

**BAZI 9-SÜBSTİTÜE FENANTREN TÜREVLERİNİN
MUTAJENİK AKTİVİTELERİNİN
AMES/SALMONELLA/MİKROZOM TESTİ
İLE ARAŞTIRILMASI**

**Esin ÖZTAŞ
Yüksek Lisans Tezi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Ağustos-2005

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Esin ÖZTAŞ'ın “**Bazı 9-Süstitüe Fenantren Türevlerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames / Salmonella / Mikrozoim Testi ile Araştırılması**” Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi aşğıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

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

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun
.....tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI 9-SÜBSTİTÜE FENANTREN TÜREVLERİNİN MUTAJENİK AKTİVİTELERİNİN AMES / SALMONELLA / MİKROZOM TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

ESİN ÖZTAŞ

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehtap KUTLU
2005, 64 sayfa

Bu çalışmada, ilaç ön maddesi olarak sentezlenmiş olan üç farklı 9 Sübstitüe Fenantren türevleri, Ames / Salmonella / Mikrozom Test yöntemi kullanılarak, *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları yardımı ile mutajenik potansiyelleri açısından test edilmiştir. Bunun için, her iki suş, mikrozomal enzimler içeren metabolik aktivasyon (S9) varlığında ve yokluğunda, her bir test maddesinin beş ayrı dozu ile iki bağımsız deneyle araştırılmıştır. S9 yokluğunda, pozitif kontrol olarak TA 98 için, 4-nitro-o-fenilendiamin (NPD) ve TA 100 için sodyum azid (AZD), S9 varlığında ise, her iki suş için 2-Aminofluorene (2-AF) kullanılmıştır. Negatif kontroller için, dimetil sülfoksit (DMSO) ve spontan kontrol grupları kullanılmıştır. Test sonuçları, yapılan bu iki deneyin ortalaması alınarak, pozitif ve negatif kontrol grupları ile karşılaştırılmış ve değerlendirilmiştir. Bu sonuçlara göre, test maddelerinden, 9-[4,5-di-(4-metoksifenil)-2H-imidazol-2-il]-fenantren' in TA 98 için, S9 yokluğunda mutajenik aktiviteye sahip olduğu, TA 100 için ise, S9 varlığında mutajenik etkiye sahip olduğu bulunmuştur. 9-[2H- benzotiazol-2-il]-fenantren maddesinin, S9 yokluğunda her iki suş için de mutajenik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. 9-[1H-fenantro-(9,10-d)-imidazol-2-il]-fenantren' in ise, TA 100 için mutajen olmadığı ancak, TA 98 için mutajen olduğu tespit edilmiştir. Gözlenen mutajenik etkinin, metabolik aktivasyona bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Ames Test, Fenantren Türevleri, Mutajenite, Metabolik Aktivasyon, Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar

ABSTRACT

Master of Science Thesis

AN INVESTIGATION OF MUTAGENIC ACTIVITIES OF SOME 9- SUBSTITUED-PHENANTHRENE DERIVATIVES WITH AMES/SALMONELLA/MICROSOME TEST

ESİN ÖZTAŞ

Anadolu University
Graduated School of Sciences
Biological Program

Supervisor: Doç. Dr. Mehtap KUTLU
2005, 64 sayfa

In this study, three different 9-substitue phenantrene derivatives that were synthesized to be used as basic matter for drug were tested for mutagenic potency in strains TA 98 and TA 100 of *Salmonella typhimurium* by using Salmonella Mutagenity Test. Therefore, both test strains were tested in the absence or presence of S9 metabolic activation, for five different doses of each test substances in two paralel independent experiments. Results were evaluated by calculating avarage of two experiments. At the absance of S9, 4-nitro-o-fenilendiamine (NPD) was used as a positive control for TA 98, sodyum azid (AZD) was used as a positive control for TA 100. At the presence of S9, (2-AP) 2-Amino-Fluorene was used as a positive control for both test strains. Solvent Dimetyl Sulphoxid (DMSO) and spontane control groups were used as a negative control groups data. So that, 9-[4,5-di-(4-methoxyphenyl)-2H-imidazol-2-il]-phenanthrene was found to be mutagenic for TA 98 in the absence and presence of metabolic activation. It was also mutagenic in TA 100 with metabolic activation. 9[2H-benzothiazole-2-il]-phenanthrene caused frameshift mutagenicity in the absence of metabolic activation. 9-[1H-phenanthro-(9,10-d)-imidazol-2-il]-phenanthrene caused frameshift mutation with and without S9. This compound was non-mutagenic for TA 100. So mutagenic effecet may be depend on the metabolic activation.

Key words: Ames Test, Phenanthrene Derivatives, Mutagenecity, Metabolic Activation, Polisisic Aromatic Hydrocarbons

TEŞEKKÜR

Çalışmamda, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ve tezimin değerlendirilmesindeki katkılarından dolayı danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mehtap KUTLU' ya, bölümün tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Anadolu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Dekanı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet ÖZATA' ya, test edilen kimyasal maddeler konusundaki yardımlarından dolayı Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. İlhan IŞIKDAĞ' a, kendisinden Ames Mutajenite testi' ni öğrendiğim ve bu testin yapılıp, değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Arş. Grv. Gözde AYDOĞAN' a teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmaya başlamamda beni yüreklendiren ve çalışmam boyunca hiçbir zaman desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme de teşekkürlerimi sunarım.

ESİN ÖZTAŞ

Ağustos, 2005

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|---|-------------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | ii |
| TEŞEKKÜR | iii |
| İÇİNDEKİLER | iv |
| ŞEKİL DİZİNİ | vi |
| TABLolar DİZİNİ | viii |
| | |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Kromozom Yapısı..... | 4 |
| 1.2. Mutasyonlar..... | 6 |
| 1.2.1. Kromozom Sayısı Değişimleri (Genom mutasyonları)..... | 6 |
| 1.2.1.1. Euploidi..... | 6 |
| 1.2.1.2. Aneuploidi | 7 |
| 1.2.2. Kromozom Yapısı Değişimleri(Kromozom Mutasyonları)..... | 9 |
| 1.2.2.1. Delesyon..... | 9 |
| 1.2.2.2. Dublikasyon..... | 9 |
| 1.2.2.3. İversiyon..... | 10 |
| 1.2.2.4. Translokasyon..... | 10 |
| 1.2.3. Gen Mutasyonları..... | 10 |
| 1.2.3.1. Gen Mutasyonlarının Sınıflandırılması..... | 10 |
| 1.2.3.2. Mutasyonların Oluşum Şekilleri..... | 12 |
| 1.3. Metabolik Aktivasyon..... | 16 |
| 1.3.1. Mikrozomal Enzimler..... | 17 |
| 1.4. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar ve Fenantrenler..... | 20 |
| 1.4.1. Fenantrenlerin yapısal özellikleri ve aktiviteleri..... | 21 |
| 1.4.2. Fenantrenler ile Yapılan Çalışmalar..... | 22 |
| 1.5. Mutajen ve Kanserojenlerin Saptanmasında Kullanılan Kısa Zamanlı Test Sistemleri..... | 23 |
| 1.5.1. Ames Testi | 24 |
| 1.5.2. Diğer Kısa Zamanlı Test Sistemleri..... | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 2. MATERYAL VE METOD | 26 |
| 2.1. Materyal..... | 26 |
| 2.1.1. Genotoksisitesi Araştırılan Kimyasal Maddeler..... | 27 |
| 2.1.2. Ames Testinde Kullanılan Bakterilerin Genotipik Özellikleri..... | 28 |
| 2.1.3. Ames testinde Kullanılan Kimyasal Maddeler..... | 29 |
| 2.1.4. Ames Testinde Kullanılan Ortamların İçerikleri ve Hazırlanması...30 | |
| 2.2. Metod..... | 37 |
| 2.2.1. Salmonella Suşlarının Kültür ve Master Plaklarının Hazırlanması | 36 |
| 2.2.2. Salmonella Suşlarının Stoklanması ve Stok Kültürlerinin Açılması..... | 36 |
| 2.2.3. Salmonella Suşlarının Kontrol Testlerinin Yapılması..... | 37 |
| 2.2.3.1. Bakterilerin Genotiplerinin Kontrol Edilmesi..... | 37 |
| 2.2.3.2. Sıvı Kültürleri ml' sinde Bakteri Sayısının Belirlenmesi..... | 39 |
| 2.2.4. Memeli Karaciğer Mikrozomlarının Hazırlanışı..... | 39 |
| 2.2.5. Karaciğer S9 Karışımının Hazırlanması..... | 40 |
| 2.2.6. Sitotoksik Etkinin Saptanması..... | 40 |
| 2.2.7. Ames Mutajenite Testi..... | 40 |
| 2.2.7.1. S9' suz (-) Deney..... | 41 |
| 2.2.7.2. S9' lu (+) Deney..... | 41 |
| 2.2.7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi..... | 41 |
| 3. BULGULAR | 43 |
| 3.1. Fenantren' in Üç Ayrı Türevinin, S9 fraksiyonu yokluğunda ve varlığında TA 98 ile verdiği sonuçlar..... | 44 |
| 3.2. Fenantren' in Üç Ayrı Türevinin, S9 fraksiyonu yokluğunda ve varlığında TA 100 ile verdiği sonuçlar..... | 45 |
| 4. TARTIŞMA VE SONUÇ | 52 |
| KAYNAKLAR | 55 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

| | |
|---|----|
| 1.1. Sentromerin yerine göre kromozom tipleri (27)..... | 5 |
| 1.2. Kromozomların yapısı a) dıştan görünüşü b) içten görünüşü (27)..... | 5 |
| 1.3. Nokta ve çerçeve kayması mutasyonlarına analogi olarak üç harfli kelimeden oluşan bir cümlede bir harfin değişmesi, eksilmesi ve katılması etkisi (65)..... | 13 |
| 1.4. Sitokrom P450 tarafından substratın hidroksilasyonu (81)..... | 19 |
| 1.5. Fenantrenin genel yapı formülü | 21 |
| 3.1. <i>S.typhimurium</i> TA 98 suşu ile 9-[4,5-di-(4-metoksifenil)2H-imidazol-2-il]-fenantren bileşiğinin verdiği revertant koloni sayısı..... | 47 |
| 3.2. <i>S.typhimurium</i> TA 98 suşu ile 9-[2H-benzotiazol-2-il]-fenantren bileşiğinin verdiği revertant koloni sayısı..... | 47 |
| 3.3. <i>S.typhimurium</i> TA 98 suşu ile 9-[1H-fenantro-(9,10-d)-imidazol- 2-il]-fenantren bileşiğinin verdiği revertant koloni sayısı..... | 48 |
| 3.4. <i>S.typhimurium</i> TA 100 suşu ile 9-[4,5-di-(4-metoksifenil)-2H-imidazol-2-il] -fenantren bileşiğinin verdiği revertant koloni sayısı..... | 48 |
| 3.5. <i>S.typhimurium</i> TA 100 suşu ile 9-[2H-benzotiazol-2-il]-fenantren bileşiğinin verdiği revertant koloni sayısı..... | 49 |
| 3.6. <i>S.typhimurium</i> TA 100 suşu ile 9-[1H-fenantro-(9,10-d)-imidazol- 2-il]-fenantren bileşiğinin verdiği revertant koloni sayısı..... | 49 |
| 3.7. 9-[4,5-di-(4-metoksifenil)-2H-imidazol-2-il]-fenantren bileşiğinin S9 fraksiyonu yokluğunda TA 98 ve TA 100 suşları üzerindeki DMSO kontrol petriyelerindeki koloni sayısı ile deney grupları petriyelerindeki koloni sayısı arasındaki farkın doza bağlı gösterimi..... | 50 |
| 3.8. 9-[2H-benzotiazol-2-il]-fenantren bileşiğinin S9 fraksiyonu yokluğunda TA 98 ve TA 100 suşları üzerindeki DMSO kontrol petriyelerindeki koloni sayısı ile deney grupları petriyelerindeki koloni sayısı arasındaki farkın doza bağlı gösterimi..... | 50 |

- 3.9.** 9-[1H-fenantro-(9,10-d)-imidazol- 2-il]-fenantren bileşiğinin S9 fraksiyonu yokluğunda TA 98 ve TA 100 suşları üzerindeki DMSO kontrol petrilerindeki koloni sayısı ile deney grupları petrilerindeki koloni sayısı arasındaki farkın doza bağlı gösterimi.....51
- 3.10.** 9-[4,5-di-(4-metoksifenil)-2H-imidazol-2-il]-fenantren bileşiğinin S9 fraksiyonu varlığında TA 98 ve TA 100 suşları üzerindeki DMSO kontrol petrilerindeki koloni sayısı ile deney grupları petrilerindeki koloni sayısı arasındaki farkın doza bağlı gösterimi.....51
- 3.11.** 9-[2H-benzotiazol-2-il]-fenantren bileşiğinin S9 fraksiyonu varlığında TA 98 ve TA 100 suşları üzerindeki DMSO kontrol petrilerindeki koloni sayısı ile deney grupları petrilerindeki koloni sayısı arasındaki farkın doza bağlı gösterimi.....52
- 3.12.** 9-[1H-fenantro-(9,10-d)-imidazol- 2-il]-fenantren bileşiğinin S9 fraksiyonu varlığında TA 98 ve TA 100 suşları üzerindeki DMSO kontrol petrilerindeki koloni sayısı ile deney grupları petrilerindeki koloni sayısı arasındaki farkın doza bağlı gösterimi.....52

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

| | |
|---|----|
| 1.1. Tam kromozom takımını kapsayan varyasyonlar (15)..... | 7 |
| 1.2. Aneuploidiyi tanımlayan terimlerin listesi ve 8 kromozumlu Drosophila örnek olarak alınması. (X,X,2,2,3,3,4,4) (15)..... | 8 |
| 2.1. Mutajenitesi araştırılan 9 Sübstitue fenantren türevlerinin isimleri ve kimyasal formülleri..... | 28 |
| 2.2. Mutajenite testinde kullanılan <i>S. typhimurium</i> TA 98 ve TA 100 mutant suşlarının genotip özellikleri..... | 29 |
| 3.1. 9-Sübstitue fenantren türevlerinin S9 fraksiyonu yokluğunda ve varlığında TA 98 suşu ile verdikleri revertant koloni sayıları | 45 |
| 3.2. 9-Sübstitue fenantren türevlerinin S9 fraksiyonu yokluğunda ve varlığında TA 100 suşu ile verdikleri revertant koloni sayıları..... | 46 |

1. GİRİŞ

Çevre sorunu, dünyanın pek çok yerinde özellikle son 20 yılda güncel hayata girmiş, acilen çözüm bekleyen bir sorun haline gelmiştir. Ormanların tahribatı ve erozyon, düzensiz şehirleşme ve yeşil alan azalması, kıyıların bozulması, sanayide kullanılan kimyasal maddelerin canlılar üzerindeki olumsuz etkileri, nükleer enerjili termik santraller ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH)' in ekolojik dengede yapmış oldukları tahribat sadece Türkiye' de değil, dünyada da çözümleri aranan sorunlar haline gelmiştir. Tüm bu bozulma ve kirlenmeler, canlıların sağlığını tehdit edici boyutlara ulaşmıştır. İnsan sağlığını yakından ilgilendiren ve olumsuz yönde etkileyen diğer bir faktör de, sayıları milyonları bulan ve her gün yenileri sentezlenen, kimyasal maddelerdir [1, 9, 18, 20, 35, 42, 46, 53, 78, 83].

Kimyasal maddelerin birçoğu, canlıların kalıtsal bilgisinde değişikliklere yol açan, genotoksik ve karsinojenik etkilere sahip olan maddelerdir. Genellikle, doğrudan veya metabolize edildikten sonra karsinojenik etki gösteren bu kimyasal maddeler, aynı zamanda mutajenik olarak da kabul edilmektedirler. Ancak, tüm mutajenik maddelerin, karsinojen etki göstermedikleri de bilinmektedir. Örneğin, sodyum nitrit, çok etkili bir mutajen olmasına rağmen, kansere neden olduğu henüz ispat edilememiştir. Bunun nedeni, mutasyonun kalıtsal materyali doğrudan etkilemesi, kanserin ise, çok aşamalı biyolojik olaylar sonucu oluşmasıdır. Bu nedenle, kimyasal maddelerin mutajenler ve karsinojenler diye iki ayrı grupta incelemesi yerine, “*mutajen / karsinojen*”ler olarak tek bir grupta incelemesi daha uygun olacaktır [6, 9, 48, 67, 70, 79].

Kimyasal karsinojenlerin, genetik materyal üzerindeki etkileri yapılarından dolayı farklı düzeyde olabilir. Örneğin, primer karsinojen olarak bilinen kimyasal maddeler, molekül yapıları itibari ile, kimyasal ve biyolojik olarak aktif bileşiklerdir. Bu maddeler, çok çabuk serbest değişken (free radical) haline dönüşebilirler ve hücrel makro-moleküllerle (DNA, RNA ve protein) doğrudan reaksiyona girerek, onların yapılarında değişikliğe neden olabilirler. Bu gruba; alkilleyici maddeler (*peroksitler, epoksitler, azot ve kükürt bileşikleri, etilen iminimidler, kloroalkik eterler ve doymamış laktonlar*), inorganik kimyasallar (*nikel,*

kobalt, kurşun, krom, titanyum, manganez, kadmiyum ve berilyum) ve bazı trifenil metan boyaları girer [9, 48, 67, 79, 86].

Sekonder karsinojen diyebileceğimiz grup ise, daha geniş bir yelpazeye sahiptir. Bu maddeler, kimyasal ve biyolojik açıdan aktif değildir. Ancak, çok çabuk primer hale dönüp, aktifleşebilirler. Bunu, ya kendiliğinden veya kimyasal yollarla hidrolize olarak yaparlar ya da özgül metabolik aktivasyonlar sonucu gerçekleştirirler. Bu yüzden, “**pro-karsinojen maddeler**” olarak da bilinirler. Bu gruba; polisiklik ve heterosiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik ve heterosiklik aminler, azo boyaları, alkil triazinler, dialkil hidrazinler, nitrosaminler, nitroariller nitrofuran türevleri, asafamidler, klorlu hidrokarbonlar, alfoksiller ve karbomatlar girer [9, 17, 26, 43, 45, 86, 93, 95, 97].

Son grup karsinojenler; kendileri karsinojenik etkiye sahip olmayan, ancak primer ve sekonder karsinojenlerin etkilerini arttırabilen maddelerdir. Bu yüzden, “**ko-karsinojen maddeler**” olarak da bilinirler. Bu gruba; forbol esterleri, antralin, katekol, n-dodekan ve benzo-a-pyran girer. Ayrıca, sigara dumanı, is ve katran gibi maddelerin de ko-karsinojen madde içerdikleri bilinmektedir [6, 7, 39, 86, 87 96].

Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) raporlarına göre, kansere bağlı ölümler her yıl milyonları bulmaktadır. Bunun nedenlerinden biri, mutajen ve karsinojenlerle dolu bir çevrede yaşıyor olmamızdır. Bu konuyla ilgili diğer çarpıcı açıklamalar, Uluslararası Kanser Araştırma Kuruluşunca (IARC) da yapılmaktadır [9].

Mutajen ve karsinojen maddelere, maruz kalmanın birçok yolu olabilir. Bunların başında, diyet yoluyla aldığımız kimyasal maddeler yer alır. Özellikle, gıdaların kızartma, ızgara ve közlenmesi sırasında oluşan; heterosiklik aromatik hidrokarbonlar (HAH) ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) gibi organik bileşikler, potent mutajen ve karsinojendirler. HAH’ ların karaciğer, kolon, meme ve deri kanseri gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir. Benzopyran, en karsinojen PAH dır. Kömüre damlayan yağın yanmasıyla oluşur ve dumanla birlikte pişen ete bulaşır. Ayrıca, nitrozo bileşikleri (NOB) tuzlu, turşu, nitrit ve nitrat ile muamele edildiklerinde oluşur. Ağızdan alınan NOB’ ler karsinojen etkisi gösterebilir. Çünkü, diyetinde bulunan nitrit ve aminlerden, endojen olarak ağız boşluğu ve mide de nitrozo bileşikleri oluşabilir [7, 23, 51].

İkinci sırada, endüstriyel kimyasallar, pestisitler, saç boyaları, kozmetik ve ilaçlar gibi yapay olarak hazırlanan kimyasallar yer alır. Endüstriyel kimyasalların başında; aromatik aminler, 4-aminobifenil, benzidin, 2-naftilamin, benzen, vinil klorid, bis eter, arsenik, asbestos, krom ve bileşikleri bulunur. İlaçlarda ise, kansere neden olan kimyasal maddelerin başında; alkilleyici ajanlar, klornafazin, melfalan, hardal gazı, hormonlar ve dietilstil bestol gelir [53, 66, 99].

Üçüncü sırada, karsinojenlere maruz kalmanın en yaygın şekli olan; sigara dumanı, su ve hava kirleticileri yer alır. Özellikle, son yıllardaki hızlı nüfus artışı ve aşırı kentleşme ile teknolojik gelişmeler, su ve hava kirliliğinde oldukça etkili olmuştur. Örneğin, 2000 yılında başlayan İzmir Büyük Kanal Projesi bünyesinde yapılan çalışmalarda, endüstriyel atıkların, ağır metallere ilave olarak; poli-klorlu bifenil (PCB) ve türevlerini, polisiklik aromatik hidrokarbonları (PAH), klorlu benzofuranları ve dioksin gibi kalıcı ve dayanıklı organik kirleticileri oluşturduğu belirlenmiştir. Suda doğal olarak parçalanamayan bu bileşiklerin, gıda zinciri ile balıklara ve onları yiyen insanlara da geçtiği, balıklarda olduğu kadar insanlarda da biriktiği saptanmıştır. Balıkların ve insanların yağ dokularında uzun yıllar kalabilen bu bileşiklerin, stres ve açlığa bağlı durumlarda, özellikle insanlarda akciğer, deri ve mesane kanserine neden oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca, klorlu organik kirleticilerin, dioksinlerin ve PAH' ların , hem balıklarda hem de insanda, sitokrom P450 1A enziminin miktarını ve aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir [9, 14, 18, 20, 35, 42].

