ve 9- (5-nitro-1H -benzimidazol-2-il) fenantren bileşiği mutajenik bulunmuştur [114]

Kimyasallarla yapılan diğer bir çalışmada ilaç ham maddesi olarak kullanılması amaçlanan 2, 4, 5 tri- fenil imidazol ve dokuz türevinin Ames testi kullanılarak TA 98 ve TA 100 suşları yardımıyla mutajenik aktiviteleri tespit edilmiştir. Test bileşenleri TA 98 suşunda daha anlamlı sonuçlar vermiş, buna göre bileşenlerinin çerçeve kayması şeklinde direkt mutajenik etkili olduğu saptanmıştır [115].

Yine Brezilya' da yaygın olarak kullanılan ilaçların (*Sambucus australis*, *Bauhnea forficata* ve *Mimosa bimucromata*) sulu özütleri yardımıyla Ames testiyle mutajenik aktiviteleri incelenmiştir. Özütlerin metabolizasyondan sonra çerçeve kayması mutajenitesi gösterdiği saptanmıştır. *M. bimucromata*, TA 100 suşunda pozitif sonuçlar vermiştir. *B. forficata*, metabolizasyondan sonra TA 102 suşunda mutajenik aktivite göstermiştir. Özütlerde tanin ve flavanoidlerin bulunuşunun pozitif mutajenik aktivite ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür [116].

Ames test sistemi, kimyasal maddeler dışında hava, su, toprak kirlenmesine sebep olan karmaşık maddelerin mutajenitelerini araştırmak için de kullanılmaktadır. Bir çalışmada; Eskişehir Porsuk Nehri' nin değişik örnekleme istasyonlarından alınan su örnekleri Ames test sistemi ile TA 98 ve TA100 suşları kullanılarak mutajenliği test edilmiştir. Su örnekleri nonkonsantre olarak test edilmesinin yanı sıra XAD- 4 ve XAD- 16 kolonları kullanılarak ekstre edilmiştir. XAD-4 ekstelerinde TA 98 suşunda iki istasyonda mutajenite saptanmıştır [117].

İtalya'da da yapılan benzer bir çalışmada ise Po Nehri boyunca kirlenmiş kısımlardaki mutajenite ve genotoksisite Ames test ve biyomarker olarak kullanılan balıklar ile araştırılmıştır [118].

Çek Cumhuriyeti'nde ise, kentsel alanlarda havada bulunan kirleticilerin genotoksisiteleri Ames testi ile ortaya konmuştur [119]. Almanya'da yapılan bir çalışmada ise toprak mutajenlerinin aynı zamanda havada bulunan mutajenler olduğu belirlenmiştir [120].

Bunların dışında bazı hastalıklarda örneğin, insanlarda gastrik hastalıklarda, gastrik sıvıların mutajenik ve klastojenik aktivitesi Ames test kullanılarak belirlenmiştir [121]. Yiyecek maddelerinde bulunan mutajenik maddelerin araştırılması yine Ames testi ile yapılmaktadır. Pişirilmiş hamburgerde oluşan maddelerin mutajenitesinin araştırıldığı çalışma Ames testiyle yapılmıştır [122].

Tıp, eczacılık ve kozmetik alanlarında geliştirilen kimyasal maddelerin her hangi bir ilaç yapımında kullanılmadan önce mutlaka mutajenik özelliklerinin bilinmesi gerekmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) bunu zorunlu kılmıştır [4,123]. Bu amaçla bir çok kuruluş, çeşitli kimyasalları, farklı test yöntemleriyle test etmektedir [7, 1, 111, 112, 123].

İnsan sağlığı ile ilgili olarak geliştirilmiş kimyasalların mutajenik etkilerinin sadece tek bir test yöntemiyle test edilmesi yeterli olmamaktadır. Çünkü farklı test yöntemleri ya da farklı organizmalar kullanılarak yapılan testler farklı sonuçlar verebilmektedir [71, 124].

Yaptığımız çalışma bu maddelerin mutajenitesi için bir sonuç tespit etmede yeterli değilse de, devam eden deneyler için ilk basamaktır.