Kimyasal maddeler, doğal olabilecekleri gibi, metabolik olaylar ile de oluşabilir (n-nitrozo bileşikleri, bisülfir ve hidroksaminler gibi) veya laboratuvar ortamında sentezlenebilir. Bugün birçok ilaç ön maddesi, hastalıkların tedavisi amaçlanarak, sentezlenmektedir. Örneğin, fenantren diazo-analoglarının (malaria tedavisinde kullanılır) sentezlenme sebebi, malaria hastalığının tedavisinde çok yoğun olarak kullanılan antimalarial ilaçların artık yetersiz kalması, yani hastalığa neden olan canlının bu ilaçlara dirençlilik kazanmasıdır [92, 95, 100].

Bu çalışmada, her gün çok çeşitli ve farklı şekillerde maruz kaldığımız kimyasal maddelerin, yapı-etki veya doz-etki ilişkilerini ortaya koymak amacıyla, ilaç ön maddesi olarak sentezlenen üç farklı 9-substitue fenantren türevleri Ames/Salmonella/Mikrozom Test yöntemi ile değerlendirilmiştir.

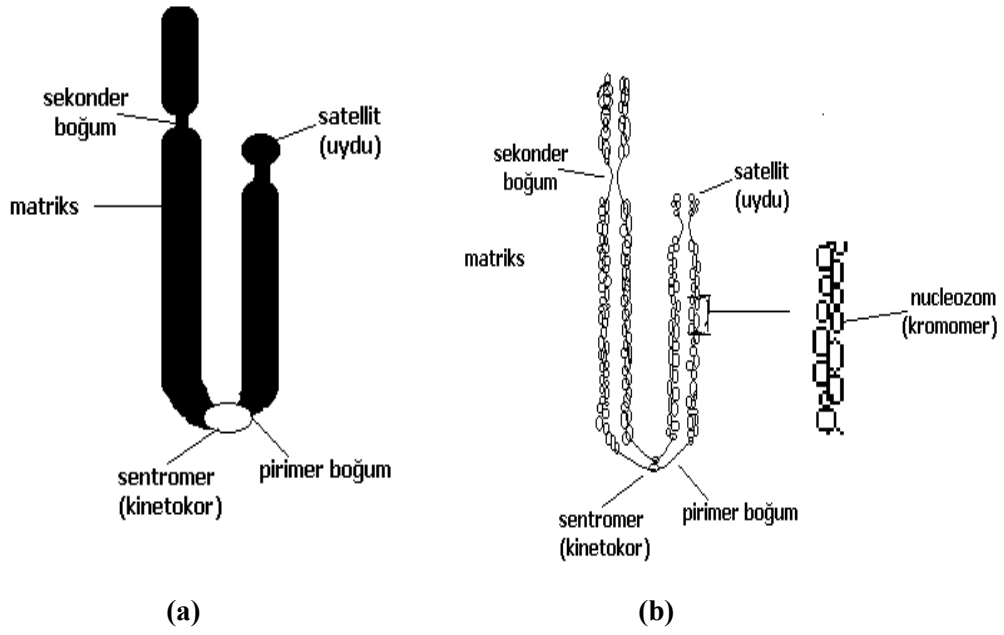
1.1. Kromozom Yapısı

Hücre çekirdeğinde bölünmenin olmadığı dönemlerde, kalıtsal madde ince iplikçikler halinde bulunur ve “*kromatin*” adını alır. Kromatin, DNA ve onun paketlenildiği “*histon*” proteinlerinden oluşur. Kromatin iplikçikleri, hücre bölünmesi başladığında; kısalır, kalınlaşır, kıvrılır ve “*kromozom*” adını alır. Kromozom için, kalıtsal materyalin yoğunlaşmış ve şekillenmiş hali de denebilir [10, 38, 41, 65, 82, 89].

Kromozomların morfolojik özellikleri en çok mitotik metafaz evresinde incelenir. Kromozomların en kısa ve en belirgin oldukları bu evrede; sentromer, ikincil boğum ve telomer olmak üzere üç kısımdan oluştuğu gözlenir. Kromozomların iki kolunu birbirinden ayıran primer boğuma “*sentromer*” denir. Sentromeri ortada olan kromozomlara “*metasentrik*”, sentromeri uca yakın olan kromozomlara “*akrosentrik*”, sentromeri olmayanlara “*asentrik*” kromozomlar denir. Sentromeri olmayan bir kromozom bölünmeye katılamaz. Ayrıca, metasentrik ile akrosentrik kromozomlar arasında bir yapıya sahip olan “*submetasentrik*” kromozomlar, birbirine eşit olmayan iki kola sahiptir (Şekil 1.1). Sentromerler, kinetokor kısımlarından iğ ipliklerine bağlanarak, hücre bölünmesi sırasında kromozomların kutuplara çekilmesini sağlarlar. Sentromerde bulunan kinetokor bölgesi, sadece iğ ipliklerinin kromozoma bağlandığı dönemde belirgin olarak fark edilir. Kromozomların uç bölgesine ise, “*telomer*” denir. Bu bölgeler, DNA uçlarının nükleaz enzimlerinden korunması ile diğer açık uçlu DNA molekülleri ile birleşmesini engeller. Kromozomlarda, ikincil yapı (sekonder boğum) nukleus yapıcı bölge (NOR) olarak tanınır ve genellikle her genomda, bir veya birkaç kromozom da bulunur. NOR bölgesinde, rRNA’ nın genelde S alt ünitelerinin transkripsiyonundan sorumlu genler bulunur. Kromozomun bu kısımları, karyotip analizlerinde, onların daha kolay tanınmalarında yardımcı olur. Bazı kromozomlarda, özellikle sekonder boğumların taşıdığı “*satellit*” denilen küçük bir yapı bulunur ve bu kromozomlar “*sat kromozomu*” adını alır (Şekil 1.2) [10, 27, 28, 34, 37, 41, 65, 82, 89].



Şekil 1.1. Sentromerin yerine göre kromozom tipleri (27)



Şekil 1.2. Kromozomların yapısı a) dıştan görünüş b) içten görünüş (27)

Kromozomlar farklı bantlama tekniklerine göre (G-,R-,Q-,C-,sentromerik ve NOR) farklı koyulukta boyanırlar. Kromatinler üzerinde, geç replikasyona uğrayan AT bazları ile zengin ve daha çok yapısal genlere sahip olan bölgelere “*heterokromatik bölgeler*” denir. Buna karşın, erken replikasyona uğrayan, GC bazları ile zengin ve daha çok aktif gen bölgelerine sahip olan bölgelere de “*euokromatik bölgeler*” denir. Bu bölgeler, bantlama teknikleri ile farklı koyulukta boyanırlar ve kromozomların morfolojisi hakkında bilgi verirler [10, 27, 28, 34, 37, 41, 65, 82, 89].

1.2. Mutasyonlar

Mutasyon, kalıtsal materyaldeki miktar, organizasyon veya içeriğindeki herhangi bir değişikliği ifade eder [89]. Mutasyon için, genetik bilginin bozulmaksızın depolanmasındaki başarısızlıkta denebilir. Eğer, depo edilmiş genetik bilgide herhangi bir değişiklik olursa, bu değişiklik bilginin ifadesine de yansır ve replikasyon yoluyla aktarılır. Mutasyon, hem kromozomal hem de genlerdeki değişimleri ifade edebilir [89, 65, 41, 38].

1.2.1. Kromozom Sayısı Değişimleri (Genom Mutasyonları)

Kromozom sayısı canlılardaki türlere göre farklılık gösterir, ancak bu sayı her tür için sabittir, değişmez. Canlıların gelişmişliğinde, kromozom sayısı önemli değildir. Önemli olan, kromozomlar üzerindeki genetik şifrenin dizilişidir. Canlı bireyin her bir hücresi, onun ait olduğu türe özgü kromozom taşır. Eşeyli üreyen canlıların gametlerinde bulunan kromozomlara “*takım*” ya da “*genom*” adı verilir ve “*n*” sembolü ile gösterilir. “*n*” kromozom sayısına sahip gametler, *monoploid* (haploid) dir. Somatik hücrelerde (vücut hücreleri) ise, iki takım kromozom bulunur ve “*2n*” sembolü ile gösterilir. Ökaryotların çoğu *diploid* dir ve iki takım kromozom taşır [10, 28, 41, 87]. İki grup altında incelenir:

1.2.1.1. Euploidi (Öploidi)

Kromozom takımı sayısındaki değişimlerdir. Organizmada tek bir takım kromozom bulunması şeklinde veya bir takımdaki kromozomların hepsinin birden sayısının tam katlar halinde artması şeklinde olabilir (Tablo 1.1)[10, 15, 65].

Tablo 1.1. Tam kromozom takımını kapsayan varyasyonlar (15)

| <u>Tip</u> | <u>Mevcut Homolog Sayısı(n)</u> | <u>Örnek</u> |
|----------------------|---------------------------------|-----------------|
| <i>Monoploid</i> | bir (n) | ABC |
| <i>Diploid</i> | iki (2n) | AABBCC |
| <i>Poliploid</i> | ikiden çok | |
| a) <i>Triploid</i> | üç (3n) | AAABBBCCC |
| b) <i>Tetraploid</i> | dört (4n) | AAAABBBBCCCC |
| c) <i>Pentaploid</i> | beş (5n) | AAAAABBBBBCCCCC |

Monoploidi

Normalde diploid (2n) olan canlı türlerinde ender olarak bazı bireylerin hücrelerinde sadece bir takım (n) sayıda kromozom bulunur. Bu duruma “*monoploidi*” denir. Monoploidler, genellikle döllenmemiş yumurtanın gelişmesiyle oluşur (erkek bal arıları, eşek arıları ve karıncalar gibi). Bu olaya da “*partenogenez*” denir. Bu yolla üreyen canlıların, monoploid erkekleri ve diploid dişileri vardır. Monoploidi, kendiliğinden olabileceği gibi, dış etkenlerle de gerçekleşebilir (15, 89). Ayrıca, monoploidler, bitki yetiştiriciliğinde de çağdaş yaklaşım için önemli rol oynamaktadır. Yeni bitki genotipi yaratmak için, önce monoploidler üretilir, sonra kromozomları iki katına çıkarılarak, üretken homozigot diploid hatlar geliştirilmektedir [15, 41, 89].

Poliploidi

Bir genomdaki kromozom takımının hepsinin birden ikiden fazla katlarda artmasıdır. Bu olay sonunda, 3n, 4n, 5n ve daha yüksek katlı kromozomlara sahip bireyler oluşur [15, 41, 89].

1.2.1.2. Aneuploidi (Anöploidi)

Bir takımdaki kromozomlardan birinin ya da birkaçının sayısının değişmesi olayına “*aneuploidi*” denir. Aneuploidi, mayoz bölünmedeki ayrılmama (nondisjunction) olayından kaynaklanır. Ayrılma (disjunction), nükleer bölünme sırasında kromozom ya da kromatitlerin karşıt kutuplara normal olarak ayrılmasıdır. Ayrılmama ise, bu olayın başarısızlığıdır ve karşıt gruba hiçbirisinin gitmemesi ile sonuçlanır. Kromozomlar, birinci ya da ikinci bölünmede, ayrılma

başarısızlığına uğrayabilirler. Her iki halde de haploid sayıdan fazla ya da eksik sayıda gametler üretilir. Aneuploidi' nin çeşitli tipleri 8 kromozumlu Drosophila örnek alınarak Tablo 1.2 de gösterilmiştir. [15, 41, 64, 89].

Tablo 1.2. Aneuploidi' yi Tanımlayan Terimlerin Listesi, 8 Kromozumlu Drosophila bir örnek olarak alınmıştır(X,X,2,2,3,3,4,4) (15).

| Tip | Formül | Kromozom sayısı | Örnek |
|----------------------|---------------|------------------------|---------------------|
| <i>Normal</i> | 2n | 8 | X,X,2,2,3,3,4,4 |
| <i>Monosomik</i> | 2n-1 | 7 | X,X,2,2,3,4,4 |
| <i>Nullisomik</i> | 2n-2 | 6 | X,X,2,2,4,4 |
| <i>Polisomi</i> | | | |
| a) <i>Trisomik</i> | 2n+1 | 9 | X,X,2,2,3,3,4,4,4 |
| b) <i>Tetrasomik</i> | 2n+2 | 10 | X,X,2,2,3,3,3,3,4,4 |

Monosomi

Diploid bir bireyde tek bir kromozomun eksik olma durumudur. Mayoz sırasında ayrılmama sonucu oluşan (n-1) gameti ile normal ayrılma sonucu oluşan n gametinin birleşmesi sonucu (2n-1) formülü ile gösterilen , monosomik zigot meydana gelir [15, 41, 8]

Nullisomi

Bir organizmada, bir kromozomun homologu ile birlikte hiç bulunmaması durumudur. Aynı çeşit kromozomu kaybetmiş iki aneuploid (n-1) gametin birleşmesi sonucu (2n-2) formülü ile gösterilen nullisomik zigot meydana gelir [15, 41, 89].

Polisomi

Bir takımdaki kromozomlardan birinin ya da birkaçının artması durumudur. Polisomi, artan kromozom sayısına göre farklı isimler alır. Örneğin, bir (n+1) gameti ile (n) gameti birleşirse, (2n+1) trisomik zigot oluşur. Ya da iki tane (n+1) gameti birleşirse, (2n+2) tetrasomik zigot meydana gelir. Yani, trisomi ve tetrasomi birer polisomi örneğidir [15, 41, 89].

1.2.2. Kromozom Yapısı Değişimleri (Kromozom Mutasyonlar)

Kromozomların yapısında meydana gelecek olan değişimler, kalıtsal bilgide de değişime neden olabilir. Yani, kromozomların bazı parçalarının artması, azalması veya yer değiştirmesi, kalıtsal maddenin değişimine yol açar. Ancak, bu tip olaylarda kromozom sayısı sabit kalır. Kromozomlardaki yapısal değişimler farklı şekillerde olsa da, hepsinin kökeninde; kromozomu oluşturan kromatitlerin birinde, bir ya da birden fazla meydana gelen kırılmalar ve yeniden birleşmeler yer alır. Bu kırılmalar, hiçbir etken olmadan kendiliğinden olabileceği gibi, X, UV, gama ışınları, fiziksel stres ya da kimyasal maddeler gibi dış etkenler tarafından da oluşturulabilir [38, 65, 89]. Kromatid tipi kırılmalarda, iki kromatidden sadece birinde kırılma olur ve genellikle kırık uçlu parçalar birbirine yeniden yapışır. Kromozom tipi kırılmalarda ise, bir kromozomun iki kromatidi aynı anda, aynı yerden kırılır. Böylece, kromozomun bir yanı sentromerli (sentrik), bir yanı sentromersiz (asentrik) hale gelir [27, 65, 82, 84, 89].

Kromozom yapı değişimleri farklı şekillerde olabilir [89].

1.2.2.1. Delesyon

Kromozomların, ucundan ya da aradan herhangi bir bölgeden parça kaybetmesi durumudur. Kromozomdaki parça kaybı uç bölgeden ise “*defisiyens*”, aradan herhangi bir yerden ise “*delesyon*” adını alır [10, 82, 84, 89, 91].

1.2.2.2. Dublikasyon

Kromozomların, herhangi bir parçayı fazla sayıda taşıması durumudur. Bu olayda, kromozom belirli bir parçayı yani o kısımdaki genleri iki veya daha fazla sayıda taşır. Delesyonun tam aksine, kromozomda bir parça çoğalması meydana gelir [82, 89].

1.2.2.3. İnversiyon

Kromozomların, iki kırık arasında kopan bir parçasının 180° dönerek, aynı yere yapışması durumudur. Böylece, oluşan yeni kromozomda, sadece taşıdığı genlerin dizilişi değişmiş olur [82, 89].

1.2.2.4. Traslasyon

Homolog olmayan kromozomlarda, kromozom parçalarının yer değiştirmesi durumudur. Yer değiştiren parçalar eşit veya farklı büyüklükte olabilir. Bazen homolog olmayan kromozomlarda sentromere yakın yerlerde kopma ve onu izleyen parça değişimi olur. Böylece biri büyük, biri de küçük iki kromozom meydana gelir. Küçük kromozom dölde kaybolabilir ve başlangıçtaki iki akrosentrik kromozomdan tek bir metasentrik kromozom meydana gelmiş olur. Yani, o türün diploid kromozom sayısında bir azalma meydana gelir [82, 89].

1.2.3. Gen Mutasyonları

Gen mutasyonları ya da diğer adıyla “*nokta mutasyonları*”, DNA’ da bulunan bazların veya nükleotid dizilerinin değişimi sonucu oluşur. Bu değişimler, o genin kodladığı enzimin tamamen yok olmasına ya da etkisinin azalmasına neden olur. Bir gen yaklaşık 1000-1500 nükleotidden oluşur. Her nükleotid bazının mutasyona uğrama ihtimalinden dolayı, bir genin en azından baz çifti sayısı kadar mutasyon çeşidi olabilir [13, 22, 24, 41, 71, 89].

Mutasyonlar, genetik çalışmaların temelini oluştururlar. Ancak, bu çalışmalarda kullanılacak ya da gözlenecek organizmanın seçimi de oldukça önemlidir. Bazı organizmalar oldukça kısa olan hayatları boyunca kolay tanınabilecek ve çalışılacak mutasyonların uyarılmasına uygundur. Bu yüzden, mutasyon çalışmalarında virüsler, bakteriler, mantarlar, meyve sinekleri, bazı bitkiler ve fareler oldukça sık kullanılırlar [10, 27, 89].

Gen mutasyonlarının oluşumları kendiliğinden gerçekleşebileceği gibi, bazı mutajenler tarafından da tetiklenebilir.

1.2.3.1. Gen Mutasyonlarının Sınıflandırılması

Gen mutasyonları farklı şekillerde sınıflandırılabilir. Ancak, bu sınıflandırma şekilleri temelde birbiriyle etkileşim halindedir ve mutasyonun hangi özelliğinin tanımlandığına bağlıdır. Bu doğrultuda, gen mutasyonları üç grup altında incelenebilir [89].

Kendiliğinden Olan ve Uyarılmış Mutasyonlar

Genelde tüm mutasyonlar, spontan ya da uyarılmış olarak tanımlanırlar. Spontan mutasyonlar, sadece doğada olan mutasyonlardır ve oluşumları ile ilgili olarak hiçbir özgün etken yoktur. Genellikle, genlerin nükleotid dizilerinde rasgele olan değişiklikler olarak kabul edilirler. Bu mutasyonların çoğu, genlerin azotlu bazlarının yapısını değiştiren, organizmadaki normal kimyasal süreçle ilgilidir. Bu sürecin çoğunluğu, enzimatik DNA replikasyonu sırasında gerçekleşir. Genetik şifrede meydana gelen bir hata, kodlanan proteinin amino asit dizisine yansır. Bu da, oluşan proteinin yapısında ya da fonksiyonlarında değişim meydana getirir ve fenotipte kendini gösterir.

Uyarılmış mutasyonlar ise, herhangi bir yapay faktörün etkisi ile oluşur. Hücredeki kimyasal etkileşim, doğal olayların etkisi ile yeni mutasyonların ortaya çıkmasında etkili olabilir. Örneğin, güneşten gelen ultraviyole radyasyonu ile kozmik ve mineral kaynaklı radyasyonlar, mutajenik etkiye sahiptir. Ayrıca, bir çok kimyasal madde çeşidinin de (besinlerdeki doğal kimyasallar ya da yapay kimyasallar) mutajenik olduğu bilinmektedir [27, 89].

Gametik ve Somatik Mutasyonlar

Mutasyonların, gametik ya da somatik oluşu, onların etkilerini değerlendirmede önem kazanır. Gametler, eşey (üreme) hücreleridir ve mayoz bölünme sonucu oluşturulurlar. Gamet ya da gameti oluşturan dokularda meydana gelen mutasyonlar yeni nesillere doğrudan aktarılır ve yeni nesillerin tüm hücrelerinde kendini gösterir. Dolayısıyla, gametik mutasyonlar, etkileri bakımından oldukça önemli değişimlere neden olurlar. Ancak, somatik hücreler de oluşan mutasyonlar, gelecek nesillere doğrudan aktarılmazlar. Çünkü, bu tür mutasyonların çoğunun ifadesi genellikle dominant alel genler tarafında maskelenir [27, 89].

Mutasyonun Diğer Kategorileri

Mutasyonlar, fenotipik özelliklere, besinsel ve biyokimyasal özelliklere, davranışsal özelliklere, letal ve koşullu oluşlarına göre de sınıflandırılabilirler. Morfolojik bir özelliği etkileyen mutasyonlar, mutantların normal ya da yabancı

tip fenotiplerinden sapmalarını temel alır ve kolaylıkla fark edilir. Besinsel ve biyokimyasal mutasyonlar, bakteri veya mantar gibi canlılarda bir amino asidi ya da bir vitamini sentezlemedeki başarısızlıktır. Bu tip mutasyonlar, sadece o canlıyı etkiler. Eğer mutasyon, bir organizmanın günlük yaşamını veya eşleşme davranışını etkiliyorsa, bu tip mutasyonlara “*davranış mutasyonu*” denir. Letal mutasyonlar, organizmanın yaşamında zorunlu olan maddelerin yok olmasına neden olur ve öldürücüdür. Besinsel ve biyokimyasal mutasyonlar, letal olabilir. Örneğin, bir bakteri yaşaması için gerekli olan bir amino asidi sentezleyemiyorsa ve o amino asidin olmadığı bir ortama konuyorsa, bakteri yaşayamaz ve ölür. Koşullu mutasyonlar ise, belirli şartlar altında kendini gösterebilen mutasyonlardır. Buna en iyi örnek, bir çok organizmada bulunmuş olan ısıya duyarlı mutasyonlardır. Bazı tolere edici sıcaklıklarda, mutant gen ürünü normal olarak çalışır. Ancak, kısıtlayıcı sıcaklıkta fonksiyonel becerisini kaybeder. Bu aşamada, mutasyonun etkisi belirginleşir. Koşullu mutasyon çalışmaları, deneysel genetikte özellikle organizmaların yaşamı için mutlak gerekli olan genlerin fonksiyonunu anlamada önemli olmaktadır [27, 89].