## KAYNAKLAR

- [1] DEBNATH, A. K., COMPADRE, R. L., DEBNATH, G., SHUSTERMAN, A. J. ve HANSCH, G., *Strure Activity Relationship of Mutagenic Aromatic and Hetemaromatik Nitro compounds. Correlation with Moleculer orbital Energies and Hydrophobicity*, Journal of Medicinal Chemistry, **34 (2)**, 786- 797, (1991)
- [2] BAĞCI, H., *Yaz Okulu Moleküler Biyoloji Ders Notları*, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, 25-55, (1985)
- [3] FORMAN, D. ve AMES, B. *The Ames Test and the causes of canser*, Reprinted from the British Medical Journal, **303**, 428- 429, (1991)
- [4] *Review of potantially Harmful substances carcinogens, Joint Group of Experts on the secientific Aspects of Marine Polultion (Gesamp.)*, World Healt Organization, Resports and Studies, **46**, Genava, (1991)
- [5] WYSZYNSKA, K. ve LIRO, W.C., *The use of cytogenetic tests for evaluation of mutagenic properties of selected Dyes Applied in Textile and cosmetic Industry*, Genetica Polonica, **32 (3)**, (1991)
- [6] MARON, D.R. ve AMES, B.N., *Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity test*, Mutat. Res., **113**, 173-215, (1983)
- [7] VIJAYALAXAMI, R.R. ve TICE, G.H.S., *Assesment of radiotion-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique*, Mutat. Res., **271**, 243- 252, (1992)
- [8] VURAL, N., *Toksikoloji*, Ankara Üniversitesi Ecz. Fak. Yayınları, **56**, Ankara, 32- 81, (1984)
- [9] DÖKMECİ, I., *Akut Zehirlenmelerinde Tanı ve Tedavi*, Toksikoloji, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 547- 588, (1994)
- [10] PAI, C.A, *Foundation of genetics. Ascience for society*, Keffort press, Singapur, (1985)
- [11] SALEH, K., *Mikronükleus Testi ile bazı kimyasal maddelerin ve çevre kirletcilerin neden olduğu klastojenik etkilerin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, (1997)

- [12] SINGER, B. ve GERUNBEGGER, D., *Molecular Biology of Mutagenesis and carcinogenesis*, **335**, (1994)
- [13] NAKANISHI, Y., CHEN, S., INUTSUKA, S., MA, Y., JIANG, X., HARA, N., SERA, N., ve TOKIWA, H., *Possible role of in door environment and coal combustion emission in lung carcinogenesis in Fuyuan country, China*, *Neoplasma*, **44**, 69-72, (1997)
- [14] MIELYNSKA, D., BRASZCYNKA, Z., SIWINSKA, E., SMOLIK, E., BUBAK, A. ve SOKAL, J.A., *Exposure of coke-oven Workers to polycyclic aromatic hydrocarbons based on biological monitoring results*, *Am-Ind-Hyg-Assoc*, **58 (9)** 661-6, (1997)
- [15] MURRAY, R.K., MAYES, P.A, GRANNER, D.D.K. ve RODWELL, V.W., *Haper'in Biyokimyası*, Çev. Gülriz Menteş, Barış Kitabevi, İstanbul, 811- 917, (1993)
- [16] TEMİZKAN, G.O., *Moleküler Genetik*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, 281, (1996)
- [17] AKMAN, M., *Bakteri Genetiği*, Cumhuriyet Üniversitesi Yayını, 2. Baskı, Sivas (1983)
- [18] DEMİRSOY, A., *Yaşamın Temel Kuralları/Genel Biyoloji*, Cilt 1, Kısım 1, Ankara, (1992)
- [19] BİLGE, E., *Genetik*, Ar Yayın Dağıtım, No.4, İstanbul, 220- 231, (1981)
- [20] ŞAHİN, Y., *Genel Biyoloji II.*, Bilim Teknik Yayınevi, 334- 349, (1995)
- [21] TORTORO, F.C., *Microbiology in Intraduction*, Fourth Edition, 207-215, (1992)
- [22] ERKAN, S., *Moleküler Biyoloji*, Bornova- İzmir, (1992)
- [23] STRACHAN, T. ve READ, A.P., *Human Molecular Genetics*, , Bios Scientific Publishers Limited, (1996)
- [24] GRIFFITHS, A.J.F., MILLER, J.H, SUZUKI, D.T., LEWONTIN, R.C. ve GELBART, W.M, *An introduction to genetic analysis*, W.H. freeman and company Newyork, USA, (1996)