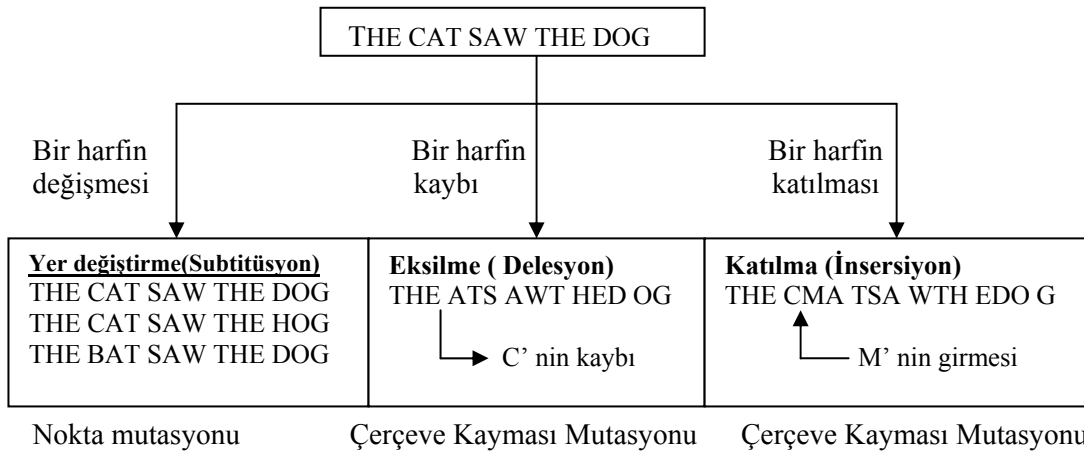
1.2.3.2. Mutasyonların Oluşum Şekilleri

Yapısı hayli sabit olan kalıtsal bilginin uygun tarzda depolanması aksarsa , değişik mutasyonlar ortaya çıkar. Eğer depolanmış bilgide bir değişiklik olursa, bu değişiklik replikasyonla çoğalır, artar ve kalıtsal bilginin ifadesine yansır. Kalıtsal bilginin temelini oluşturan gen, depolanmış kimyasal bilgiyi temsil eden nükleotid çiftlerinin lineer dizisi olarak kabul edilir. Genetik şifre üçlü yapıya sahiptir ve üç nükleotidin her dizisi ilgili proteinde tek bir amino asidi belirler. Bu dizileri ve şifrelenen bilgiyi bozan her etken, mutasyona neden olur. Bu etkenler, mutasyonun oluş şeklini de belirler [27, 82, 89].

Kalıtsal bilginin değişiminde en basit olanı , bir nükleotidin yer değiştirmesi (substitüsyonu) dir. Böyle bir değişiklik, genetik kodla uyumlu olması için üç harfli kelimeler kullanılarak yazı diliyle ifade edilmiştir. Bu ifade de, bir harf değişikliği cümlenin anlamını değiştirebilir: “*The cat saw the dog*” (kedi köpeği gördü); “*The cat saw the hog*” (kedi domuzu gördü.) veya “*The bat saw the dog*” (yarasa köpeği gördü) ye dönüşebilir ve ortaya yanlış anlam (missense)

çıkarm. Bu tip değişimler, nokta mutasyonları veya baz yer değiştirmeleri analogudur ve dizinin anlamını bozar. Nükleotid yer değiştirmeleri iki pirimidin arasında ya da iki pürin arasında gerçekleşirse, “*transisyon*” (geçiş), bir pürin ve bir pirimidin arasında gerçekleşirse, “*transversiyon*” (değişim) adını alır [3, 27, 10, 41, 49, 70, 82, 89].

Kalıtısal bilginin değişiminde diğer bir durum ise, gen içinde herhangi bir noktaya bir ya da daha fazla nükleotidin insersiyonu (girmesi) veya delesyonu (çıkması) şeklindedir. Tek bir nükleotidin kaybedilmesi veya eklenmesi, tüm üçlü genetik şifrenin değişimine neden olur ve “*çerçeve kayması*” mutasyonu olarak tanımlanır (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Nokta ve çerçeve kayması mutasyonlarına analogi olarak üç harfli kelimelerden oluşan bir cümlede, bir harfin yer değiştirmesi, eksilmesi ve katılması etkisi (89)

Tüm bu değişimlerin farklı oluşum şekilleri olabilir. [27, 89]

Tautomerik Değişimler

Watson ve Crick, nükleotid bazlarının hidrojen bağlarındaki değişimin yeni tautomerik formlara dönüşebileceğini ve bu tautomerik değişimlerinde mutasyona neden olabileceğini ortaya koymuşlardır. Tautomerler, yapısal izomerler olarak ifade edilebilir ve sitozin-adenin bazlarının amino-imino formları ile timin-guanin bazlarının keto-enol formlarını içerir. Örneğin, adenin, normal olarak timinin keto (C=O) grubu ile komplementer olan ve hidrojen atomu temin eden amino (NH₂) grubu taşır. Tautomerik değişimin ardından, adenin' in amino

formu imino formuna dönüşür. Adenin' nin tautomerik formu, sitozin' le komplementerlik ilkesine aykırı olarak birleşir. Timin'de de benzer bir tautomerik değişim oluşur ve onu keto formundan ender görülen enol formuna dönüştürür. Bu durumda iken de baz, guanin' e bağlanır. Yani, bu tür bir kayma, molekülün bağ özelliğini değiştirebilir ve mutasyona neden olabilir [4, 27, 37, 82, 87].

Baz Analogları

Yönetici moleküllerin sentezi sırasında, pürin ve pirimidinlerin yerine geçebilen moleküllere “*baz analogları*” denir ve bunlar genellikle mutajenik kimyasallardır. Örneğin, 5-Bromo-urasil (5-BU) bir timin analogudur ve çoğu zaman keto formundadır. Ancak, metil grubu yerine brom atomu geçerse, tautomerik değişime neden olur ve guanin' le eşleşmeye uygun hale gelir. Yani, 5-BU Timin yerine DNA' ya girerse ve enol formuna neden olan tautomerik bir kayma olursa, 5-BU guanin'le eşleşir. Böylece, 5-BU adenin'e eş olarak inkorpore olur ve A-T yerine G-C substitüsyonunu verir. Ayrıca, 5- BU' nun DNA' daki varlığı mutajenik olan UV ışığına karşı duyarlılığı artırır. Mutajenik olan başka bir baz analoguda, 2-amino pürin' dir. Bu bir adenin analogudur. Adenin yerine inkorpore olur ve sitozin' le eşleşir ya da önce sitozin' le sonra da timin' le eşleşir [15, 27, 37, 89].

Alkilleyici Ajanlar

Kopya hatalarının aksine, nükleotid yapısındaki doğrudan değişimler, nitroz asidi veya azot hardalı gibi alkilleyici ajanlar tarafından da gerçekleştirilebilir. Azot hardalı, etil metan sülfonat (EMS) ve etil etan sülfonat (EES) gibi alkilleyici ajanlar iki yolla mutasyona neden olurlar. Bunu ya, guanine metil ya da etil grubu ilave ederek ve bu durumda adenin baz analogu gibi davranmasına neden olarak, eşleşme yanlışına yol açar. Ya da, alkillenmiş guanin bazlarının kaybına yol açar (depürinasyon). Böylece, DNA zincirinde açıklar meydana gelir ve bu da DNA replikasyonunu etkiler veya kısaltılmış nükleotid dizisine yol açar (çerçeve kayması mutasyonu) [15].

Proflavin ve akridin turuncusu gibi akridin boyaları da diğer bir mutajenik kaynaktır. Bunların DNA molekülü üzerinde doğrudan etkileri vardır.

Tek bir DNA zinciri içindeki komşu pürin bazları arasına girerler ve bir nükleotidin kaymasına ya da ilavesine neden olurlar. Bundan dolayı akrinin boyaları; baz analogları, nitroz asit, hidroksilamin ve alkilleyici ajanların aksine transisyonel değişim ilkesinden farklı etki gösterirler. Yani, çerçeve kayması mutasyonuna neden olurlar [15, 16, 27, 61, 89].

Apürinik Bölgeler ve Diğer Lezyonlar

Bir çift-sarmal DNA molekülünde, pürin halkasının 9-N'unu d-ribozun 1.C' una bağlayan glikozidik bağın kırılmasıyla oluşan bölgelere “*apürinik bölgeler*” (AP bölgeler) denir. Burada, azotlu bazlardan biri (sıklıkla G veya A) spontan olarak kaybedilir. Bir AP bölgede bir azotlu bazın yokluğu, eğer ilgili zincir transkripsiyon ve translasyona uğramaktaysa, genetik kodu değiştirir. Eğer replikasyon olursa, AP bölge kalıp olarak uygun olmayacak ve replikasyonun durmasına neden olacaktır. Eğer, yapıya bir nükleotid girmişse, genellikle yanlışdır ve diğer bir mutasyonun olmasına neden olacaktır (65, 89). Diğer lezyonların bazı mutasyonların kaynağı olduğu bilinmektedir. Örneğin, oksidasyon reaksiyonları sonucunda oluşan, hidrojen peroksit ve süperoksit gibi oksijen radikallerinin (reaktif moleküller) aktif formları DNA bazlarına zarar verebilirler ve replikasyon sırasında yanlış eşleşmelere neden olabilirler [15, 27, 82, 89].

Ultraviyole Radyasyonu ve Timin Dimerleri

UV düşük oranda delip-geçici özellikte olduğundan, germ dokularının UV ışınlanması mutajenik etkiyi ortaya çıkarır. UV radyasyonu, kromozom mutasyonuna da neden olmakla birlikte, etkisi X ışımından daha az olduğu için genelde “nokta mutasyonu” araştırmalarında kullanılmaktadır. UV' nin çok uzun dalga boyu bulunduğundan (iyon üretmez), kendini direkt absorbe eden bileşikler üzerinde etkilidir. Hücrede organik halka yapısına sahip olan pürin ve pirimidin gibi bileşikler UV'yi doğrudan absorbe ederler. DNA' nın UV ışınlarını absorbe ettiği 260nm dalga boyu, aynı zamanda bakterilerde mutasyon hızını arttıran en uygun dalga boyudur. UV' nin zararlı etkisi özellikle iki timin bazı arasında dimerlerin oluştuğu pirimidinler üzerinedir. Sitozin-sitozin veya timin-sitozin

dimerleri de oluşabilir, ancak sayıları azdır. Böyle dimerler, DNA sarmalını bozar ve uygun replikasyonu önler. Yani, UV radyasyonu çeşitli DNA öncülerini ve enzimlerini etkileyerek, bunların sonuçta mutasyona yol açmasına neden olur [15, 82, 89].

2.3. Metabolik Aktivasyon

Organizmalarda meydana gelen ve yaşam için gerekli olan bütün kimyasal olaylara “*metabolizma*” adı verilir. Çok sık kullanılan ilaçların, enzimlerin etkisi ile kimyasal değişikliklere uğramasına ise; “*biyotransformasyon*” (metabolizma) denilir. Biyotransformasyon sonucu ilaçlar genellikle daha az etkili veya etkisiz bileşikler haline getirilir. Bu yüzden biyotransformasyona, “*biyoinaktivasyon*” veya “*detoksikasyon*” (zehirsizlenme) da denilir. [81] Bazen ilaçlar, biyotransformasyon sonucu daha etkili (kodein’in morfine, difenoksilat’ ın difenoksin’e dönüşümü gibi) ve/veya daha toksik (metil alkol’ ün formaldehid ve formik asid’e, asetaminofen’in N-asetil-p-benzokinonimin’e dönüşümü gibi) bileşikler haline dönüşebilirler. Bu da, Ön- İlaç (İnaktif prekürsör = Prodrug) şeklinde ifade edilebilir. Bazen de, etkisiz bir bileşik vücutta biyotransformasyon sonucu etkili hale getirilebilir (Bakampisilin’ in Ampisilin’ e dönüşümü veya Enalapril’ in Enalaprilat’ a dönüşümü gibi) [29, 96].

Biyotransformasyon sonucu ilaçlar daha polar hale gelirler, lipid/su partiyon katsayıları azalır ve suda çözünürlükleri artarak vücuttan daha kolay atılırlar. Vücutta sadece ilaçlar değil, diğer bütün kimyasallar da biyotransformasyona uğrar. Besinle alınan doğal bileşikler dışında kalan ve çeşitli yollardan vücuda giren kimyasal maddelere, ilaçlar dahil, “*ksenobiyotikler*” denilir. İlaç dışındaki bazı ksenobiyotikler; besin aditifleri, insektisid ve fungusid atıkları, hava ve suyu kirleten atıklar, egzoz ve sigara dumanı şeklinde sıralanır [77]. Biyotransformasyon yapan enzimlerin bazıları az veya çok tüm hücrelerde bulunur. Büyük kısmı ise, spesifik olarak belirli organlarda (karaciğer, GİS mukoza ve lümeni, böbrek, akciğer ve diğer yapılardır) yer alır. Karaciğer, metabolizmada başrol oynayan organdır. Buradaki en önemli fraksiyon; mikrozomal enzimlerdir. Biyotransformasyonla ilgili enzimatik olaylar esas

olarak iki fazda gerçekleşir: Birinci Faz Reaksiyonları; Oksidasyon, Redüksiyon ve Kopma' dır. İkinci Faz Reaksiyonları ise; Konjugasyon' dur [81].

Oksidasyon, karaciğer parenkima hücrelerinin mikrozomal sitokrom P450 enzimleri tarafından yapılır. Bunlara, karma fonksiyonlu “*oksidazlar*” veya “*monooksijenazlar*” denir ve ilaç molekülüne oksijen sokarlar. Ayrıca bu sistemle eşgüdümlü çalışan NADPH-sitokrom P450 redüktaz sistemi vardır. Enzimin aktif noktası demir iyonudur. Halen varolan ilaçların metabolizmasına en fazla 5 mikrozomal enzim katkıda bulunmaktadır [29, 33, 56, 62, 77, 81, 96].

Redüksiyon, NADPH, FAD ve diğer flavinlerin yardımıyla olur. Olayların çoğu aldehidlerin alkollere dönüşümü, Azo (N=N) grubunun aminlere dönüşümü ve nitro grublarının amin veya hidroksilamin grubuna dönüşümü şeklinde olur.

Kopma, ya ilaç molekülünden bir grubun koparılması ya da molekülü oluşturan daha ufak moleküllere ayrılması şeklinde gerçekleşir.

Konjugasyon, bir ilaç veya onun metabolitinin molekülüne bir radikalın veya endojen bir molekülün kovalent bağla bağlanmasıyla olur. Birisi hariç diğerleri mikrozomal olmayan enzimlerle yapılır. Olaya ‘*konjugasyon*’, meydana gelen ürünlere de “*konjugat*” adı verilir. Konjugatlar, genellikle daha kolay atılabilen polar maddelerdir [81, 92, 63].

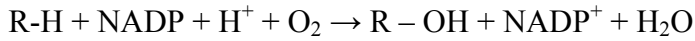
2.3.2. Mikrozomal Enzimler

İlaçların metabolizması, çok sayıda ve çeşitte enzim gerektirdiği için, bu olay esas olarak karaciğer hücreleri içerisinde gerçekleşir. Yanı sıra, akciğer, böbrek, barsak lümenindeki mikroflora, gastrointestinal mukoza ve daha birçok çeşidinde, enzimlerle ilaç metabolizmasına katkıda bulunmaktadır. Çok sayıda ilaç (penisilin G, atraküryum ve ilaç ön maddesi olan dipiron gibi) non-enzimatik yıkılmaya uğrar [72, 77, 81, 92].

Karaciğer hücrelerindeki Endoplazmik Retikulum' da (ER), ilaç metabolize edici “*mikrozomal enzim sistemi*” vardır. Bunlar hücrede ER' un düz kısmında bulunur. Oksidasyon olaylarının çoğu karaciğer hücrelerinin mikrozomal enzimleri tarafından yapılır. In vitro enzim incelemeleri için, hücre homojenize edilirken ER membranı “*mikrozom*” denilen kürecikler haline dönüşür. Mikrozomal enzim sistemine, sitokrom P450' ye bağımlı “*karma fonksiyonlu oksijenaz sistemi*” de denir. Sitokrom P450, karaciğer ER membranlarında en

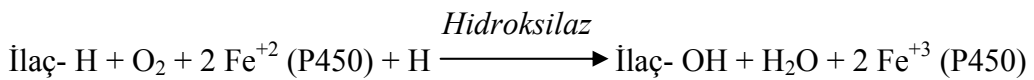
yüksek miktarda bulunur ve bu miktar toplam protein içeriğinin yaklaşık %20 sini oluşturur. Bir hemoprotein olan sitokrom P450' nin farklı fakat, genellikle çakışan substrat özgülüğü gösteren bir çok formu vardır. Bu da, karaciğer monooksijenaz sisteminin geniş substrat özgülüğünün bir göstergesidir. Ayrıca, mikrozomal enzim sisteminin diğer önemli koplementerleri; bir flavo protein olan NADPH-sitokrom P450 redüktaz ve NADPH' den sitokrom P450' ye elektron taşıyan bir lipid olan sitokrom b₅' dir [9, 10, 52, 58, 81].

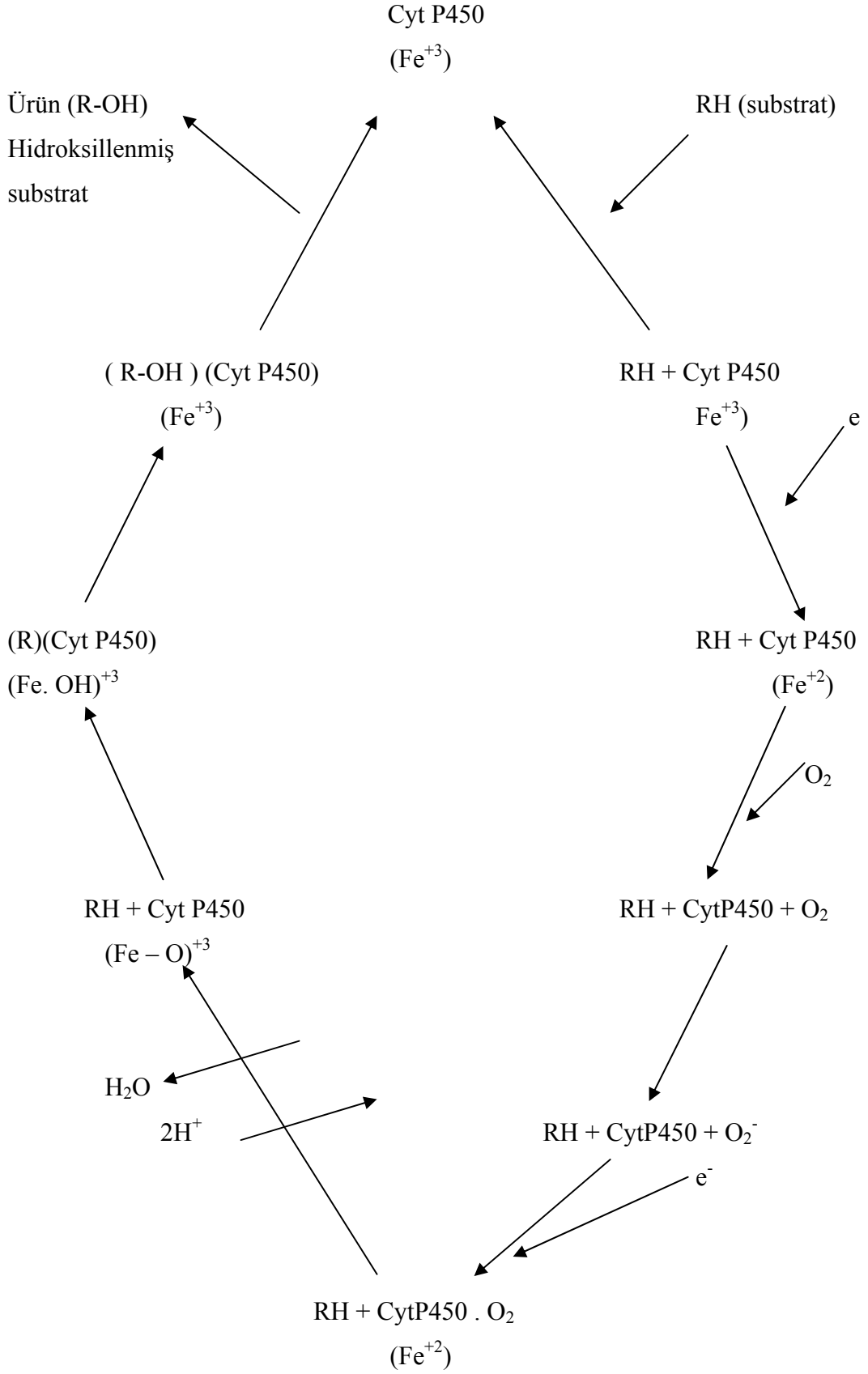
Polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) metabolizmasındaki ilk kritik basamak, bir elektron trasport sistemi içeren, oksidatif bir reaksiyondur. Bu elektron transport sisteminde sitokrom P450, oksidasyon - redüksiyon bileşeni olarak görev görür. Monooksijenazyon reaksiyonlarında, moleküler oksijenin bir atomu suya redüklenir, diğeri substrata katılır. Sitokrom P450' nin redüksiyonu ile ilgili elektronlar NADP' den geldiği için, tüm reaksiyon aşağıdaki gibi yazılabilir: [7, 9, 81]



Oksidasyon reaksiyonlarında, sitokrom P450 (Fe⁺³) ile substrat (R-H) arasında bir kompleks oluşur. Daha sonra NADPH, H⁺ dan bir elektron koparır ve Fe⁺³, Fe⁺² ye dönüşür. Oksijen molekülünün sisteme dahil olmasıyla, P450 Fe⁺² O₂ haline dönüşür. Bir kademe sonra, bir elektron daha devreye girer ve substrat hidroksile edilerek ayrılır. Sonuçta, bir molekül su açığa çıkar ve P450 (Fe⁺³) halinde yeni bir reaksiyonda kullanılmak üzere değişmeden ayrılır [9].

Mikrozomal sitokrom P450 monooksijenaz sistemleri, birçok ilacın hidroksilasyonu için önemlidir. Bu monooksijenazlar, karaciğer mikrozomlarında sitokrom P450 ve sitokrom b₅ ile beraber bulunur. Hem NADH hem de NADPH bu sitokromların redüksiyonu için gerekli redükleyici ekivalenti temin ederken, tersi yönde hidroksilaz siklusu denilen bir seri enzimatik reaksiyon tarafından oksitlenir (Şekil 1.4) [9]. Tüm reaksiyon aşağıdaki gibi yazılabilir:





Şekil 1.4. Sitokrom P450 tarafından substratın hidroksilasyonu (9)

Bu sistemle metabolize olan ilaçlar arasında; benzopyran, amino pirin, anilin, morfin ve benzofetamin bulunur. İlaçlar, enzimin “hem” kısmının Fe^{+3} iyonuna bağlanırlar. Bu sayede birçok ilaç ve kimyasal karsinojen, sitokrom P450 mekanizması ile metabolize olurlar. Bu matabolizmik olaylar sırasında; aromatik halkanın hidroksilenmesi, alifatik hidroksilasyon, N-dealkilasyon, O-dealkilasyon, S-dealkilasyon, desüfürasyon, S-oksidasyon, N-oksidasyon ve N-hidroksilasyon yer alır [7, 63, 81, 83, 92].

Mikrozomal bir enzimin, substratı olan bir madde tarafından sentezinin arttırılmasına (ya da yıkımının yavaşlatılmasına) “*mikrozomal enzim indüksiyonu*”, enzimin inhibe edilmesine ise “*mikrozomal enzim inhibisyonu*” denir. Enzim indüksiyonunun pratik önemi; artmış olan enzim etkinliği sonucu, bu enzimler tarafından inaktive edilen ilaçların vücutta yıkımının artması ve etkinliğinin azalmasıdır. Enzim inhibisyonunda ise, birçok ilacın inaktivasyonu önlenerek onların farmakolojik etkileri güçlenir ve plazmadaki ilaç düzeyleri toksik düzeye çıkabilir [29, 63, 92, 96]

Bazı ilaçlar, kendilerini yıkan enzimleri indükleyerek, kendi inaktivasyonlarını hızlandırır. Bu olaya “*oto- indüksiyon*” denir. Örneğin, karbamazepin, barbitüratlar, alkol gibi. Bazı ilaçlar ise, sitokrom enzimi tarafından oksitlendikten sonra, reaktif bir ara ürüne (metabolit) dönüşür ve kendini yıkan enzimi inaktive ederek, kendi yıkımlarını yavaşlatırlar. Bu ilaçlara “*intihar* (suicide tipi) *inhibitörler*” adı verilir. Örneğin, etinil estradiol, kloramfenikol, sekobarbital gibi. Enzim aktivasyonu, ilaç tarafından, enzim sentezi arttırılmaksızın enzim etkinliğinin arttırılmasıdır [11, 92].

1.4. Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH) ve Fenantrenler

Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar (PAH), atmosfer, su ve besin zincirinde bulunan yoğun kirleticilerdir. Karbon ve hidrojenle oluşan bu organik bileşikler, daha çok fosil yakıtların ve diğer organik materyallerin tamamen yanmaması ya da yüksek sıcaklıkta erimesi sonucu meydana gelirler. PAH’lar, tütünde, kömürde pişirilen et üzerinde, kurumun, pestisitlerin, plastiklerin, boyaların ve ilaçların yapısında da bulunabilir. PAH’ların çoğu, çevrede uzun süre kalabilir ve birikebilir. Bunun sonucunda, çevre kirlenmesine neden olurlar

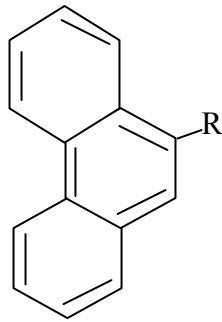
ve biyolojik dengeyi önemli ölçüde etkilerler. PAH' ların bitki ve hayvan dokularındaki miktarı, bu canlının yaşadığı toprak ve içtikleri sudan daha yüksek olabilmektedir. Bu durum, PAH' ların dokularda birikme eğilimini gösterdiğini ortaya koyar [14, 19, 21, 32, 43, 45, 93].

PAH' lar içinde, 100' den fazla kimyasal molekül bulunur. En çok çalışılan ve yaygın olarak bulunanı ise, benzo(a)pyran' dır. 1938' de Kenneway tarafından kömür katranında karsinojen olarak tespit edilmiştir. Yani, PAH' ların çok karsinojenik bileşikler olduğu kabul edilmektedir [39, 59].

PAH' lar grubuna giren birçok kimyasal madde vardır. Aromatik karakter gösteren bileşiklerin başlıcaları; inden, naftalen, azulen, fluoren, antrasen, naftesen, krisen, piren, benzo(a)pyran, koronen, ovalen ve fenantren' dir. Bu kondanse halka sistemleri arasında eczacılık bakımından özellikle önemli olan bileşikler, naftalen, antrasen, naftasen ve fenantren' dir [26, 33].

1.4.1. Fenantrenlerin Yapısal Özellikleri ve Aktiviteleri

Fenantren, yüzün üzerinde değişik kombinasyona sahip PAH' lardan, en çok araştırılan yaklaşık on beş kimyasal maddeden bir tanesidir. Karbon ve hidrojenden oluşan bu organik bileşiklerin, farklı bir çok türevi vardır. Genel yapı formülü şekil 2.5' de gösterilmiştir. İki ya da daha fazla halkanın orta konumlarında ki iki karbon atomunu ortaklaşa kullanarak, oluşan hidrokarbonlar arasında yer alırlar [33].



Şekil 2.5. Fenantren' in genel yapısal formülü

1.4.2. Fenantrenler ile Yapılan Çalışmalar

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), hemen hemen her ortamda dağılış gösterirler. Kirlenici etkilerinden dolayı, biyolojik dengeyi önemli ölçüde etkileyen bu maddeler, çevre ve uygulamalı mikrobiyoloji açısından oldukça önemlidir. PAH' ların yıkımları, biyokimyasal ve genetik açıdan incelenmektedir. PAH' ları parçalayan mikroorganizmaların belirlenmesi, izolasyonu ve karakterize edilmesi, çevrenin daha kısa sürede temizlenmesi açısından büyük önem taşır. Çünkü, yapılan bir çok çalışma göstermektedir ki, PAH' ların ve fenantren grubunun önemli bir kısmı mutajen ve karsinojendir [19, 21, 39, 40, 45, 50, 76, 80, 85, 98].

Değişik fenantren türevlerinin mutajenik etkileri, farklı çalışmalarda araştırılmıştır. Bunlardan bir tanesi; N-substitue fenantren 9,10 iminlerin' nin, Ames testi ve Çin hamster hücreleriyle test edilmesidir. Bazı bileşiklerin *Salmonella typhimurium* TA 100 ile direkt mutajenite, bazılarının da TA 98 ve TA 1537 suşlarıyla zayıf bir mutajenite gösterdiği belirlenmiştir [39]. 11-metoksi-16-17-dihidro-15H-siklopenta(a) fenantren TA 100 suşu ile mikrozomal enzimler varlığında zayıf mutajenite göstermiştir [19]. Krisen' in K-bölgesi oksitleri ve iminler, benzo(c) fenantren ve benzo(g) krisenden oluşan altı bileşiğin de mutajenik etki gösterdiği bu test ile tespit edilmiştir [39]. Yine başka bir çalışmada, fenantren ve krisen epoksit ve diol epoksitleri mutajeniteleri ve tümörijeniteleri açısından karşılaştırılmış ve fenantren bay-bölgesi diol epoksitleri, *S. Typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarıyla doza bağlı mutajenik aktivite göstermişler ancak krisen bay-bölge diol epoksitleri daha fazla mutajenik aktivite göstermişlerdir [98]. Öte yandan, bazı fenantren ve ksiren metilen-köprü ve keto-köprü bay-bölgesi türevlerinin *Salmonella typhimurium* TA 100 suşu ve S9 lu deneylerinde önemli bir mutajenik özellik göstermediği ancak, bu bileşiklerden 4H-siklopenta fenantrenin zayıf tümörojik aktivite gösterdiği belirlenmektedir [80].

11-amino-1,6-dihidro-15H-siklopenta(a)-fenantren, bu bileşiğin 17-keto türevi ve 2 ve 5-aminokrisen, TA 98 ve TA 100 suşlarıyla postmitokondrial karaciğer preparatı varlığında mutajenik potansiyelleri açısından karşılaştırıldığında, 11-amino hidrokarbon çok zayıf bir mutajenite gösterirken, 11-amino-17-keto'

nun daha aktif bir aktivite göstermiştir [19].

Bu çalışmada kullanılan 9-substitue fenantren bileşikleri ile yapılan çalışmalarda, bu bileşiklerin, trikomonastatik [55], fungusid [102], antihelmintik [100], karsinojenik [32], neoplazm inhibitörü [24], antitümör aktivite [12] gibi özellikler gösterdiği ortaya konmuştur. Ayrıca bu bileşikler, aldoz-redüktaz inhibitörü [17] ve insan sitokrom P450 1A1, P450 1A2 ve P450 1B1 inhibitörleri olarak kullanılmış ve son üç enzim için de polisiklik inhibitörlerin selektivitesi belirlenmiştir [56]. Ancak, bazı 9-substitue fenantren bileşiklerinin karsinojenik etki meydana getirdiği bilinmektedir [32, 76]. Genel olarak, nitroli polisiklik aromatik hidrokarbonların *Salmonella typhimurium* genlerinde mutasyonel aktiviteyi arttırdığı gözlenmiştir [50, 85].

1.5. Mutajen ve Kanserojenlerin Saptanmasında Kullanılan Kısa Zamanlı Test Sistemleri

Günlük yaşamda sık sık kullanılan doğal ya da yapay kimyasal bileşiklerin birçoğu canlıların kalıtsal bilgisinde değişikliklere neden olacak genotoksik ve kanserojenik etkilere sahiptir. Bu kimyasalların etkilerinden korunmak için, onları tespit etmek, tanımak ve etkilerini değerlendirmek gerekir. Bunlardan bazıları, DNA hasarına neden olan kanserojenlerin ve kimyasal mutajenlerin test edildiği sitogenetik testlerdir. Genelde, kısa sürede sonuç verdiği için “*kısa zamanlı testler*”(short term) olarak da bilinir. Bu testlerde, kimyasal maddelerin belirli genetik sistemlerde belirli sonuçlar verip-vermedikleri ölçülmekte ve elde edilen sonuçlarla maddelerin kanserojenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmaktadır [37].

Kısa zamanlı test sistemlerinde, Salmonella test suşları, çeşitli E.coli suşları, rat ve tavşan türleri kullanılarak hazırlanmış memeli hücre kültürleri ve memeli karaciğer, kan ve kemik iliği hücreleri, *Saccharomyces cerevisia* suşları vb. farklı organizmalar kullanılmaktadır. Ancak, özellikle bakteri türleri, bitki ve hayvan türlerine göre daha fazla tercih edilmektedir. Çünkü, bu küçük organizmalar, mutajenlere karşı daha fazla duyarlılık göstermekle birlikte, basit üreme ortamlarında kısa zamanda üreyebilmektedir. Ayrıca, bakterilerle çalışmak, hem daha kolay, hem de daha ucuzdur. Kısa zamanlı in vitro çalışmalar, kimyasal

maddelerin bakterilerde mutajenik etkilerini, hücrelerde değişime neden olup-olmadığını, DNA değişim ve tamiri üzerindeki etkisini ve memelilerdeki mutajenik etkisinin araştırılmasını kapsar [9, 62].

1.5.1. Ames Testi

Kısa zamanlı test sistemleri içerisinde en yaygın olarak kullanılan Ames testi, 1975 yılında Prof.Dr.Ames ve Dr.Marion tarafından geliştirilmiştir. Yaygın kullanılma nedeni, test parametrelerinin çok iyi standardize edilmiş olmasıdır. Temelinde, yapay mutasyon oluşturulmuş olan *Salmonella typhimurium*' un histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş (**His**⁻=oksotrof) olan suşlarının test edilen kimyasal madde ile muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyon geçirip, yabancıl tip (**His**⁺=prototrof) hale geri dönüşmesi temeline dayanır. Testin yapılışı hakkın da ayrıntılı bilgi materyal-metod kısmında verilmiştir. Bu testin, bilinen mutajen ve karsinojenlerle denemesi yapıp, geçerliliği kabul edilmiştir. Ames testi halen çok kullanılmakta ve birçok mutajenik madde test edilmektedir [5, 8, 13, 57, 73, 74, 82, 101, 102].

Ames test sistemi ile sadece kimyasal maddelerin değil, hava, su ve toprak kirliliğine neden olan birçok maddenin de mutajeniteleri belirlenmektedir. Örneğin; Kore' de üç farklı şehrin içme sularının genotoksik durumu Ames testi ile araştırılmıştır [78]. İtalya' da, Po Nehri' nin kirlenmiş kısımlarındaki mutajenite, o bölgedeki özel balıklar kullanılarak Ames testi ile belirlenmiştir [94]. Almanya' da yapılan bir çalışmada, hem toprakta, hem de havada bulunan bazı mutajenlerin mutajeniteleri, yine Ames testi ile araştırılmıştır [30]. Günümüzün sorunlarından biri olan, otomobil egsoz gazlarının toprak mutajeniteleri üzerine etkisi Ames testi, kardeş kromatid değişimi ve insan lenfosit kültüründe incelenmiştir [61].

Tıp ve farmakoloji alanlarında, yeni ilaçların gelişiminde ve ilaç ham maddesi olması düşünülen test maddelerinin toksik, mutajenik ve karsinojenik etkilerini incelemek için de Ames testi çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca bazı yiyeceklerde bulunan mutajenik maddelerin araştırılması da bu test ile yapılmaktadır. Örneğin, kızartmalarda ve pişirilmiş hamburgerde oluşan maddelerin mutajenik ve karsinojenik etkileri Ames testi ile araştırılmıştır [60].

Ames testinde, bakterilerle yapılan çalışmalarda, aynı anda ortama ilave edilen memeli metabolik aktivasyon enzimleri ile test bakterilerinin memeli metabolizması sonucunda oluşabilecek metabolitlerinin de mutajenik etkileri araştırılmaktadır.

1.5.2. Diğer Kısa Zamanlı Test Sistemleri

Bir çok mutajen ve karsinojen maddenin araştırılması, çeşitli testlerle yapılmaktadır. Bunlardan bazıları, DNA hasarına neden olan kimyasal mutajen ve karsinojenlerin test edildiği sitogenetik metodlardır. Ancak, hepsinin ortak amacı; kimyasalların mutajenik etkilerini belirlemektir. Bu testlerden bazıları şunlardır:

Kardeş kromatid değişimi (SCE=Sister chromatid exchange); kardeş kromatidlerin birbirine kontrast sağlayacak şekilde boyanmasına dayanır. Kardeş kromatidlerde meydana gelen parça değişimi, boyanma farklılığından hemen anlaşılır. Bu yöntemle sadece kromozomlardaki yapısal değişimler gözlenebildiği için, SCE yöntemi sınırlı amaçlar için kullanılabilir [2, 24, 54, 61, 68].

Mikronükleus testi; bazı mitoz anomalileri kromozom kaybı gibi durumları ortaya koyar ve bölünme yeteneğine sahip tüm hücrelere uygulanabilir. Çekirdek boyaması ile incelenir. En çok memelilerin polikromotofil (PCE) ve normokromotofil (NCE) eritrositlerinde çalışılmaktadır [36].

CA ve Commet testi; hücre bölünmesinin metafaz evresinde, kromozom hatalarının ortaya koyan sitogenetik bir yöntemdir [22, 59].

S.O.S. kromotest; DNA hasarlarını tespit etme olanağı sağlar. E. Coli' de hasarlı DNA' da S.O.S. cevabının uyarılmasına yöneliktir [25, 47, 75].

Umu testi; DNA hasarları için bir kromojenik test yöntemidir. Yüksek bakteriyotoksik etkilere sahip olan kimyasalların teşhisinde kullanılır. Bu test için bir bakteri suşu gereklidir. Umu test bakteri suşu olan, TA 1535/pS K 1002, DNA hasarına sebep olan nitro antren ve aromatik aminlere karşı hassastır [31, 75].

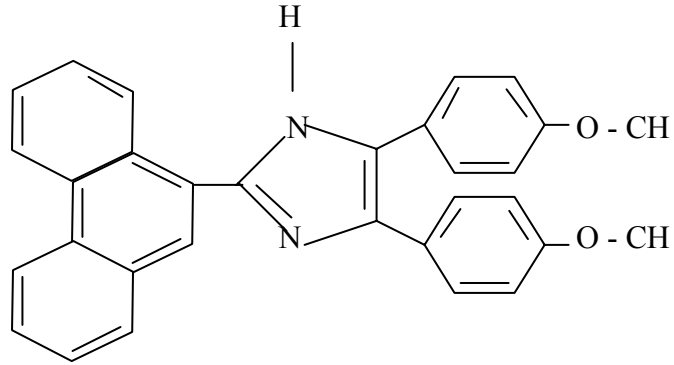
2. MATERYAL VE METOD

2.1. MATERYAL

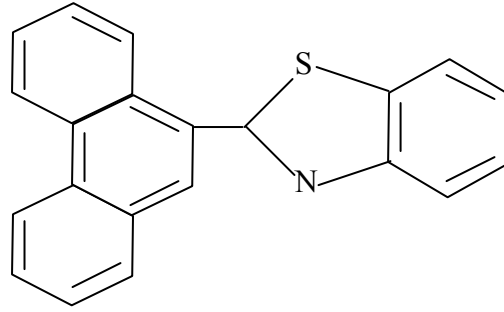
2.1.1. Genotoksisitesi Araştırılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada ilaç ön maddesi olarak kullanılması amaçlanan üç ayrı 9-sübstitue fenantren türevleri, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. İlhan IŞIKDAĞ tarafından sentezlenmiştir. Bu üç 9-sübstitüe fenanren türevi sırasıyla; 9-[4,5-di-(4-metoksifenil)-2H-imidazol-2-il]-fenantren, 9-[1H-benzotiazol-2-il]-fenantren ve 9-[1H-fenantro-(9,10-d)-imidazol-2-il]-fenantren dir. Bu maddeler, amonyum asetat ve glasiyal asetik asit varlığında bazı dion bileşikleri ile tepkimeye sokulmuş ve 4-8 saat süreyle geri akıtılmıştır. Bu reaksiyon sonunda, elde edilen madde buzlu sudan geçirilmiş ve amonyak çözeltisi ile nütürlenmiştir. Çökelti filtreden geçirilmiş ve etanolle yeniden kristal yapı elde edilmiştir. 9- sübstitue fenantren türevler, dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülmüş ve oda sıcaklığında saklanmıştır. Uygulanacak dozları belirlemek için, maddelerin 0.01µg/ plak, 0.1µg/ plak, 1µg/ plak, 10µg/ plak, 100µg/ plak konsantrasyonları hazırlanmış ve bakteriler üzerinde denenmiştir. Sonuçta, 100µg/ plak konsantrasyonu üzerindeki konsantrasyonların toksik etki yaptığı gözlenmiştir. Fenantren türevlerinin kimyasal yapıları Tablo 2.1' de gösterilmiştir.

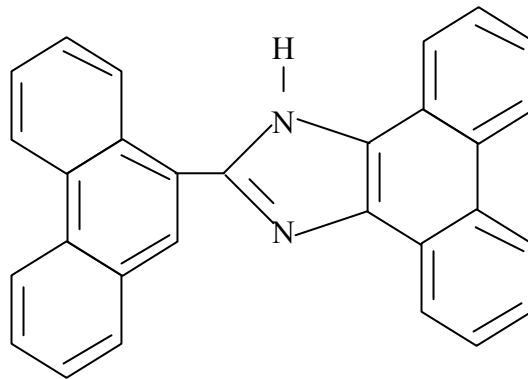
Tablo 2.1. Mutajenitesi araştırılan 9-süstitue fenantren türevleri



Madde 1. 9-[4,5-di-(4-metoksifenil)-2H-imidazol-2-il]-fenantren



Madde 2. 9-[2H-benzotiazol-2-il]-fenantren



Madde 3. 9-[1H-fenantro-(9,10-d)-imidazol-2-il]-fenantren

2.1.2. Ames Testinde Kullanılan Bakterilerin Genotip Özellikleri

Testte kullanılan *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 mutant suşları Dr. Bruce AMES (*University of California Berkeley, USA*)' den temin edilmiştir.

Tablo 2.2. TA 98 ve TA 100 suşlarının genotip özellikleri

| Mutant Suşları: | Histidin Mutasyonu: | Lipopolisakkarit: | Onarım: | R- Faktör: |
|-----------------|---------------------|-------------------|---------------|------------|
| TA 98 | his D3052 | rfa | Δ uvrB | + |
| TA 100 | his D46 | rfa | Δ uvrB | + |

his D3052: his D⁺ geni histidinol dehidrogenaz enzimini kodlar.hisD3052 mutasyonu çerçeve kayması tipinde bir mutasyon tipinde olup, nükleotit eksikliği his D⁻ geni içinde 8 kere tekrarlanan -GCGCGCGC- bölgesindedir. Bu nedenle, GCGCG- bu suş genellikle çerçeve kayması tipi mutasyonlara sebep olan mutajenik / kanserojenik kimyasallarla his⁺ hale dönüştürülür.

his D46: Bu mutasyon histidin biyosentezinde rol alan ilk enzimi kodlayan gende lösin kodunu - GAG - yerine prolin kodunun - GGG -
- CTC - - CCC - gelmesine neden olur.

rfa: Bu mutasyon hücre yüzeyini saran lipopolisakkarit örtüsünü zayıflatarak, normal hücrelere giremeyen büyük moleküllerin test bakterilerine girebilmelerini sağlar.