- [25] MONARCA, S., FERETTI, D., COLLIVINARELLI, C., GUZZELLA, L., BERTANZA, G. ve DEDRAZZANI, R., *The Influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of Urban Wastewater*, Water Research, **34 (17)**, 4261-4269, (2000)
- [26] THERMAN, E., *Human Chromosomes Structure behavior effects*, Second Edition, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, Tokya, (1986)
- [27] RUSSELL, P.J., *Genetics*, The Benjamin, Cummings, Publishing company, Inc., Canada, USA, (1998)
- [28] TATLI, A., *Evrin ve Yaratılış*, Damla Matbaacılık, Konya, 95- 107, (1992)
- [29] BAŞARAN, N., *Tıbbi Genetik*, Anadolu Üniversitesi Basımevi, Eskişehir, 152-168, (1993)
- [30] DİRİL, N., DURUSOY, M., ÖKSÜZOĞLU, E., ÖZTÜRK, K., KARAGÖZ, E. ve KIRTILOĞLU, E., *Kısa zamanlı Test sistemleri*, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Yaz Okulu Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri Ders Notları, Ankara, (1997)
- [31] KLUG, W.S. ve CUMMINGS, M.R., *Concept of Genetics*, 6 th Edition, Pretince Hall 0-13-081626-4, (2000), Çev. ÖNER, C., *Genetik Kavramlar*, Palme Yayıncılık, 816, (2002)
- [32] YENSON, M., *İnsan Biyokimyası*, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Rektörlük, Sermet Matbaası, Kırklareli, No: 2819, 766- 771 (1984)
- [33] JARVIS, G. ve MC CREARY, R.D., *Response of  $K_e$  Test to NCI/NTP-Screaned Chemicals, Non-genotoxic carcinoyens and genotoxic non-carcinogens*, carcinogenesis, **II (10)**, 1811-1818, (1990)
- [34] JOSEPHY, P.D., GRUZ, P. ve NOHMI, T., *Recent advences in the construction of Bacterial genotoxicity Assays*, Mutat. Res., **386**, 1-23, (1997)
- [35] JOHNSON, B.T., *Genotoxicity testing With fish hepatic S9 for Evaluation of complex mixtures in the Aguatic Environment: The use of chanel catfish as a Model Aquatic Toxicology*, **27**, 293-314, (1983)

- [36] ARINÇ, E. ve ŞEN, A., *Effect of in vivo Benzo (a) pyrene Treatment on Liver Microsomal Mixed-Function Oxidase Activities of Gilthead Seabream (Spararurus Aurata) comp.*, Biochem, Physiol, **107 C (3)** ,405-414, (1994)
- [37] WATSON, J.D., GILMAN, M., WITOWSKI, J. ve ZOLLER, M., *Recombinant DNA*, Second Edition, (1997)
- [38] ROLLAS, S., *İlaçların Metabolizması (Biyotransformasyon)*, Marmara Üniversitesi Yayını, **525**, İstanbul, (1992)
- [39] KAYAALP, O., *Tibbi farmakoloji*, Hacettepe Taş Yayınları, Ankara, (1995)
- [40] BRITVIC, S. and KURULEC, B., *Selective Activation of Corcinogenic Aromatic Amines to bacterial Mutagens in the Marine Mussel Mytilus Galloprovincialis*, Comp., Biochem, Physiol, **85 c (1)**, 111-114, (1986)
- [41] WAGNER, E.D., WASILEWSKA, A.C., CONNOLY, S. and LEWA, M.J. *Mutagenic analysis of 2, 3- diaminophenazine in Salmonella strains expressing different Levels of o-acetyl transferase with and without plannt and mamalian activation*, Mutat. Res., 372, 65-74, (1996)
- [42] GATEHOUSE, D.G, ROWLAND, I.R., WILCOX, P., CALLANDER,R.D. ve FOSTER, R., *Bacterial mutation assay, Basic Mutagenicity Ukems recommended procedures* (Ed: Kirkland, D.J.), The Bath Press, Avon, Great Britain, UK (1990)
- [43] GÖZÜKARA, M.E., *Biyokimya*, Ofset Repromat Ltd. Şti., Ankara, 918-922, (1990)
- [44] SHIMADA, T., HAYES, C.L., YAMAZAKI, H., AMIN, S. HECHT, S.S., GUENGERICH, F.P. ve SUTTER, T.R., *Activation of chemically, diverse procarcinogens by human cytochrome P-45001B1*, Cancer Res., **56**, 2979-2984, (1996)
- [45] GÜVEN, K., *Biyokimyasal ve Moleküler Toksikoloji*, Dicle Üniversitesi Basımevi, Diyarbakır,(1999)
- [46] PLUTH, M.J., RAMSEY, M.J.ve TUCKER, J.D., *Role of maternal exposures and new born genotypes on newborn chromosome aberration frequencies*, Mutat. Res., **465**, 101- 111, (2000)