Δ uvrB: Nükleotit kesip-çıkarma onarım mekanizmasından sorumlu uvrB geninde delesyon meydana getiren mutasyondur. Bu kısımda normalde, uvrB⁺, chl ve bio genleri bulunur. uvrB geni, kesme onarmada görevli uvr ABC ekzonükleaz enziminin B alt birimini kodlamaktadır. Dolayısıyla, bu enzimin yokluğu mutant suşu değişik mutajenlere karşı daha hassas yapar (chl, nitrat redüktaz enzimini kodlayan enzimdir.).

R Faktör: pKM 101 Ampisilin dirençlilik geni taşıyan, hücrede çok sayıda bulunan bir plazmidir. Bu plazmidin hücrede bulunuşu, bu hücrelerde normalde bulunan ve hata frekansı yüksek olan “*error prone*” DNA onarım yolunun aktivasyonuna ve bu nedenle de kimyasalların etkisiyle veya spontan olan mutasyonların artmasına neden olur.

2.1.3. Ames Testinde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Dimetilsülfoksit(DMSO): Test edilen maddenin çözünmesi için kullanılmıştır.

3-Metil Kolantren : Metabolik aktivasyonun hızlandırılması için uyarıcı olarak kullanılmıştır.

Nutrient Broth (NB) : Bakterileri bir gece büyütmek için kullanılmıştır.

D – Biotin : HB plakları için mutasyon deneyinde kullanılmıştır.

L-Histidin-HCl : HB plakları için mutasyon deneyinde kullanılmıştır.

Sodyum Azid : Pozitif mutajen olarak steril suda çözülerek ,1.5µg/plak olarak kullanılmıştır.

2-Aminofluoren : Pozitif mutajen olarak dimetil sülfoksitte çözülerek, 10µg/ plak olarak kullanılmıştır.

4-Nitro-o-Fenilendiamin: Pozitif mutajen olarak dimetil sülfoksitte çözülerek, 20µg/ plak olarak kullanılmıştır.

Ampisilin trihidrat : NaOH' de çözülerek,HBA (master) plaklarının hazırlanması için kullanılmıştır.

D-Glukoz- 6-Fosfat : S9 karışımının hazırlanmasında kullanılmıştır.

Fosfat tamponu : S9 karışımının hazırlanmasında kullanılmıştır.

NADP : S9 karışımının hazırlanmasında kullanılmıştır.

KCl : S9 karışımının hazırlanmasında kullanılmıştır.

NaCl : S9 karışımının hazırlanmasında kullanılmıştır.

NaOH : Ampisiline direnç kontrolü ve HBA (master) plaklarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

Kristal Viyole : rfa mutasyonunu denemede kullanılmıştır.

NaH₂NH₄ : MGA ve HBA (master) plaklarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

MgSO₄.7H₂O : MGA ve HBA (master) plaklarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

K₂HPO₄ : MGA ve HBA (master) plaklarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

Sitrik Asit Monohidrat : MGA ve HBA (master) plaklarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

2.1.4. Ames Testinde Kullanılan Ortamların İçerikleri ve Hazırlanmaları

Vogel-Bonner Medium E(50X)

Kullanım : MGA ve HBA (master) Plakları

| | |
|---|-------|
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 10 g |
| Sitrik asit | 100 g |
| K ₂ HPO ₄ | 500 g |
| NaH ₂ NH ₄ (PO ₄ .4H ₂ O) | 175 g |
| Distile su | 670 g |

Maddeler yukarıda yazıldıkları sıra ile sıcak suyun içine eklenmiş ve daha sonra hacim 1lt' ye tamamlanmıştır. 1lt' lik iki kaba bölünerek, 121 °C ' de 20 dakika süreyle otoklava konulmuş ve steril edilmiştir.

Histidin / Biyotin Çözeltisi (0.5 mM)

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

| | |
|-----------------------------|---------|
| D- Biotin (M.A.247.3) | 30.9 mg |
| L- Histidin.HCl (M.A.191.7) | 24.0 mg |
| Distile su | 250 ml |

Biyotinsuyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak, çözülmüştür. Daha sonra histidin ilave edilip, 121 °C' de 20 dakika süreyle otoklava konulmuş ve +4 °C' de saklanmıştır.

Top Agar

Kullanım : Mutasyon deneyi

| | |
|------------|---------|
| Agar | 6 g |
| NaCl | 5 g |
| Distile su | 1000 ml |

Otoklavda 121°C' de 20 dakika süreyle tutularak, steril edilmiştir.

Tuz Çözeltisi (1.65M KCl+0.4M MgCl₂)

Kullanım : S9 karışımının hazırlanması

| | |
|-----|--------|
| KCl | 61.5 g |
|-----|--------|

| | |
|--------------------------------------|--------|
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 40.7 g |
| Distile su | 500 ml |

Otoklavda 121 C' de 20 dakika süreyle tutularak, steril edilmiştir.

Ampisilin Çözeltisi

Kullanım : Ampisiline direnç kontrolü ve HBA(master) plakları hazırlanması

| | |
|---------------------|--------|
| Ampisilin trihidrat | 0.8 g |
| 0.02 M NaOH | 100 ml |

Ampisilin trihidrat, 0.02 M NaOH içinde çözülüp, sterilazyon için 0.22 µm çaplı filtreden geçirilerek, +4 °C' de saklanmıştır.

%0.1 Kristal Viyole

Kullanım : rfa mutasyonunu denemede

| | |
|----------------|--------|
| Kristal viyole | 0.1 g |
| Distile su | 100 ml |

Boya ve su karıştırılarak, solusyon ışık geçirmeyen bir kapta +4 °C' de saklanmıştır.

%0.13 Biotin Çözeltisi

Kullanım : Genotip kontrolü ve HBA(master) plakları hazırlanması

| | |
|------------|--------|
| D- Biotin | 0.65 g |
| Distile su | 50 ml |

Biotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak, çözülmüş ve 121 °C' de 20 dakika süreyle otoklav edilmiştir.

%0.5 Histidin Çözeltisi

Kullanım : Genotip kontrolü ve HBA(master) plakların hazırlanması

| | |
|-----------------|--------|
| L- Histidin HCl | 2 g |
| Distile su | 400 ml |

%40 Glikoz Çözeltisi

Kullanım : MGA ve HBA(master) plakların hazırlanması

| | |
|------------|--------|
| Glikoz | 40 g |
| Distile su | 100 ml |

Glikoz , distile su içinde çözülerek, 121 °C’de 20 dakika süreyle otoklav edilmiş ve 0-4 °C ’de saklanmıştır.

Minimal Glikoz Agar (MGA) Plakları

Kullanım : Mutasyon deneyi

| | |
|----------------|-------|
| Agar | 15 g |
| Distile su | 930 g |
| 50X VB tuzları | 20 ml |
| %40 Glikoz | 50 ml |

15 g agar 2lt’ lik kapta bulunan 930 ml’lik distile suya eklenerek, çözülmüş ve 121°C’de 20 dakika süreyle otoklav edilmiştir. Çözelti biraz soğuduktan sonra steril 50X VB tuzlarından 20 ml ve % 40’ lık glikozdan 50 ml eklenmiş, karıştırılmış ve 45 °C’de tutularak, petri kutularına 30 ml’ lik miktarda dağıtılmıştır.

Histidin / Biyotin Plakları (HB Agar)

Kullanım : Histidin gereksinim deneyi

| | |
|--|--------|
| Agar | 15 g |
| Distile su | 914 ml |
| 50X VB tuzları | 20 ml |
| %40 Glikoz | 50 ml |
| Steril Histidin.HCl.H ₂ O (2 g/ 400 ml H ₂ O) | 10 ml |
| Steril 0.5 mM Biyotin | 6 ml |

Agar ve su otoklav edildikten sonra sıcakken %40 glikoz, 50X VB tuzları ve histidin eklenmiştir. Solüsyon biraz daha soğutulup, biyotin eklenmiş, karıştırılıp, petri kutularına 30 ml olarak dağıtılmıştır.

Histidin / Biyotin / Ampisilin Plakları (HBA agar)

Kullanım : Ampisiline dirençlik testi ve Master plate hazırlanması

| | | |
|--|---------|------------|
| Agar | 15 g | |
| Distile su | 914 ml | |
| 50X VB tuzları | 20 ml | 1X |
| %40 Glikoz | 50 ml | % 2.0 |
| Steril Histidin.HCl.H ₂ O (2 g/ 400 ml H ₂ O) | 10 ml | 260 µM |
| Steril 0.5 mM Biyotin | 6 ml | 3 µM |
| Steril Ampisilin (8 mg/ ml , 0.02 M NaOH içinde) | 3.15 ml | 25 µM / ml |

Agar ve su 20 dakika süreyle otoklav edildikten sonra %40 glikoz, 50X VB tuzları ve histidin bu sıcak çözeltiliye eklenmiştir. Karıştırılıp, 50 °C' ye kadar soğutulmuş, biyotin ve ampisilin eklenmiştir. Petrilere 30 ml' lik miktarlarda dağıtılmıştır (Petriler, TA98 ve TA100 için +4 °C' de 2 ay süreyle saklanabilir).

Nutrient Agar Plakları

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

a) Kristal viyole b) UV ' ye duyarlılık

| | |
|--------------------------|--------|
| Oxoid nutrient broth no2 | 25 g |
| Agar | 15 g |
| Distile su | 930 ml |

Agar, broth ve su 2 lı' lik kapta karıştırılıp, 30 dakika için otoklav edilmiştir. Karıştırılıp, 30 ml miktarlarda petri kutularına dağıtılmıştır.

Nutrient Broth Sıvı Kültür Ortamı

Kullanım : Bakterilerin gecelik kültürde büyütülmeleri

| | |
|--------------------------|--------|
| Oxoid nutrient broth no2 | 5 g |
| Distile su | 200 ml |

Broth ve su karıştırılıp, otoklav edilerek, +4 °C' de saklanmıştır.

(0.1µg / µl) Sodyum Azid Çözeltisi

Kullanım : Pozitif kontrol

1.0 mg / petri başına olmak üzere distile suda çözülerek kullanılmıştır. TA98 suşu için S9 karışımı gerektirmeyen kimyasaldır. 0-4 °C'de saklanmıştır.

(2µg / µl) 2- Aminofluorene (2AF)

Kullanım : Pozitif kontrol

1.0 mg / petri başına olmak üzere dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülerek kullanılmıştır. S9 karışımı gerektirmeyen kimyasaldır. 0-4 °C'de saklanmıştır.

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

200 µg / petri olmak üzere DMSO da çözülerek kullanılmıştır. TA98 suşu için S9 karışımı gerektirmeyen kimyasaldır. Oda sıcaklığında saklanmıştır.

(%6) 3-Metilkolantren

Kullanım : Metabolik aktivasyon hızlandırılması

3-Metilkolantren 64 g

Mısır yağı 1 ml

(80 mg/ kg olmak üzere) Mısır yağında çözülerek 0.5 ml enjekte edilmiştir.

(0.15 M) KCl Çözeltisi

KCl 11.275 g

Distile su 1000 ml

KCl, bir miktar distile suda çözülmüş, toplam hacim 1000 ml' ye tamamlanarak otoklav edilmiş ve +4 °C' de saklanmıştır.

(0.2 M) Sodyum Fosfat Tamponu (P^H : 7.4)

Kullanım : S9 karışımında

0.2 M NaH₂PO₄.H₂O 60 ml (13.8 g/ 500 ml)

0.2 M Na₂HPO₄ 440 ml (14.2 g/ 500 ml)

1 MNADP Çözeltisi (Nikotinamin Adenin Dinükleotit Fosfat)

Kullanım : S9 karışımında

NADP (M.A.765.4) 383 mg

Steril distile su 5 ml

0.22 µm delik çaplı filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

1 M Glukoz-6-Fosfat

Kullanım : S9 karışımında

Glukoz-6-fosfat 2.82 g

Steril distile su 10 ml

0.22 µm delik çaplı filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

S9 Karışımı (%10)

Mikrozom 1 ml

MgCl₂.KCl tuzları 0.2 ml

Glukoz-6-fosfat 0.05 ml

0.1 M NADP 0.4 ml

0.2 M Fosfat tamponu 5 ml

Steril distile su 3 ml

2.2. METOD

Bu çalışmada, Dr. Bruce AMES' den (Kaliforniya Üniversitesi, Berkley, CA, USA) elde edilen *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 test bakterilerinin stok kültürlerinin hazırlanması, bakterilerin genetik özelliklerinin kontrol edilmesi, mikrozomal fraksiyonunun hazırlanması; Ames/Salmonella/ Mikrozoim Testi ile Maron ve Ames (1983)' in yöntemine uygun olarak plak inkorporasyon metodu ile yapılmıştır. Deneyler, S9' lu ve S9' suz olmak üzere iki grup halinde gerçekleştirilmiştir. Her doz üç plak halinde denenmiş ve farklı zamanlarda iki bağımsız deney yapılmıştır. Ayrıca, pozitif kontrol, solvent kontrol ve spontan kontroller de deneye paralel olarak gerçekleştirilmiştir. *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 test suşları düzenli olarak, histidin ihtiyacı, kristal viyole hassasiyeti, ampisiline direçlilik, UV hassasiyeti ve sponyan geri dönüş oranı için kontrol edilmiştir.

2.2.1. Salmonella Suşlarının Kültürlerinin Ve Master Plaklarının Hazırlanması

Kağıt disklere emdirilmiş olarak gelen bakteri kültürlerinin Histidin Biotin Ampisilin (HBA) plaklarına paralel ekimleri yapılmış ve 37 °C' de 48 saat inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda iyi izole olmuş bir koloni seçilip, 2 ml Nutrient Broth (NB) ortamı içinde süspanse edilerek, bir gece (12-16 saat) 37 °C' de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, platin öze ile bir öze dolusu sıvı kültür alınıp, HBA agar üzerine çizgi ekim yapılmıştır. Bu plaklar 37 °C' de 48 saat tekrar inkübe edilerek, +4 °C' de iki ay süre ile saklanmış ve pasajlar alınmıştır.

2.2.2. Salmonella Suşlarının Stoklanması Ve Stok Kültürlerinin Açılması

Test suşlarının uzun süre canlılığını ve mutant özelliklerini koruyabilmeleri için stoklanmaları gerekmektedir. Bunun için , HBA agarda üremiş olan Salmonella suşlarından iyi izole olmuş, normal büyüklükteki bir koloni öze ile alınıp, 2 ml 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 edilip, -20 °C' de donması ve -80 °C' de

saklanması sağlanmıştır. Kültürün açılması gerektiğine, stok bakteri kültürü oda sıcaklığında eritilip, bir öze dolusu alınarak Histidin Biyotin (HB) agar plaklarına paralel ekim yapılmıştır. Bu plaklar, 37 °C’ de 48 saat inkübe edildikten sonra HB plaklarında üreyen bakterilerden iyi izole olmuş bir koloni steril transfer iğnesi ile 0.3 ml X Fosfat Buffer Salin (PBS) içinde süspanse edilmiştir. Bu bakteri süspanasyonu içine steril eküvyon (pamuklu öze) daldırılıp, fazlası tüp kenarında sıklıdıktan sonra HBA plaklarına 4-5 çizgi halinde paralel ekim yapılmış ve 37 °C’ de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda, master plaklar yenilenecek deney sırasında gecelik kültür hazırlanmıştır.

2.2.3. Salmonella Suşlarının Kontrol Testlerinin Yapılması

2.2.3.1. Bakterilerin Genotip Özelliklerinin Kontrol Edilmesi

Ames testi; Salmonella / mikrozom testi olarak ta bilinir. Bu çalışmada, kullanılan mutant bakterilerin genetik kontrolü, saklanmaları ve deneyin yapılışı Maron ve Ames (1983)’ in yöntemine uygun olarak yapılmıştır. Testin güvenilirliği açısından, test suşlarının genetik yapılarındaki mutasyon durumları aşağıdaki sıraya göre gerçekleştirilmiştir.

Histidin Gereksinimi Kontrolü

Bakterilerin minimal glukoz agar (MGA) üzerine ekilmeleri, His-karakteri, His+ karakterden ayırt etmek için yapılmaktadır. Bu nedenle, NB içinde büyütülen kültürlerden, steril kürdan ile his- bakterilerinden iki yere (MGA ve HBA plaklarına) ekim yapılmıştır. Plaklar 37 °C’ de, 48-72 saat süreyle inkübe edilmiş ve süre sonunda HBA plaklarında üreme gözlenirken, MGA üzerinde üreme gözlenmemiştir. Bu sonuç, bakterilerin “His⁻ mutasyonu” nu taşıdığını göstermektedir.

rfa Mutasyonu Kontrolü

Bu mutasyon, bakteri hücre zarının lipopolisakkarit yapısında oluşur ve hücre zarının geçirgenliğini artırır. Varlığı, kristal viyole hassasiyet testi ile tanımlanır. Bu test için, 0.1 ml’ lik bakteri kültürü 45 °C’ de tutulan, 2 ml’ lik top

agar içine katılmıştır. Daha sonra, bakterilerin çalkalanarak agar içinde homojen dağılımı sağlanmıştır. Nutrient agar plaklarına döküldükten sonra, agarın katılacağı için 5-10 dakika beklenmiş, 0.5 cm çapında kesilmiş olan steril filt re kağıdı diskleri her plağa bir adet gelecek şekilde plağın ortasına yerleştirilmiştir. Üzerine 1µg/ ml olan kristal viyolede mikro pipet yardımıyla 10µl konulmuş, plaklar 37 °C’ de 12 saat tutulduktan sonra, disk çevresinde bakteri büyümesinin görülmediği alan çapı ölçülmüştür. Rfa mutasyonu taşıyan bakterilerin yaklaşık 14mm çapında bir zon oluşturdukları görülmüş, bu zonda, boya maddesi bakterilerin içine kolayca girip, etkilediği için bakterilerin üremesine engel olmuştur. Bu sonuç, kullanılacak bakterilerin “rfa mutasyonu” nu taşıdığını göstermektedir.

UvrB Mutasyonu Kontrolü

Bu mutasyon, bakterilerin Ultra viyole (UV) ışınlarının neden olduğu replikasyon hatalarının düzeltilmesi için gerekli olan DNA onarım mekanizması engeller ve bu mutasyonun varlığı UV ışınlarına duyarlılık testi ile tanımlanır. Bunun için, Nutrient agar bulunan plağın bir kenarından diğer kenarına uzanacak şekilde çizgi ekimi yapılmış, plağın kapağı açılarak, ekilen kısmın yarısı bir plastikle kapatılmıştır. Daha sonra, 8 saniye süreyle 33 cm uzaktan 15 Watt gücünde bir UV lambasıyla ışınlanmıştır. Işınlanmadan sonra, plağın kapağı kapatılmış ve 37 °C’ de 24 saat inkübe edilmiştir. Kullanılan ışın dozu uvrB mutantlarını öldürecek düzeyde olduğundan, ışınlanan kısımda büyüme görülmemiş ve kapatılan kısımda ise, büyüme olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç, kullanılacak bakterilerin “uvrB mutasyonu”nu taşıdığını göstermektedir.

R Faktör Varlığı Kontrolü

Test bakterilerinin içerdiği R faktörü taşıyan pK M101 plazmidlerinin kaybolup-kaybolmadıkları, ampisiline dirençliliğin ölçümü ile tespit edilir. Bunun için, NB’ da bir gece büyütülen mutant ve yabanıl tip bakteriler, her ikisi de aynı plağa (% 0.8 ampisilin / 0.02 M NaOH) olmak üzere, ampisilin plaklarına çizgi ekimi yapılmıştır. 37 °C’ de 24 saat inkübe edildikten sonra mutant bakterilerin

plazmid taşıdıkları için büyüme gösterdikleri görülmüştür. Bu sonuç, kullanılacak bakterilerin R faktör plazmidlerini içerdiklerini göstermektedir.

Spontan Olarak Geri Dönüş Sıklığının Kontrolü

Bakteri suşlarının spontan olarak (uyarılmadan, kendiliğinden) his-fenotipinden, his+ fenotipine dönüşmesi belirli sınırlar içinde gerçekleşir. Bu sınırlar; *Salmonella typhimurium* TA 98 için 30-50 revertant / plak ve TA 100 için ise, 120-200 revertant / plak' tır. Bu test için oxoid no.2 Nutrient Broth' a 12-14 saat süreyle 37 °C' de büyütülen test bakterilerinden 0.1 ml alınarak 45 °C' de tutulan 0.05 mM histidin-biyotin içeren üst agar içine eklenmiştir. Çalkalanarak, 37 °C' de yarım saat ısıtılmış MGA plaklarına dökülmüştür. 48 saat 37 °C' de inkübe edilmiş ve plaklarda görülen koloniler sayılarak histidin revertantlarının sayısı belirlenmiştir. Bu işlem her bir suş için 3 ayrı plak olmak üzere yapıldığından bunların ortalamaları alınmıştır.

2.2.3.2. Sıvı Kültürlerin ml' sindeki Bakteri Sayısının Belirlenmesi

Bu deneyde kullanılan gecelik kültürün ml' sinde bulunan bakteri sayısını belirlemek için; HBA plaklarından bir koloni alınarak NB içinde süspansiyon edildikten sonra, çalkalamalı inkübatörde 37 °C' de 1 gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, gecelik kültürün NB ile 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} ve 10^{-6} olacak şekilde bir dizi seyreltmeleri hazırlanmış, bu seyreltmelerden NA plaklarına 10µl' lik miktarlarda damlatılarak, ekim yapılmıştır. 37 °C' de 24 saat inkübe edildikten sonra plaklardaki koloniler sayılmış ve ml' sinde 2.4×10^8 bakteri olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, bakteri kültürünün optik densitesi 650 nm boyunda spektrofometre ile ölçülüp, saf kültürün (10) densitesi 0.165 olarak belirlenmiştir.