- [47] ANDERS, M.W. and DEKANT, W., *Conjugation dependent carcinogenicity and toxicity of foreign compounds*, *Ad V. Pharmacol*, **27**, 511- 519, (1994)
- [48] BERNARDINI, S. PELIN, K., PELTONEN, K., JARVENTAUS, H., **HIRVONEN**, A., NEAGU, C., SORSA, M. and NORPPA, H., *Induction of sister chromatid exchange by 3,4- epoxybutane- 1, 2-diol in cultured human lymphocytes of different GSTT1 and GSTM1 genotypes*, *Mutat. Res.*, **413**, 169-175, (1998)
- [49] SCHNEIDER, M., QUISTAD, G.B. and CASIDA, J.E., *Glutathione activation of chloropicrin in the salmonella mutagenicity test*, *Mutat. Res.*, **439**, 233-238, (1999)
- [50] BARQUINERO, J.F., BARRPRIOS, L., CABALLIN, M.R., MIRO, R. ve RIBAS, A., *Cytogenetic analysis of lymphocytes from hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation*, *Mutat. Res.*, **286**, 275-279, (1993)
- [51] FENDER, H., ve WOLF, G., *Cytogenetic investigations in employees from waste disposal sites*, *Toxicology Letters*, **96**, 149- 154, (1998)
- [52] LAZUTKA, J.R., LEKEVICIUS, R., DEDONYTE, V., MACIULEVICIVTEGERVERS, L., MIERRAUSKIENE, J., RUDAITIENE, S. ve SLAPSYTE, G. *Chromosomal, aberrations and sister chromatid exchanges in Lithuanian populations: effects of occupational and environmental exposures*, *Mutat. Res.*, **445**, 225-239, (1999)
- [53] SRAM, R.J., ROSSNER, P., PELTONEN, K., PODRAZILOVA, K., MRACKOVA, G., DEMOPOULOS, N.A., STEPHANOU, G., VLACHODI MITROPAULOS, D., DARROUDI, F. ve TATES, A.D., *Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cells with high frequency of SCE, micronuclei and comet assay parameter in 1, 3-butadiene-exposed workers*, *Mutat. Res.*, **419**, 145- 154, (1998)

- [54] ALBERTINI, R.J., ANDERSON, D., DOUGLAS, G.R, HUGMAR, L., HEMMINKI, K., MERLO, F., NATARAJAN, A.T, NORPPA, H.,SUHAKER, D.E.G. TICE, R., WATERS, M.D. ve AITIO, A., *IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans*, Mutat. Res., **463**, 11-172, (2000)
- [55] DESESSO, JM., LAVIN, A.L, HSIA, S.M. ve MAVIS, R.D, *Assesment of the corcinogenicity associated with oral exposures to hydrogen peroxide*, Food and chemical Toxicology, **38**, 1021- 1041, (2000)
- [56] TOPAKTAŞ, M. ve SPEID, G., *Sister chromatid exchange (SCE) testinin mutajenite ve kan serojenitenin belirlenmesinde kullanılması*, Ç.Ü. Sağlık Bil. Der. **5 (1,2,3)**, 73- 84, (1990)
- [57] SURRALLES, J., FALCK, G. ve NORPPA, H., *In vivo cytogenetic damage revealed by Fish analysis of cadmium in G<sub>0</sub> and S phase of their cell cycles*, Mutat, Res., Gen., Tox. Environ, Mut., **412**, 109- 114, (1998)
- [58] 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)
- [59] BHUNYA, S.P. ve JENA, G.B., *Studies on the Genotoxicity of Monocrotophosphat and organophosphate Insecticide, in the chick in vivo Test System.*, Mutat. Res., **293**, 231- 239, (1993)
- [60] BAKALE, G. ve MC CREARY , R.D., *Response of K<sub>e</sub> Test to NCI/ NTP-Screaned Chemicals. Non-Genotoxic carcinogens and genotoxic Non-carcinogenens.*, **11 (10)**, 1811- 1818, (1990)
- [61] CHETALAT, A. A., ALBERTINI, S. ve GOCKE, E., *The Photomutagenicity of Fluroquindones in Test for Gene Mutation, Chromosomal Abbeation, Gene Conversiyon and DNA Breakage (Coment Assay)*, Mutagen, **5 (11)**, 497- 504, (1996)
- [62] KASAMATSU, T., KOHDA, K. ve KAWAZOA, Y., *Comparison of chemically Induced DNA Breakage in cellular and subcellular Systems using the comet assay*, Mutat, Res., **389**, 1-6, (1996)