2.2.4. Memeli Karaciğer Mikrozomlarının Hazırlanması

Araştırılan test maddelerinin metabolik ürünlerinin mutajen olup olmadığını tespit etmek için, kullanılması gereken mikrozom ekstresi *Rattus norvegicus* rat' lardan elde edilmiştir. Bunun için ratların karın boşluğuna öldürülmelerinden 5 gün önce 200 mg/ml konsantrasyonunda mısır yağında çözülmüş, 3-metil kolantren 80mg/kg vücut ağırlığı miktarında olacak şekilde

enjekte edilmiştir. Yaklaşık 200 g ağırlığındaki rat, kuyruğundan tutulup başın gerisi sert bir yere vurularak öldürülmüş, hayvan ayaklarından otopsi kutusuna sabitleştirilmiştir. Daha sonra, steril makas ve bistüri ile karaciğeri aseptik şartlarda çıkarılmıştır.

Çıkarılan karaciğer 0-4 °C' de soğutulmuş olan 0.15 M KCl çözeltisine 1g karaciğer, 1ml KCl olacak şekilde önceden tartılmış steril behere konulmuş, tekrar yapılan tartımla karaciğerin ağırlığı bulunmuştur. Sonra, birkaç kez soğuk KCl ile yıkanmış, yıkanan karaciğer yeni behere geçirilerek 3ml 0.15M KCl/1g karaciğer oranı gözetilerek KCl eklenmiştir. Karaciğer steril makasla küçük parçalara ayrılmış, doku parçaları daha sonra homojenize edilmiştir. Homojenat 900xg' de 10 dakika süreyle santrifüjlenmiş, süpernetant kısmı (S9) alınmış ve bundan 0.1 ml ayrılarak S9 preperasyonunun steril olup olmadığı NA üzerine ekim yapılarak saptanmıştır. Kontaminasyon olduğu durumlarda S9 preperasyonu 0.45 µm çaplı filtre kağıtlarından geçirilerek steril hale getirilmiş ve -20 C' de saklanmıştır.

2.2.5. Karaciğer S9 Karışımının Hazırlanması

S9 fraksiyonunda bulunan mikrozomal enzimlerin metabolik aktivasyon reaksiyonlarını yürütebilmeleri için gereken kofaktörler S9 homojenatına katılmıştır. 8 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 5 mM Glukoz-6-Fosfat, 4 mM Sodyum fosfat tamponu (p^H: 7.4) ve S9 (0.004 ml S9 / 1 ml S9 Karışımı) (Maron ve Ames, 1983).

2.2.6. Sitotoksik Etkinin Saptanması

Kullanılan test bileşiklerinin, test suşları için öldürücü olmayan dozlarının saptanması amacıyla, üst agara (top agar) 0.1 ml bakteri kültürü ve en çok 0.1 ml olacak şekilde değişik konsantrasyonlardaki test bileşiği çözeltisi eklenmiştir. Karışım, NA' lara dökülerek plaklar 37 °C' de 12 saat inkübe edilmiş, inkübasyondan sonra plaklardaki koloni sayıları kontrol plakları ile karşılaştırılarak, toksik olmayan dozlar saptanmıştır. Bu dozun altındaki beş doz seviyesi denenmiştir.

2.2.7. Ames Mutajenite Testi

Bu deneyin amacı; daha önceden büyümesi için ‘‘Histidin’’ amino asidine ihtiyaç duyan oksotrofik suşların, kullanılan test maddeleri ile tekrar histidin sentezleyebilir (prototrofik) hale dönüşmesi temeline dayanır.

2.2.7.1. S9’ suz (-) Deney

İçinde 2 ml top agar bulunan tüplere 0.1 ml test bileşiği (DMSO içinde çözülmüş fenantren türevi), 0.2 ml histidin- biyotin çözeltisi ve 0.1 ml gecelik bakteri kültürü (12-16 saatlik) ($1-2 \cdot 10^9$ bakteri / ml) eklenmiş ve iyice çalkalanıp 37 °C’ de ısıtılmış minimal glukoz agar (MGA) plaklarına dökülmüştür. Bu plaklar hızla çevrilerek homojen dağılım sağlanmış, 15 dakika donması beklendikten sonra 37 °C’de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilerdeki koloniler sayılmış, deney her doz için dört ayrı plak olmak üzere hazırlanarak yapılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesi için deneylere paralel olarak; spontan kontrol, solvent kontrol (DMSO) ve pozitif kontrol (diagnostik) olarak TA 98 suşu için, 4-Nitro-o-fenilendiamin, TA 100 suşu için Sodyum azid kullanılmıştır. Her plaktaki revertant koloni sayılarının aritmetik ortalaması alınmıştır.

2.2.7.2. S9’ lu (+) Deney

S9 varlığında yapılan deneylerde, 2ml’ lik top agara 0.1ml gecelik bakteri kültürü, 0.1ml test maddesi, 0.2ml histidin-biyotin solusyonu ve 0.5ml S9 karışımı eklenmiştir. Tüpler iyice çalkalanarak yine 37 °C’ de ısıtılmış MGA plaklarına dökülerek, homojen dağılımı sağlanmış ve 15 dakika donması beklendikten sonra, 37 °C’ lik etüvde 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra, his+ kolonilerinin sayımı yapılmış, revertant koloni sayılarının aritmetik ortalaması alınmıştır. Ayrıca, deneyde, TA 98 ve TA 100’ ün spontan mutasyonu (kendiliğinden geri dönüş sıklığı) solvent kontrolü olan DMSO ve 2-Aminofluoren (2AF) deneye paralel olarak denenmiş ve sonuçları kaydedilmiştir.

2.2.7.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Bu çalışmada, uç ayrı 9-süstitüe fenantren türevinin mutajenik aktivitesi *Salmonella typhimurium*' un TA 98 ve TA 100 mutant suşları ile araştırılmıştır. Her doz uç paralel plak ile aynı anda test edilmiş ve farklı zamanlarda iki bağımsız deney yapılmıştır. Ayrıca, test bileşenlerinin etkilerinin memelilerin metabolik aktivasyonları sonucunda değişip değişmediğini belirlemek için deney S9 fraksiyonu varlığında da aynen tekrar edilmiş, sonuçlar standart hataları ile birlikte ortalamaları alınarak, istatistiksel açıdan “*student-t testi*” ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla, Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi İstatistik Fakültesi Bölümünden alınan “*SPSS-WINDOWS*” paket programı kullanılmıştır. 9 süstitüe fenantren türevlerinin S9 fraksiyonu yokluğunda ve varlığında, TA 98 için olan deney sonuçları Tablo 3.1’ de ve TA 100 için olan deney sonuçları ise, Tablo 3.2’ de gösterilmiştir.

3. BULGULAR

Bu çalışmada, üç ayrı 9-substitue fenantren türevinin mutajenik aktivitesi Ames/ Salmonella/ Mikrozom Test yöntemi ile *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 mutant suşları kullanılarak araştırılmıştır.

Deneyler, her iki suş için, S9 mikrozomal fraksiyon yokluğunda ve varlığında olmak üzere iki seri halinde gerçekleştirilmiş, her test maddesi de, 0.01µg/plak, 0.1µg/plak, 1µg/plak, 10µg/plak ve 100µg/plak olarak beş doz halinde uygulanmıştır. Her doz üç paralel plak ile aynı anda test edilmiş ve farklı zamanlarda iki bağımsız deney yapılmıştır. Aynı uygulamalar, S9 fraksiyonu kullanılarak da, aynen tekrar edilmiştir. Bu yolla, test bileşenlerinin mutajenik etkilerinin memelilerin metabolik aktivasyonları sonucunda değişip değişmediği de kontrol edilmiştir.

Sonuçlar, standart hataları ile birlikte ortalamaları alınarak, istatistiksel açıdan “*student-t testi*” kullanılarak, çözücü kontrolü olan DMSO sonuçları ile karşılaştırılıp, değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, TA 98 suşları için, Tablo 3.1’ de, TA 100 suşları için, Tablo 3.2’ de verilmiştir. Tablolarda, test maddelerinin her dozu için revertant koloni sayılarının ortalamaları “*ortalama±stn hata*” şeklinde gösterilmiştir. Her bir test maddesinin beş ayrı dozunun S9 fraksiyonu yokluğunda ve varlığında TA 98 suşu ile verdikleri revertant koloni sayıları 1.madde için Şekil 3.1’ de, 2.madde için Şekil 3.2’ de ve 3.madde için Şekil 3.3’ de gösterilmiştir. Aynı maddelerin S9 fraksiyonu yokluğunda ve varlığında TA 100 suşu ile verdikleri revertant koloni sayıları ise, Şekil 3.4, Şekil 3.5 ve Şekil 3.6’ da gösterilmiştir. Ayrıca sonuçlar, TA 98 ve TA 100 suşları için, S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda, DMSO kontrol petriplerindeki koloni sayısı ile deney grupları petriplerindeki koloni sayıları arasındaki fark alınarak; Şekil 3.7, Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11 ve Şekil 3.12’ de gösterilmiştir.

3.1. Fenantren' nin Üç Ayrı Türevinin, S9 Fraksiyonu Yokluğunda ve Varlığında Salmonella typhimurium TA 98 Suşu ile Verdiği Sonuçlar

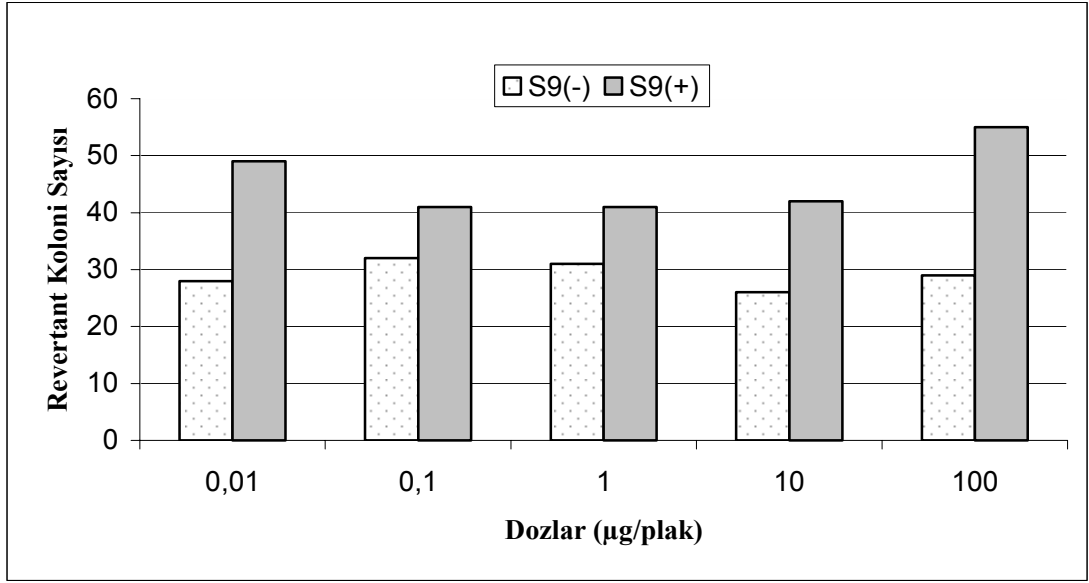
Tablo 3.1. 9-süstitue fenantren türevlerinin S9 fraksiyonu yokluğunda ve varlığında TA 98 ile verdikleri revertant koloni sayıları

| TEST BİLEŞENİ | DOZ (µg / plak) | REVERTANT KOLONİ SAYISI | |
|--|--------------------|-------------------------|-------------|
| | | TA 98 | |
| | | S9 (-) | S9 (+) |
| 9-[4,5-di-(metoksifenil)- 2H-imidazol-2-il]-fenantren | 0.01 | 28.6 ± 3.7 | 49.3 ± 14.4 |
| | 0.1 | 32.0 ± 0.0 | 41.3 ± 3.2 |
| | 1 | 31.3 ± 10.5 | 41.6 ± 4.7 |
| | 10 | 26.3 ± 3.2 | 42.0 ± 3.6 |
| | 100 | 29.6 ± 2.5 | 55.3 ± 17.6 |
| 9-[2H-benzotiazol-2-il]-fenantren | 0.01 | 37.6 ± 1.5 | 60.0 ± 13.0 |
| | 0.1 | 27.6 ± 2.0 | 53.0 ± 3.6 |
| | 1 | 24.0 ± 8.5 | 52.0 ± 13.8 |
| | 10 | 27.6 ± 3.0 | 48.0 ± 9.1 |
| | 100 | 26.3 ± 6.5 | 47.3 ± 5.8 |
| 9-[1H-fenantro-(9,10-d)-imidazol-2-il] -fenantren | 0.01 | 28.0 ± 2.0 | 63.0 ± 10.8 |
| | 0.1 | 26.6 ± 0.5 | 52.6 ± 1.5 |
| | 1 | 23.0 ± 4.5 | 45.3 ± 8.5 |
| | 10 | 29.6 ± 1.1 | 48.0 ± 4.1 |
| | 100 | 22.6 ± 2.5 | 57.3 ± 4.7 |
| 4-nitro-o-fenilendiamin (AZN) | 20 | 985 ± 87.5 | - |
| 2-Aminoflouren (2 AP) | 10 | - | 894 ± 27.2 |
| Dimetilsülfoksit (DMSO) | 100 | 23.0 ± 4.1 | 45.0 ± 3.6 |

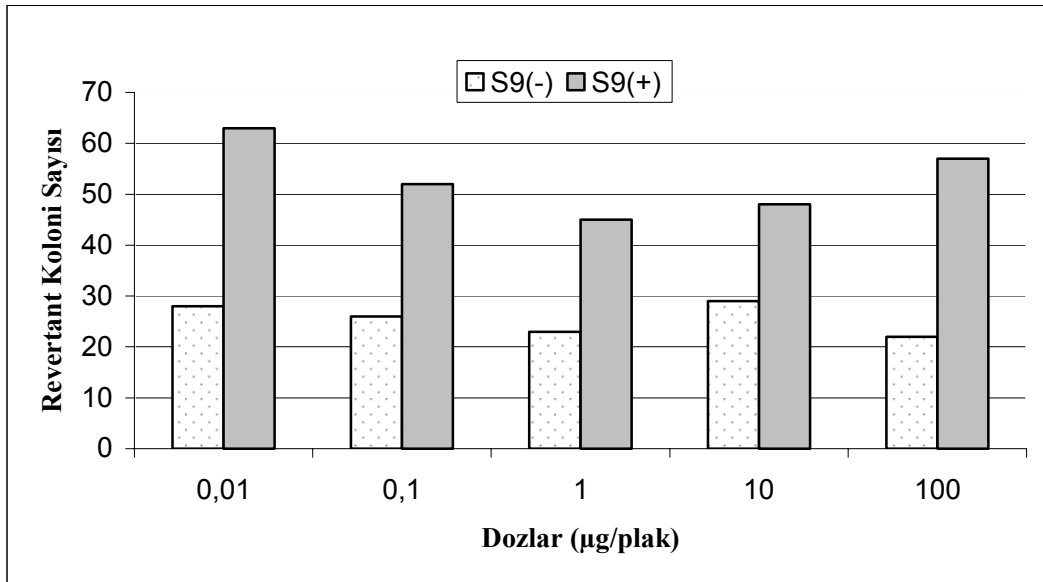
3.2. Fenantren' nin Üç Ayrı Türevinin, S9 Fraksiyonu Yokluğunda ve Varlığında Salmonella typhimurium TA 100 Suşu ile Verdiği Sonuçlar

Tablo 3.2. 9-süstitue fenantren türevlerinin S9 fraksiyonu yokluğunda ve varlığında TA 100 ile verdikleri revertant koloni sayıları

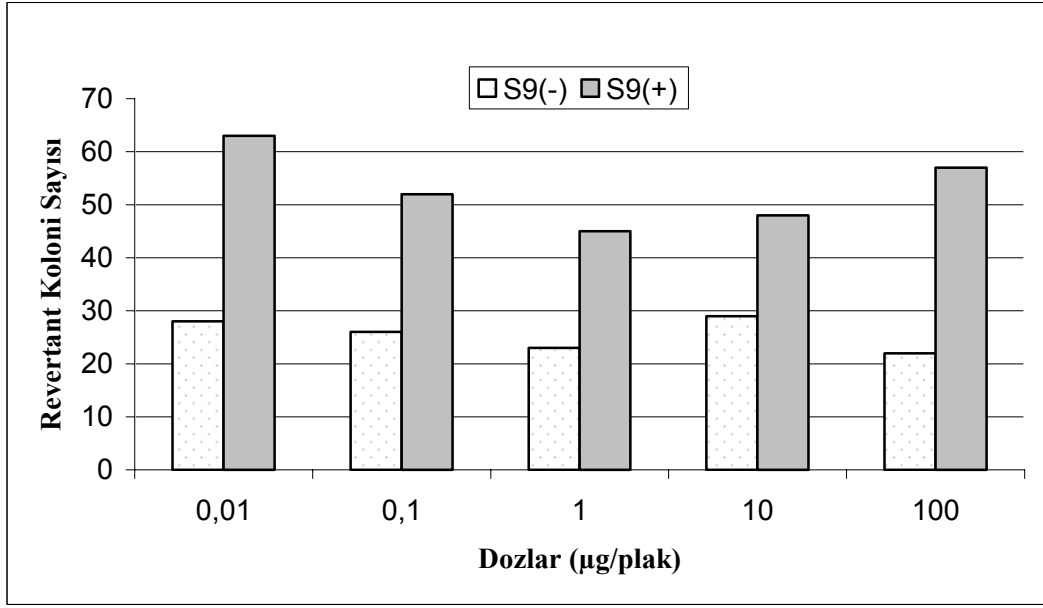
| TEST BİLEŞENİ | DOZ (µg / plak) | REVERTANT KOLONİ SAYISI | |
|--|--------------------|-------------------------|-------------|
| | | TA 100 | |
| | | S9 (-) | S9 (+) |
| 9-[4,5-di-(metoksifenil)- 2H-imidazol-2-il]-fenantren | 0.01 | 84.3 ± 5.8 | 82.6 ± 3.5 |
| | 0.1 | 86.3 ± 5.5 | 66.0 ± 6.0 |
| | 1 | 95.3 ± 1.5 | 69.0 ± 13.4 |
| | 10 | 90.6 ± 10.0 | 79.3 ± 4.0 |
| | 100 | 111.3 ± 1.5 | 88.3 ± 11.9 |
| 9-[2H-benzotiazol-2-il]-fenantren | 0.01 | 87.3 ± 2.5 | 89.0 ± 13.4 |
| | 0.1 | 90.0 ± 13.1 | 95.0 ± 3.6 |
| | 1 | 101.6 ± 19.4 | 77.6 ± 10.7 |
| | 10 | 82.3 ± 9.5 | 74.6 ± 4.7 |
| | 100 | 81.3 ± 2.0 | 76.6 ± 3.5 |
| 9-[1H-fenantro-(9,10-d)-imidazol-2-il] -fenantren | 0.01 | 83.3 ± 4.1 | 81.0 ± 2.6 |
| | 0.1 | 84.6 ± 6.6 | 79.6 ± 4.5 |
| | 1 | 66.6 ± 2.5 | 72.0 ± 1.7 |
| | 10 | 74.6 ± 1.5 | 79.6 ± 1.5 |
| | 100 | 98.6 ± 0.5 | 70.3 ± 2.5 |
| Sodyum azid (AZ) | 1.5 | 736 ± 41.7 | - |
| 2-Aminoflouren (2 AP) | 10 | - | 886 ± 36.5 |
| Dimetilsülfoksit (DMSO) | 100 | 83.0 ± 11.5 | 86.0 ± 9.5 |



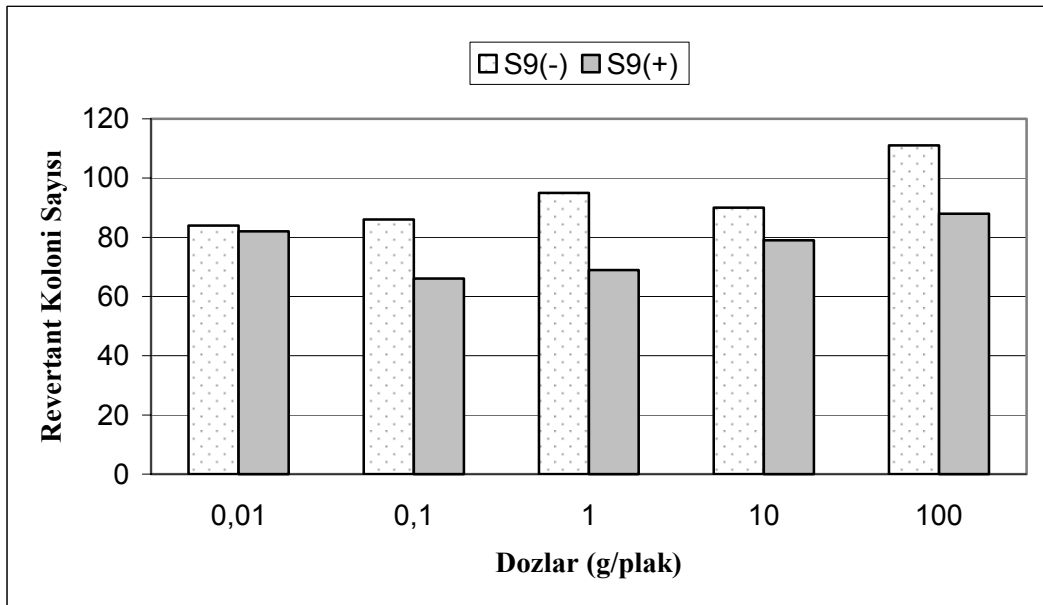
Şekil 3.1. *S.typhimurium* TA 98 suşu ile 9-[4,5-di-(4-metoksifenil)-2H-imidazol-2-il]-fenantren bileşiğinin S9 fraksiyonu yokluğunda ve varlığında verdikleri revertant koloni sayıları



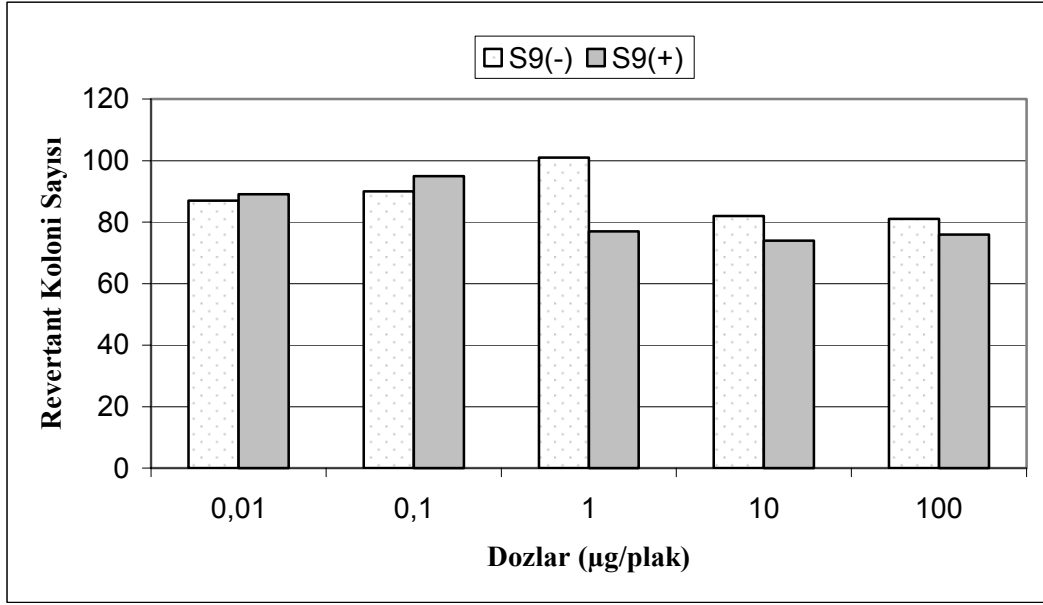
Şekil 3.2. *S.typhimurium* TA 98 suşu ile 9-[1H-benzotiazol-2-il]-fenantren bileşiğinin S9 fraksiyonu yokluğunda ve varlığında ile verdikleri revertant koloni sayıları



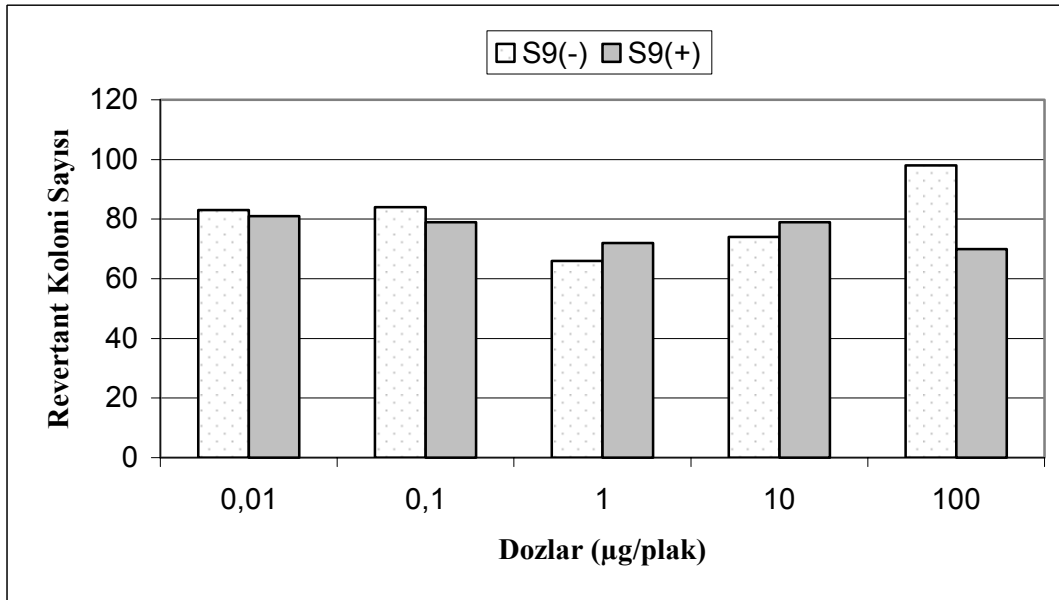
Şekil 3.3. *S.typhimurium* TA 98 suşu ile 9-[1H-fenantro-(9,10-d)-imidazol-2-il]-fenantren bileşiğinin S9 fraksiyonu yokluğunda ve varlığında ile verdikleri revertant koloni sayıları



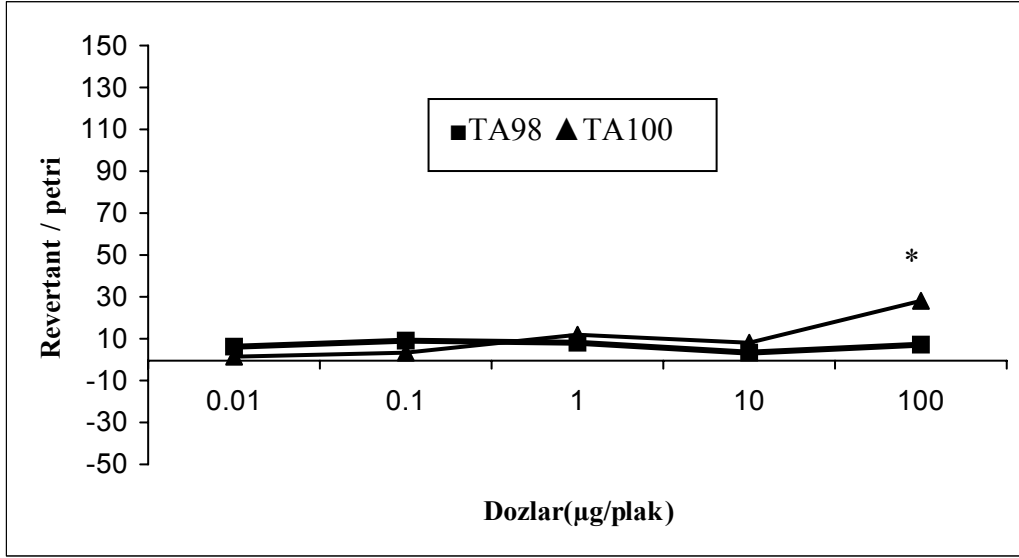
Şekil 3.4. 9-[4,5-di-(4-metoksifenil)-2H-imidazol-2-il]-fenantren bileşiğinin S9 fraksiyonu yokluğunda ve varlığında TA 100 ile verdikleri revertant koloni sayıları



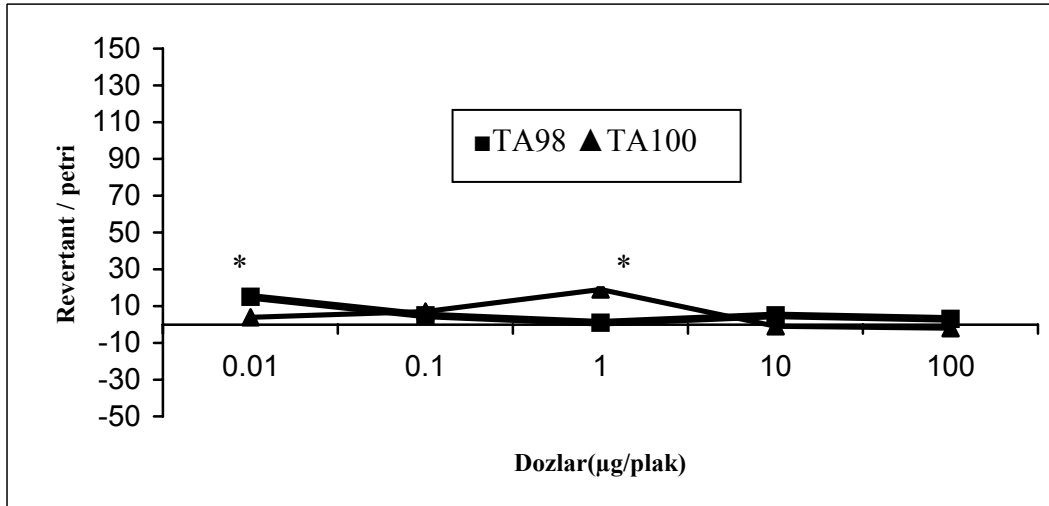
Şekil 3.5. 9-[1H-benzotiazol-2-il]-fenantren bileşiğinin S9 fraksiyonu yokluğunda ve varlığında TA 100 ile verdikleri revertant koloni sayıları



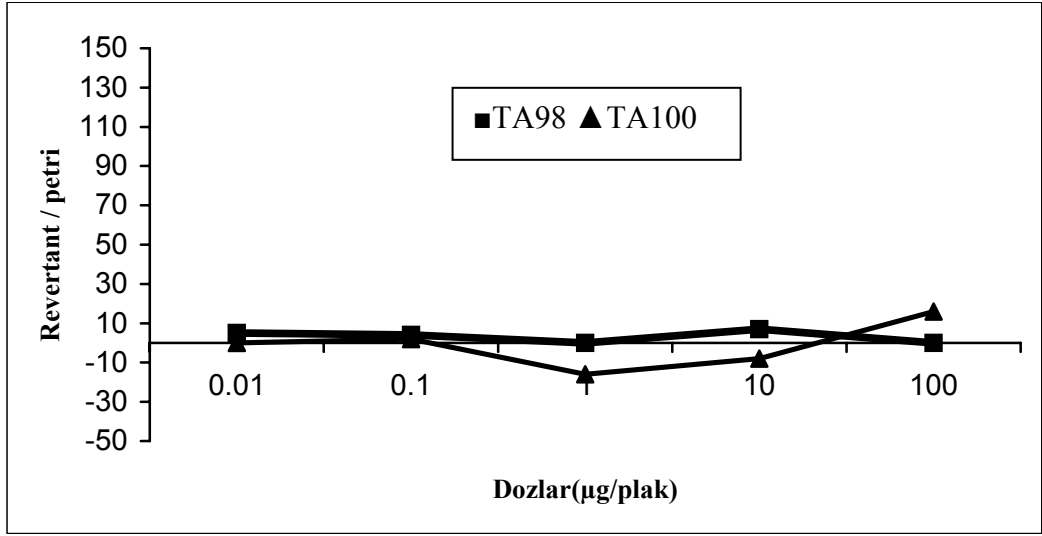
Şekil 3.6. 9-[1H-fenantro-(9,10-d)-imidazol-2-il]-fenantren bileşiğinin S9 fraksiyonu yokluğunda ve varlığında TA 100 ile verdikleri revertant koloni sayıları



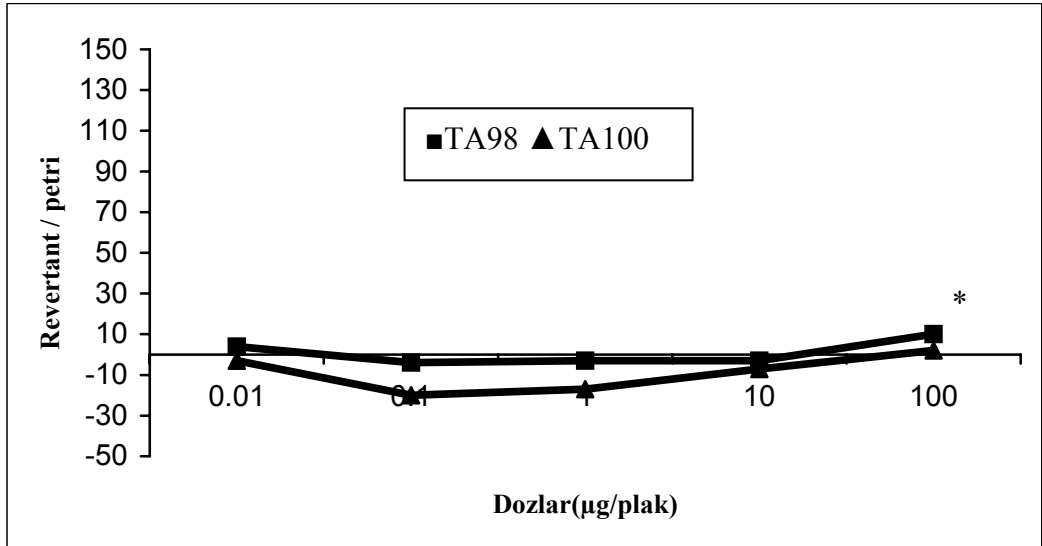
Şekil 3.7. 9-[4,5-di-(4-metoksifenil)-2H-imidazol-2-il]-fenantren bileşiğinin S9 fraksiyonu yokluğunda TA98 ve TA100 suşları üzerindeki DMSO kontrol petrilerindeki koloni sayısı ile deney grupları petrilerindeki koloni sayısı arasındaki farkın doza bağlı gösterimi, (*P≤0.05)



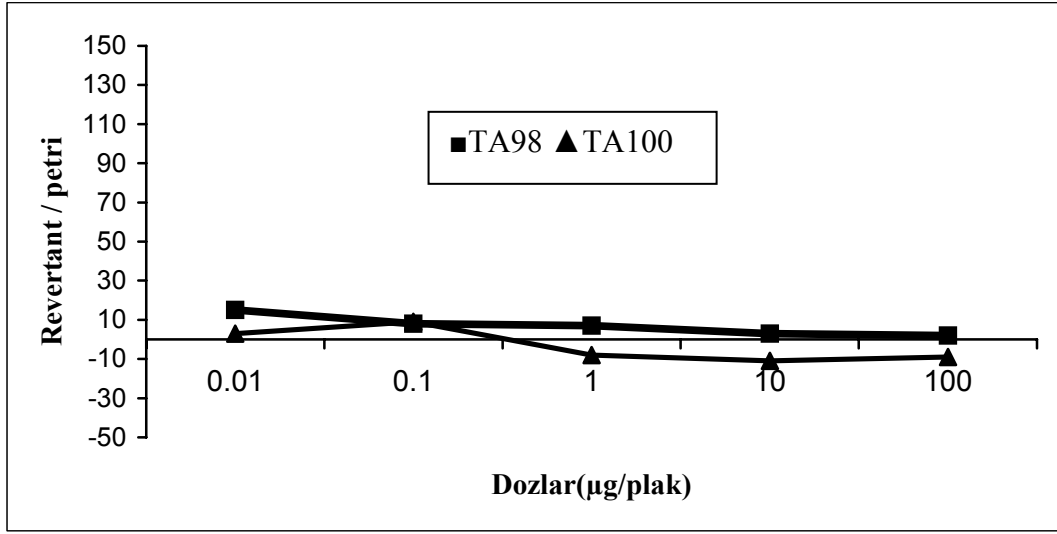
Şekil 3.8. 9-[1H-benzotiazol-2-il]-fenantren bileşiğinin S9 fraksiyonu yokluğunda TA98 ve TA100 suşları ile üzerindeki DMSO kontrol petrilerindeki koloni sayısı ile deney grupları petrilerindeki koloni sayısı arasındaki farkın doza bağlı gösterimi, (*P≤0.05)



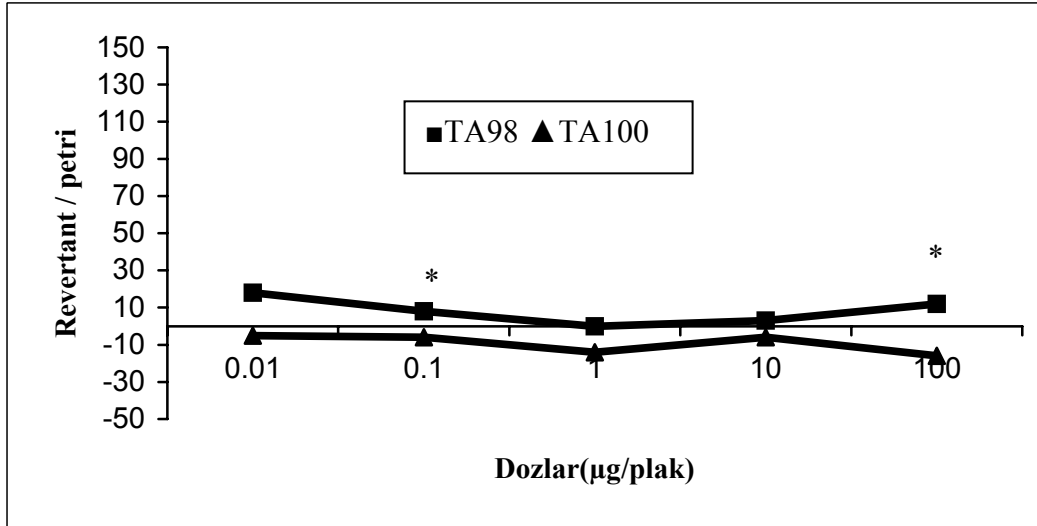
Şekil 3.9. 9-[1H-fenantro-(9,10-d)-imidazol-2-il]-fenantren bileşiğinin S9 fraksiyonu yokluğunda TA98 ve TA100 suşları ile üzerindeki DMSO kontrol petrilerindeki koloni sayısı ile deney grupları petrilerindeki koloni sayısı arasındaki farkın doza bağlı gösterimi



Şekil 3.1 9-[4,5-di-(4-metoksifenil)-2H-imidazol-2-il]-fenantren bileşiğinin S9 fraksiyonu varlığında TA98 ve TA100 suşları üzerindeki DMSO kontrol petrilerindeki koloni sayısı ile deney grupları petrilerindeki koloni sayısı arasındaki farkın doza bağlı gösterimi, (*P≤0.05)



Şekil 3.11. 9-[1H-benzotiazol-2-il]-fenantren bileşiğinin S9 fraksiyonu varlığında TA98 ve TA100 suşları ile üzerindeki DMSO kontrol petrilerindeki koloni sayısı ile deney grupları petrilerindeki koloni sayısı arasındaki farkın doza bağlı gösterimi



Şekil 3.12. 9-[1H-fenantro-(9,10-d)-imidazol-2-il]-fenantren bileşiğinin S9 fraksiyonu varlığında TA98 ve TA100 suşları üzerindeki DMSO kontrol petrilerindeki koloni sayısı ile deney grupları petrilerindeki koloni sayısı arasındaki farkın doza bağlı gösterimi, (*P≤0.05)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Yaşadığımız yüzyılda, kimyasal maddelerin yaşamımızdaki yeri ve önemi o kadar artmış ve bizler bu maddelerle o kadar içli dışlı yaşar hale gelmişiz ki; bu kimyasal maddelerin biyolojik aktiviteleri ve sağlığımız üzerindeki etkileri çok sık yapılan araştırmaların ana konusu haline gelmiştir. Bu yüzden, günlük hayatta farklı nedenlerle ve yollarla maruz kaldığımız kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılması oldukça önem kazanmıştır. Bu doğrultuda, kimyasal maddelerin mutajenik etkileri çeşitli test yöntemleri ile araştırılmakta ve Dünya Sağlık Örgütü' nün (WHO) belirlenmiş olduğu sınırlar içerisindeki yeri ve özellikleri belirlenmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO); tıp, eczacılık ve kozmetik alanlarında geliştirilen kimyasal maddelerin herhangi bir ilaç yapımında kullanılmadan önce, mutajenik özelliklerinin belirlenmesini zorunlu hale getirmiştir [31, 63, 90].

Kimyasal maddelerin çokluğu ve çeşitliliği, onların yapı ve aktivitelerini araştıran test sistemlerinin de gelişmesine ve farklılaşmasına neden olmuştur [2, 24, 25, 47, 54, 59, 61, 75]. Örneğin; temizlik malzemelerinin çoğunda bulunan Rokanol B2 ve Rokamid R1 gibi yüzeysel aktivasyonu sağlayan bu iki maddeye maruz kalan kişilerin, mutajenite potansiyeline sahip olup olmadıkları TA 97, TA 98 ve TA 100 suşları kullanılarak, çok etkin olarak kullanılan Ames Testi ile araştırılmaktadır [88]. Ancak, insan sağlığı ile ilgili olarak geliştirilmiş kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin tek bir test yöntemiyle test edilmesi yeterli olmamaktadır. Çünkü, farklı test yöntemleri ya da farklı organizmalar kullanılarak yapılan testlerde, farklı sonuçlar alınabilmektedir [47, 68]. Örneğin, deniz kirliliğinin neden olduğu mutasyon oranını araştırmak için yapılan bir çalışmada; midyeler, *E. Coli*, ve *S. Typhimurium* suşları gibi çeşitli canlı grupları kullanılmış, denize atılan endüstriyel atıkların, ağır metallerin, hidrokarbonlu atıkların ve diğer çevre kirleticilerin seçilen bu canlılar üzerinde toksik ve mutajenik yarattığı belirlenmiştir [1, 35, 42, 97]. Ames testi başta olmak üzere birçok kısa zamanlı test sistemlerinde; *Salmonella typhimurium*' un farklı suşları kullanılarak yapılmaktadır [5, 30, 39, 40, 49, 50, 73, 75, 101, 102]. Örneğin, TA 98 suşu, çeşitli çerçeve kayması mutajenlerinin teşhisinde kullanılırken, TA 100 suşu baz değişimi mutajenlerinin teşhisinde kullanılmaktadır [73].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, orijinal diazo fenantren analogları [101], benzidin ve analogları [23] ve başka birçok kimyasal madde, çeşitli etkileri açısından araştırılmaktadır. Bu kimyasal maddeler içinde oldukça geniş bir yer tutan, sübstitue fenantren türevleri; polisiklik ya da heterosiklik aromatik halka yapısına sahiptirler [44, 93]. Çevremizde doğal olarak şekillenebilir; havada suda ve toprakta bulunabilirler. Ayrıca, besinlerimiz içinde pişirme sırasında da (ızgara, közleme gibi) oluşabilirler [14, 60, 97].