- [63] MAJONE, F., BURENTTI, R., FUMAGALLI, O., GABRIELLA, M. ve LEVIS, A.G., *Induction of micronuclei by mitomycin C and colchicine in the marine Mussel mytilus galloprovincialis*, Mutat. Res., **244**, 147- 151, (1990)
- [64] 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., ve VANNIER, B., *In vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay*, Mutat. Res., **312**, 293- 304, (1994)
- [65] ZHULEVA, L.Y. ve DUBININ, N.P., *Use of the Micronucleus test for ecological monitoring in astrachan oblast.*, FEHETNKA, **30 (7)**, 999-1004, (1994)
- [66] HEDDLE, L.A., *A rapid in vivo test for Chromosomal damage*, Mutat. Res., **18**, 187-190, (1973)
- [67] OSTLING, O. ve JOHANSON, K.J., *Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **123**, 291- 298, (1984)
- [68] SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R. ve SCHNEIDER, E.L., *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*, Experimental cell Research, **175**, 184- 191, (1988)
- [69] ALBANESI, T., POLANI, S., COZZI, R. ve PERTICONE, P., *DNA Strand methylation and sister chromatid exchanges in mammalian cells in vitro*, Mutat. Res., **429**, 239- 48 (1998)
- [70] GALLI, A. ve SCHIESTL, R.S., *Effects of Salmonella Assay Negative and Positive Carcinogens on Intrachromosomal recombination in G1-Arrested Yeast Cells*, Mutat. Res., **370**, 209- 221, (1996)
- [71] LEE, H., BIAN, S.S. ve CHEN, Y.L., *Genotoxicity of 1, 3- dithiane and 1,4-dithiane in the CHO/SEC Assay and the Salmonella / Mikrosomal Test*, Mutat. Res., **312**, 213- 218, (1994)

- [72] JARVIS, A.S., HONEYCUTT, M.E, MC FARLAND, V.A. BULICH, A.A. ve BOUNDS, H.C., *A comparison of the Ames Assay and Mutatox in Assessing the Mutagenic potential of contaminated Dredged Sediment*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **33**, 193- 200, (1996)
- [73] QUILLARDET, P. ve HOFNUNG, M., *The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures*, *Mutat. Res.*, **147**, 65-78, (1985)
- [74] ODA, Y., MAKAMURA, S., OKI, I., KATO, T. ve SHINAGAUSA, H., *Evaluation of the new system (UMU test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens*, *Mut. Res.*, **147**, 219-229, (1985)
- [75] **WALKER, G.C.**, *Inducible DNA repair systems*, *Ann. Rev. Biochem*, **54**, 425-457 (1985)
- [76] FRIEDBERG, E.C., WALKER, G.C. ve SIEDE, W., *DNA repair and mutagenesis*, ASM Press, Washington, D.C., USA, (1995)
- [77] SCHAAPER, R.M. ve DUNN, R.L., *Spontaneous mutation in the Escherichia coli lac I gene*, *Genetics*, **129**, 317- 329, (1991)
- [78] HERA, C. ve PUEYO, C., *Response of the L- Arabinose for word mutation Assay Salmonella typhimurium to frame shift- type mutagens*, *Mutat Rest.*, **203**, 39-45, (1988)
- [79] JUNG, R., ENGELHART, G., HERBOLT, B., JÖCKH, R. ve MULLER, W., *Collaborative study of mutagenicity With salmonella typhimurium TA 102*, *Mutat. Res.*, **278**, 265- 270, (1992)
- [80] ALMACA, I.E., *Fundamentals of Mikrobiology*, Third Edition, 175-185, (1991)
- [81] KUSAMRAN, W.R., WAKABAYASHI, K, OGARI, I., TEPSUWAN, A., NAGAO, M, ve SUGIMURA, T., *Mutagenicities of Bangkok and Tokyo River Waters*, *Mutat, Res*, **325**, 99-104, (1994)
- [82] FRANCANZO, M.N., LEONE, R., BRUNELLO, F., MONOSTRA, C., TEZZA, F. Ve STORTI, P.W., *Mutagenetic activity in Wastewater concentrates from Dye Plants*, *Mutat. Res.*, 91-95, (1992)



- [83] SMITH, C.J., MC KARNES, SC., DAVIS, R.A., LIVINGSTON, S.D. BOMBICK, B.R., AVALOS, J.T., MORGAN, W.T. ve DOOLITTLE, D.J., *Human Urine Mutagenicity study comparing cigarettes Which burn or primarily heat tobacco*, Mutat. Res., **361**, 1-9, (1996)
- [84] WATANABE, K., SAKAMOTO, K. ve SASAKI, T., *Comparisons Chemically-Induced mutagenicity among four bacterial strains, Salmonella typhimurium TA 102 and TA 2628 and E.Coli WP2/ PKM 101 and WP2A/ pKM 101: Collaborative Study I.*, Mutat. Res. , **361**, 143-155, (1996)
- [85] DURUSOY, M. ve KAMBUR, S., *The Application of the UMU test system for screening mutagenicity of surface water*, Türk Biyokimya Dergisi, **28 (1)**, 3-7, (2003)
- [86] CERNA, M., PASTORKOVEA, A., SMID, J., DOBIAS, L. ve ROSSNER P., *The Use of YG Bacterial Tester Strains for monitoring of Drinking water mutagenicity*, Toxicology Letters, **96**, 335- 339, (1998)
- [87] NAKAMURA, K., VENO, H. ve SAYATO, Y., *Evaluation of mutagenicity of municipal River Water concentrated using XAD Resin Column Method*, Water Sciences Technology, **25 (11)**, 293- 299, (1992)
- [88] HAACK. T., ERDINGER, L. and BOCHE, G., *Mutagenicity in Salmonella typhimurium TA 98 and TA 100 of nitrosamine and respective hydroxylamine compounds.*, Mutat Res., **491**, 183-193, (2001)
- [89] HASS, B.S., HEFLICH, R.H., SHADDOCK, J.G. ve CASCIANA, D.A., *Comparison of mutagenicities in a Salmonella reversion assay mediated by uninduced hepatocytes and hepatocytes from rats pretreated for 1 or 5 days With Aroclor 1254*, Environmental Mutagenesis, **7**, 391-403, (1986)
- [90] VRIJSEN, R., MICHOTTE, Y. ve BOEYE, A., *Metabolic activation of quercetin mutagenicity*, Mutat. Res., **232**, 243- 248, (1990)
- [91] SPIECHOWICZ, E.J., BORANSKI, B., DZIUBALTOWSKA, E., WYSZYNSKA, K., PRZYBOJEWSKA, B., LIRO, W.C. ve PRZONDO, J., *Genotoxicity assessment of Rokanol B<sub>2</sub> and Rokamid R<sub>1</sub>*, International Journal of occupational Medicine and Environmental Health, **7 (2)**, 51-57, (1994)

- [92] ABE, A. ve 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)
- [93] GRIFOLL, M., SOLANAS, A.M. ve BAYONA, J.M., *Biossay-Directed Chemical Char acterizasyon of Genotoxic agents in the Dissolved and particulate Water Phases of the Besos and Llobrogat River* (Barcelona, Spain), Arch. Environ. Contam. Toxicol., **23**, 19- 25, (1992)
- [94] KURELEC, B. ve KRCA, S., *Glucuronines in Mussel mytilus galloprovincialis as a possible Biomontior of Environmental pollutants*, Mutat. Res., **300**, 265- 271, (1993)
- [95] BERNACCHI, F., PONZANELLI, I., BARALE, R. ve LOPRIENO, N., *Mutagennic Activity of some coal-Derived Humic compounds Evaluated by the Ames Test.*, Mutat. Res., **369**, 107- 112, (1996)
- [96] ALZUET, P.R., GASPES, E. ve RONCO, A.E., *Mutagenicity of Environmental Samples form on Industrialized Area of the Rio De La Plata Estuary Using the Salmonella/Microsomal Assay.*, Environ, Toxicol, water Quaility, **11**, 231-236, (1996)
- [97] YAVARI, I., ADIB, M.,MOGHADDAM, J.F. ve BIJANZ ADEH, R.H. ,*Vinyiphosphenium salt metiated simple synthesis of 7-oxo-7 H- pyride [1, 2, 3 -cd] perimidine derivates. Dynamic NMR spectroscopic study of protropic tautomerism in ethyl 1 H- perimidine- 2- carboxylate*, Tetrahedran, **58**, 6901- 6906, (2002)
- [98] SACHS, F. , *Production in the peri position of the naphtalene series*, 1. Univ Berlin Ann. , **365**, 53-134, I. 3: 1870<sup>3</sup>-1870<sup>8</sup>
- [99] WAGNER, E.C. , *Some reactions of amidines as annano carboxylic acids or esters*, J.Org. Chem. 5, 133-41. 34:3275<sup>7</sup>, (1940)
- [100] CRISTOPH, J. , GRUDMANN, ALPRED, KREUTZBERGER, *Reactions of s- triazine*, ( to olin mathieson chemical corp.) U. S.2, 841, 585, July 1, 52: 2021h, (1958)

- [101] BARCHET, P.H. , STAHL, K.W. , MERZ, *Cyclization of (ethoxymethylene) malonic ester to perimidine with 1, 8-diaminophthalene.*, (Univ. Freiburg-Br., Ger.) *Naturwissenschaften*, **54(5)**, 115- 16 (Ger), 67:11471p, (1967)
- [102] PERSHIN, G.N., POZHARSKII, A.F., KASHPARON., I.S., BOGDANOVA, N.S., NOITSKAYA, N.A. ve MIKERINA, A.L., *Heterocyclic analogs of pleiadiene. 4. Properties of 2-amino derivatives of perimidine and aceperimidine.*, (Rostov. -na- Donu Univ., Rostov on-Don, USSR) *Khim. –farm. Zh.*, 5-9 (Russ.), 78: 132269p, (1973)
- [103] DRUSVYATSKAYA, S.K., LOPATINA, B.V., BEKHLI, A.F., KROTOV , A.I. ve NIDENOVA, A.S., *Vinyl derivatives of perimidine.*, (Inst. Med. Parazitol. Trop. Med. Im. Martsinovskogo, Moskow, USSR) *Khim-Farm. Zh.*, **10(5)**, 61-5 (Russ), 85: 108599w, (1979)
- [104] ANTONINI, I., POLUCCI, P., COLA, D., FLIPPO, P.G. ve MARTELLI, S., *Farmoco*, **47 (11)**, 1385, (1992)
- [105] HERBERT, J.M., WOODGATE, P.D. ve DENNY, W.A., *J. Med Chem.*, **30 (11)**, 2081, (1987)
- [106] BU, X., DEADY, L.W., FINLAY, G.J., BAGULEY, B.C. ve DENNY, W.A., *J. Med. Chem.*, **44 (12)**, (2004)
- [107] LIU, K.C., CHEN, H.H. ve LIN, Y.O, *Arch. Pharm (Weinheim)*, **316 (8)**, 728, (1983)
- [108] LIU, K.C, CHEN, H.H. ve LEE, L.C., *Arch.,Pharm. (Weinheim)*, **312 (9)**, 776, (1979)
- [109] MATSUMOTO, KEN, (LILLY, ELI, AND.CO.), *Immunopressive agents.*, *Can.* 1,079, 281 (C1, C07, D239/70), 10 Jun 1980, *Us Appl*, 861, 732, 94:307884 S, (1977)
- [110] KURUSOV, L.A., POZHARSKII, A.F. ve KUZ'MENKO, V.V., *Perinaphthylenediamines V. Synthesis of hydrogenated derivatives of 10-dimethylaminobenzo (h) quinoline and quinolino (7,8:7',18') quinolien.*, (Rostov, Univ, Rostov, USSR), *Zh. Ogr. Khim.*, **19 (4)**, 859-64 (Russ), 99: 194907P, (1983)

- [111] LUMBLEY, C.E, PARKINSON, C. ve WALKER, S.R., *An Intenational Appraisal of the minumum duration of chronic animal Toxicity Studies*, Human&Experimental toxicology, **11**, 155- 162, (1992)
- [112] CARIELLO, N.F. ve PIEGORSCH, W.W., *The Ames Test: The two-fold Rulo revisited*, Mutat. Res, **369**, 23-31, (1996)
- [113] GÜLNAZ, D.H.A., *Bazı 2-Substitue perimidin türevlerinn sentezleri, yapı aydınlatmaları, fizikokimyasal parametreleri, sitotoksik ve antikansar etkilerinin araştırılması üzerine çalışmalar*, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, (2003)
- [114] AYDOĞDU, K.F.,*Bazı 9-aril Substitue Fenantren türevlerinin genotoksik etkilerinin Ames testi ve Allium testi ile Araştırılması*, Doktora Tezi, Eskişehir, (2003)
- [115] AYAZ, B., *2, 4, 5 Tri (Süstitüe) fenil imidazol ve Türevlerinin Mutajenik Aktivitesinin Ames/Salmonella/Mikrozom Testi ile Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, (1993)
- [116] BRESOLİN, S. ve VARGAS, V.M.F., *Mutagenic Protencies of Medicinal Plants Screened in the Ames test*, phytotherapy Research ,**7**, 260-262, (1993)
- [117] DİLEK, B., *Porsuk Nehri'nin Genetotoksik Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, (2004)
- [118] VIGANO, L., CAMOIRANO, A., IZZOTTI, A., D'AGOTINI, F., POLESELLO, S., FRANCISCI, C. ve DE FLORASA, S., *Mutagenicity of Sediments along the Po River and genotoxicity biomarkers in fish from polluted areas*, Mutat. Res., **515**, 125-134, (2002)
- [119] CERNA, M., POCHMANOVA, D., PASTOKOVO, A., BENES, I., LENICAK, J., TOPINKA, J. ve BINKOVA, B., *Genotoxicity of urban air poltutants in the Czech Republic Part I. Bacterial Mutagenic Potencies of organic compounds absorbed on PM10 particulates.*, Mutation Research, **469**, 71-82, (2000)

- [120] EDENHARDER, R., ORTSEIFEN, M., KOCH, M. ve WESP, H.F., *Soil Mutagens are airborne Mutagens: Variation of Mutagenic activities induced in Salmonella typhimurium TA 98 and TA100 by organic extracts of agricultural and forest soils in dependence on location and season*, Mutation Research, **472**, 23-26, (2000)
- [121] HRELIA, P., FIMOENARI, C., MAFFEI, F., BRANDI, G., BIASCO, G. ve CANTELLI-FORTI, G., *Mutagenic and clastogenic activity of gastric juice in human gastric diseases*, Mutation Research, **514**, 125-132, (2002)
- [122] KATO, T., MICHIKOSHI, K., MINAWA, Y. ve KILUGAWA, K., *Mutagenicity of cooked hamburger is controlled delicately by reducing sugar content in ground beef*, Mutation Research, **471**, 1-6, (2000)
- [123] *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, **92**, Athens, (1995)
- [124] HAMASAKI, T., SATO, T., NAGASE, H. ve KITO, H., *The genotoxicity of organotin compounds in SOS chromotest and Rec Assay*, Mutat. Res., **280**, 195-203, (1992)
- [125] LUTHIN, D.R., RIBINOVICH, A.K. ve BHUMRALKAR, D.R., , *Bioorg. Med. Chem, Lett.*, **9 (5)**, 795, (1999)
- [126] DAUTZENBERG, F.M., KILPATRICK, G.J., HAUGER, R.L. ve MOREAU, J.L., *Peptides*, **22 (5)**, 753, (2001)
- [127] DAUTZENBERG, F.M., HUBER, G., HIGELIN, J., PY-LANG, G. ve KILPATRICK, G.J., *Neuropharmacology*, **39 (8)**, (2000)
- [128] ZOR, L., *Organik Kimya*, Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayını, **191 (432)**, 188s. (1991)
- [129] ERGENÇ, N., ATEŞ, Ö. ve GÜRSOY, A., *Eczacılar 4 için organik Kimya*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, **3376**, ECZ, Fak. No.150, Acar Matbaacılık, İST., 568, (1985)
- [130] LINSTROMBERG, W. W., *Modern organik Kimya*, çev. Tahsin Uyar, Hacettepe Taş Kitapçılık, Ankara , 345-350, (1983)

- [131] VIKSE, R., KNAPSTAD, A., KLUNGSOYR, L. ve GRIVAS, S., *Mutagenic activity of the metyhl and phenyl derivatives of the food mutagen 2- amino- 3- methyl-imi dazol (4-5-f) Quinoxaline in the Ames test*, Mutat. Res., **298**, 207-214, (1992)
- [132] FESSENDEN, R.J., *Organik Kimya*, Çev. Tahsin Uyar, Güneş Kitabevi, Ankara, 210- 230 (1992)
- [133] SCHUETZLE, D., JENSEN, T.E. ve BALL, J.C., *Polar Polynuclear aromatic hydrocarbon derivatives in extracts of particulates: biological characterization and Techniques for chemical analysis*, Environment International, **11**, 169- 181, (1985)
- [134] KAPLAN, Ç., DİRİL, N., ŞAHİN, S. ve CEHRELİ, M.C., *Mutagenic potentials of bacterial genotoxicity assays*, Mutation Research, **386**, 1-23, (1997)