Bu çalışmada, orijinal olarak sentezlenen 9-sübstitue fenantren türevlerinden üç tanesi mutajenik potansiyelleri açısından Ames/Salmonella/Mikrozom Test yöntemi ile araştırılmıştır. Bu bileşikler, ilaç ön maddesi olarak düşünüldüğünden, genotoksik potansiyellerinin belirlenmesi oldukça önem kazanmıştır.

Bulgular kısmında tek tek ele alınan değerlere bakıldığında, birinci madde olan; 9-[4,5-di-(4-metoksifenil)-2H-imidazol-2-il]-fenantren, 2 metoksifenil grubu bağlanmış imidazol bileşiği taşıyan fenantren bileşiğidir. Bu madde; TA 98 suşu için S9 fraksiyonu yokluğunda, TA 100 için ise, S9 fraksiyonu varlığında mutajenik etki göstermiştir.

İkinci madde, 9-[1H-benzotiazol-2-il]-fenantren, benzotiazol çekirdeği taşıyan fenantren bileşiğidir. Bu madde, TA 98 ve TA 100 suşları için S9 varlığında mutajenik etki göstermemiş, ancak, her iki suş için de S9 fraksiyonu yokluğunda mutajenik etkiye rastlanmıştır.

Üçüncü madde, 9-[1H-fenantro(9,10-d)-imidazol-2-il]fenantren, yapısında imidazol halkasına bağlı fenantro halkası bulduran fenantren bileşiğidir. Bu bileşik, hem S9 yokluğunda, hem de S9 varlığında TA 100 suşu ile mutajenik etki yaratmamış, ancak, aynı madde, TA 98 suşu için S9 yokluğunda ve varlığında mutajenik etkiye neden olmuştur

Üçüncü madde de olduğu gibi, fenantro imidazol yapısı taşıyan kimyasal maddeler taşıdığı doymamış gruplar (fenil grupları) ile yağimsı karakter gösterirler. Bu madde, yine yağimsı karakterde olan bakteri hücre zarından kolaylıkla hücrenin içine geçebilmektedir. Bu geçiş hızı, yapının sübstitüsyonu ile yakından ilişkilidir. Test bileşenlerinin bakteri hücre duvarından geçmiş olması direkt olarak DNA ile etkileşeceğini göstermez. Bileşiğin sitoplazmik

konsantrasyonu yüksek olsa dahi, sitoplazmik alanda bakteriyel genomda bulunan özgül bağlanma bölgeleriyle kompleks oluşturmayabilir. Dolayısıyla, kimyasal maddenin DNA ile etkileşimi görülmez [63, 83].

Yapılan bu çalışmada, kullanılan üç kimyasal maddeden iki tanesi imidazol içerikli olduğunda, imidazollerin geniş spektrumlu fungistik ilaçlar olduğundan söz etmek gerekmektedir. Bu ilaçlar, cilt ve mukozaların mantar enfeksiyonlarında diğer ilaçlara göre üstünlük gösterirler. İmidazol türevi anti-fungal ilaçlar, mantar hücrelerinin sitoplazma membranındaki ana sterol bileşiği olan ergosterol' ün sentezini 14-metillanosterol' ün desmetildihidrol-ana-sterol' e dönüşümünü katalize eden 14 α -dimetilaz enzimi mikrozomal P450 sitokromuna bağımlıdır. İmidazol türevi ilaçlar, P450 sitokromunu özgül olarak inhibe ederler. Mantarların P450 sitokromu bu tür ilaçlara memelilerin bu enzimlerine oranla en az 1000 kez daha duyarlıdır [63, 83].

Bu çalışma ve yapılan diğer çalışmalar gösteriyor ki, kimyasal yapı ve ortaya çıkan biyolojik aktivite arasında önemli bir bağlantı ve ilişki vardır. Kimyasal maddelerin yapısında bulunan halkaların; grup sayılarının, niteliğinin, bağlanma konumlarının, pozisyonlarının bu yapı-etki ilişkisindeki yeri oldukça önemlidir.

Test sonuçlarımıza göre; 9-sübstitüe fenantren türevlerinin mutajen özelliğe sahip olabileceği düşünülebilir. Ancak, bu maddeler farklı genotipik özelliğe sahip test suşları ile ve farklı organizma gruplarının kullanıldığı farklı test yöntemleriyle de test edildikten sonra genel bir sonuca gidilmelidir.

KAYNAKLAR

- [1] ABE, A., URANO, K.; *Influence of Chemicals Commonly Found in a Water Environment on the Salmonella Mutagenicity Test. The Science of the Total environment.*, **153**, 169-175, 1994.
- [2] ABENESI, T., POLANI, S. LOZZİSR. ve PERTİCNE P.; *DNA strand methylatron sister chromatid exchanges in manmatron cells in who*, *Mutat. Ees.* **429**, 239-248 1998.
- [3] AKMAN, M.; *Bakteri Genetiği*, 2. Baskı, Cumhuriyet Üniversitesi Yayını, Sivas, 1983.
- [4] ALKAMA, I.E.; *Fundamentals of Microbiology*, Third Edition, 175-185, 1991.
- [5] AMES, B.N ve MC. CANN.J.; *Validadron of salmanello test Areply to rismis and lefalom*, *cancer Res.* **41**, 4191, 1981.
- [6] ANDERS, M.W. ve DEKONT, W; *Canjugation-dependent cacinogenicity and toxicity of foreing compounds*, *Adv. Pharmacd.* **27**, 511-519 1994.
- [7] ARINÇ, E. ve ŞEN A.; *Effect of in vivo Benzo(a) pyrene Treatment on Liver Microsomal Mixed-Function Oxidase Activaties of Gilthead Seabrem (Spararus Aurata)*. *Comp. Biochem. Phsiol.*, **107C(3)**, 405-414, 1994.
- [8] AYZAZ, B.; *2, 4, 5 Tri (Substitüe) Fenil İmidazol ve Türevlerinin Mutajenik Aktivitesinin Ames / Salmonnella / Mikrozom testi ile araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 1993.
- [9] BAĞCI, H., Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Yazokulu Moleküler Biyoloji Ders Notları, 158, 1985.
- [10] BAYDAR, H.; *Genetik*, Süleyman Demirel Üniverstesesi Zıraat Fakültesi, Isparta, 2002.
- [11] BAYTOP, T., *Farmakognazi*. İstanbul Üniversitesi Yayını, İstanbul, 1980.
- [12] BİSAGNI, E.; MONTGAINER, L., VEIL, C., DORE, J.C.; *Pharmacologically Activ Trans-nitrosytrene Compounds and Fused and Heterocyclic Analog*, *Fr. Demande*, **2**, 115, 189, (Cl. A 61k, C 17cd) (C.A. 78: 110864c), 1972.

- [13]BOLSOWER, R.S. HYAMS, J.S., STEVE, J., SHEPHARD, E.D ve WHITE, H.A.; *From Genes to Cells* Willey- Liss, Inc. NewYork, USA, 1997.
- [14]BOSTROM, E., ENGEN, S. Ve EIDE, I.; *Mutagenicity Testing of Organic Extracts of Diesel Exhaust Particles After Spilling with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons* (Pak) Arch-Toxicol., **72(10)**, 645-9, 1998.
- [15]BOZCUK, N.; *Genetik*, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi Yayınları, Ankara, 2000.
- [16]BROOKES, P.; *The Early History of the Geological Alkylating Agents*, Mutat. Res. **233**, 3-14, 1990.
- [17]BROWN, S.P., COOPER, A.L., LONGRIDGE, J.L., MORRIS, J.J., PRESTON, J.; *Preparation of Arylsulfonylnitromethanes as Aldose reductase Inhibitors*, Imperial Chemical Industries PLC, **153**, 227 (Cl. 514-646: C07C317/26)(C.A. 118: 233690y), 1992.
- [18]CABRERA, G.L. ve RODRIGUEZ, D.M.G.; *Genotoxicity of Soil from Farmland Irrigated with Waste Water Using Three Plant Bioassays*, Mutation Research, **426**, 211-214, 1999.
- [19]CATTERALL, F.S., COMBBS, M.M. IOANNIDES, C. ve WALTON, K.; *Bioactivation of the carcinogen 11-methoxy-16, 17-dihydro-15H-cyclopental cyclopental [a] phenantrene*, Mutation Research, **465**, 85-90, 2000.
- [20]CERNA, M., POCHMANOVA, D., PASTOKOVA, A., BENES, I., LENICAK, J., TOPINKA, J. ve BINKOVA, B.; *Genotoxicity of Urban Air Pollutants in the Czech Republic Part I. Bacterial Mutagenic Potencies of Organic Compounds Absorbed on PM= particulates*, Mutation Research, **469**, 71-82, 2000.
- [21]CERNIGLIA, C.E., WHITE, G.L. and HEFLICH, R.H.; *Fungal Metabolism and Detoxification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, *Archives of Microbiology*, **143**, 105-110, 1985.

- [22]CHETALAT, A.A., ALBERTINI, S. ve GOKHE, E.; *The Photomutagenicity of Floroquindones in Test For Gene Mutation, Chromosomal Abberation, Gene Conversiyon and DNA Breakage (Comet Assay)*. Mutagen., **5(11)**, 497-504, 1996.
- [23]CHUNG, K.T., CHEN, S.C., WONG, T.Y., LI, Y.S., WEI, C.I and CHOU. M.W.; *Mutagenicity Sutudies of Benzidine and Its Analogs: Structure-Activity Relationships, Toxicological Sciences*, **56**, 351-356, 2000.
- [24]DAROUDI, F. And NATARAJAN, A.T.; *Induction of Sister Chromatid Exchanges, Micronuclei and Gene Mutations by Indrectly Acting Promutagens Using Human Hepatoma Cells as an Activition System*. Atla., **22**, 445-453, 1994.
- [25]DE MEO, M., VANELLA, P., BERNARDINI, E., LAGETt, M., MALDONADO, L., JENTZER, O., CROZET, M.P., DUMENILI, G.; *Evaluation of the Mutagenic and Genotoxiv Activities of 48 Nitroimidazoles and Related Imidazole Derivetes by the Ames Test and the SOS Chromotest*. Environ. Mol Mutagen., **19(2)**, 167-81, 1992.
- [26]DEBNATH, A.K., COMPADRE, R.L., DEBNATH, G., SHUSTERMAN, A.J., HANSCH, G.; *Structure-Activity Relationship of Mutagenic Aromatic and Heteroaromatic Nitro Compounds. Correlation with Molecular Orbital Energies and Hydrophobicity*. Journal of Medicinal Chemistry, **34(2)**, 786-797, 1991.
- [27]DEMİRSOY, A.; *Kalıtım ve Evrim*, Meteksan yayınları No:5, Ankara, 902, 1988.
- [28]DEMİRSOY, A.; *Yaşamın Temel Kuralları/Genel Biyoloji*, **1**, Kısım 1, Ankara, 1992.
- [29]DÖKMECİ, i.; *Toksikoloji, Akut Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi*. 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, 1994.
- [30]EDENHARDER, R., ORTSEIFEN, M., KOCH, M. And WESP, H.F.; *Soil Mutagens are Airborne Mutagens: Variation of Mutagenic Activities Induced in Salmonella typhimurium TA 98 and TA 100 by Organic Extracts of Agricultural and Forest Soils in depence on Location and Season*, Mutation Research, **472**, 23-36, 2000.

- [31]ELÇİ, Ş.; *Sitogenetikte Gözlemler ve Araştırma Yöntemleri*, Uğurel matbaası, 39-68. Elazığ, 1994.
- [32]EPSTEIN, S.S., BULON, I., KOPLAN, J., SMALL, M., MANTEL, N. *Charge-transfer Complex Formation, Carcinogenicity, and Photodynamic Activity in Polycyclic Compounds*, Nature, **204(4960)**, 750-4 (C.A. 62:3196d), 1964.
- [33]ERGENÇ, N., ATEŞ, Ö. ve GÜRSOY, A.; *Eczacılar için Organik Kimya*, İst. Üniv. Yayınları No: 3596, Ecz. Fak. No: 57, s. 568-573, İstanbul, 1990.
- [34]ERKAN, S.; *Moleküler Biyoloji Bornova/İzmir*, 1992.
- [35]FERNANDEZ, P., GRIFOLL, M., SOLANAS, A.M., BAYONA, J.M. and ALBALGES, J.; *Bioassay-Directed Chemical Analysis of Genotoxic Components in Coastal Sediments*. Environn. Sci. Technol., **26(4)**, 817-829, 1992.
- [36]FREEMAN, B.A., WILSON, R.E., BINDER, R.G. ve HADDON W.F.; *Harogenated 2, 5-pyrolidinedines; Synhers, Bacterial Mutagenicity in Ames Tester Strain TA 100 and Semi-empirical Molecular Orbital Calculations*, Mutat. Res. **490**, 89-98, 2001.
- [37]FRIEDBERG, E.C., WALKER, G.C., ve SIEDE, W.; *DNA Repair Mutagenesis*, ASM Pres, Washington D.C. USA., 1995.
- [38]GARDNER, E.S., SIMON, M.J., SNUSTAD D.P.; *Principles of Genetics*. Eighth edition, pp. 314-315, New York, 1991.
- [39]GLATT, H., ABU-SHQARA, E., HARVEY, R.G. ve BLUM, J.; *Mutagenicity of K-region Oxides and Imines of Chrysene, benzo [c]phenantrene and benzo[g]chrysene in Salmonella typhimurium*, Mutation Research, **308**, 135-141, 1994.
- [40]GLATT, H., SHTELZER, S., SHERADSKY, T., BLUM J. ve OESCH, F.; *Mutagenicity of N-Substituted Phenantrene 9,10-Imines in Salmonella typhimurium and Chinese Hamster V79 Cells*, environmental Mutagenesis, **8**:829-837, 1986.

- [41]GRIFATHS, 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, New York, USA., 1996.
- [42]GRIFFOLL, M., SOLANAS, A.M. ve BAYONA, J.M.; Characterization of *Genotoxic Compounds in Sediments by Mass Spectrometric Techniques Combined with Salmonella/Microsome Test*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., **19**, 175-184, 1990.
- [43]GU, Y.S., KIM, I.S., AHN, J.K., PARK, D.C., YEUM, D.M., JI, C. and KIM, S.B.; *Mutagenic and Carcinogenic Heterocyclic Amines as affected by Muscle types/skin and Cooking in Pan-roasted Mackerel*, Mutation Research, **515**, 189-195, 2002.
- [44]GÜVEN K.; *Biyokimyasal ve Moleküler Psikolog*., Dicle Üniv. Basımevi, Diyarbakır, 1999.
- [45]HALL, M ve GROVER, P.L.; *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolism, Activation of Humour Inhibition, Chemical Carcinogenesis Mutagenesis I* (Ed. Cooper, C.S., Grover, P.L.) Springer-verlag, KG Berlin, 1990.
- [46]HAMASAKI, T., SATO, T., NAGASE, H. ve KITO, H.; *The Mutagenicity of Organic Compounds as Environmental Pollutants*. Mutat. Res., **300**, 265-271, 1993.
- [47]HAMASAKI, T., SATO, T., NAGASE, H., KITO, H.; *The Genotoxicity of Organic Compounds in SOS Chromotest and Rec-Assay*. Mutat. Res., **280**, 195-203, 1992.
- [48]HANSCH, C.; *Structure-Activity Relationships of Chemical Mutagens and Carcinogens*. The science of the Total Environment, 109/110, 17-29, 1991.
- [49]HERA, C. ve PUEYO, C.; *Response of the L-Arabinose Forward Mutation Assay of Salmonella Typhimurium to Frameshift-Type Mutagens*. Mutat. Res., **203**, 39-45, 1988.

- [50]HIRAYAMA, T., WATANABE, T., AKITA, M., SHIMOMURA, S., FUJIOKA, Y., OZASA, S. And FUKUI, O.; *Relationship Between Structure of Nitrated arenes and Their Mutagenicity in Salomonella typhimurium; 2- and 2,7-nitro substituted fluorene, Phenanthrene and Pyrene*, Mutation Research, **209**, 67-74, 1988.
- [51]HO, T.A., CARTTS, T.M., ROWLAND, I.R., ALLDRICK, A.T.; *Inhibition of the Metabolism of Mutagens Occurring in Food by Arachidonic Acid*. Mutat. Res., **269**, 279-284, 1992. 6
- [52]HOLLENBERG, P.F.; *Mechanism of Cyhochrome P450 Peroxi-dose-Catalyzed Xenobrotic Metabolism*, FASEB. J.,**6**, 88-694, 1992.
- [53]HOUK, V.S., DE MARINI, D.M.; *Use of the Microscreen Phage-Induction Assay to Assess the Fenotoxicity of 14 Hazardous Industrial Wastes*. Environmental and Molecular Mutagenesis, **11**, 13-29, 1988.
- [54]JAGDT, B., WARNCKE, K., AVER, H. ve RUDIGER, H.W.; *Sleep Deprivation Does Not Induce Sister Chromatid Exchange in Humans*. Mutat. Res., **361**, 11-15, 1996.
- [55]JENEY, E. And ZSOLNAI, T.; *The Chemotherapeutic Treatment of Infections Caused by Trichomonas Vaginalis*. Zent. Bakteriöl., Parasitenk., Abt. I, Orig., **193(4)**, 535-41. (C.A. 62: 5781b), 1964.
- [56]KADLUBAR, F.F, HAMMONS, G.J.; *The role of Cytochone puso in the Metabolism of Chemical Carcinogens, Mammalian Cytochromes, P450*. CRC Pres, Boca Ralon, **2**,81-130, 1989.
- [57]KALKAN, N.; *Ames Test Yöntemi ile Dört Ayrı Sentetik Quinoxalin Türevinin Farklı Türevinin Farklı Dozlardaki Mutajenik Aktivitesinin ve Mutajenliğinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 1996.
- [58]KAPPERS, W.A., VAN OCH, F.M.M., DE GROENE, E.M. ve HORBACH, G.J.; *Comparison of Three Different in vitro Mutation Assays Used For the Investigation of Cytochrome P450-mediated Mutagenicity of Nitropolycyclic Aromatic Hydrocarbons*, Mutation Research, **466**, 143-159, 2000.

- [59]KASAMATSU, T., KOHDA, K. ve KAWAZOA, Y.; *Comparison of Chemically Induced DNA Breakage in Cellular and Subcellular Systems Using the Comet Assay*. Mutat. Res., **369**, 1-6, 1996.
- [60]KATO,T.,MICHIKOSHI, K., MINOWA, Y. ve KIKUGAVA, K.; *Mutagenicity of Cooked Hamburger is Cotrolled Delicated by Reducing Sugar Content in Ground Beef*, Mutat. Res., 471, 2000.
- [61]KATSIFIS, S.D. KINNEY, P.L., HOSSELET, S., BURNS, F.J. ve CHRISTIE, N.T.; *Interaction of Nickel with Mutagens in the Induction of Sister Chromatid Exchanges in Human Lymphocytes*, Mutat. Res. **35**, 7-15 1996.
- [62]KAYA, E.O.; *Biyokimya*, İst. Üniv. Yayınları, **16**, 410, 1992.
- [63]KAYAALP, O.; *Tibbi Farmakoloji*. Hacettepe Taş Yayınları, Ankara, 1995.
- [64]KHUSH, G.S.; *Cytogenetics of Aneuploids*, Academic Pres, New York and London, 301, 1972.
- [65]KLUG, W.S., ve CUMMINGS, M.R.; *Concept of Genetics*, 6th Edition, Pretince Hall, 0-13-081626-4., 2000 (Çev. ÖNER, C., Genetik Kavramlar, Palme Yayıncılık, 816, 2002
- [66]KORKMAZ, F.; Bazı Trifenil İmidazol Türevlerinin Mutajenik Aktivitesinin Ames Test Sisteminin Plak İnkorporasyon ve Ön İnkübasyon Metodları ile Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, 1995.
- [67]LAWLEY, P.D.; *Mutagens as Carcinogens: Devolopment of Current Concepts*, Mutat. Res, **213**, 3-25, 1989.
- [68]LEE, H., BIAN S.S., CHEN, Y.L.; *Genotoxicity of 1,3-dithiane and 1,4 dithiane in the CHO/SCE Assay and the Salmonella Microsomal Test*. Mutat. Res., **312**,213-218, 1994.
- [69]LEONARD, A., GERBER, G.B.; *Mutagenicity, Carcinogenicity and Teratogenicity of Antimony Compounds*. Mutat. Res., **366**, 1-8, 1996.
- [70]LEVIN, D.E., AMES, B.N., *Classifying Mutagens as to Their Specifity in Causing the Six Possitive Transitions, Transversions a Simple Analysis Using the Mutagenity Assey*, Enur. Mutagenesis, **8**, 9-28, 1986.
- [71]LEWIN, B.; *Genes V*, Oxford University Pres, New York, U.S.A., 1272, 1994.

- [72]LINSTROMBERG, W.W.; *Modern Organik Kimya* (Çev: Uyar, T.) Hacettepe Taş Kitapçılık, 1983.
- [73]MARON, D.M. ve AMES, B.N.; *Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test* Mutation Research, **113**, 173-215, 1983.
- [74]MERCANGÖZ, A., TÜYLÜ, B.A.; *Fenil İmidazol Türevlerinin Mutajenik Etkilerinin Ames/Salmonella Test Sisteminde Saptanması*, Turkish Journal of Boology, **24**,1,2000.
- [75]NAKAMURA, S., ODA, Y., SHIMADA, T., OK, I. ve SUGIMOTO, K.; *SOS Inducing Activity of Chemical Carcinogens Mubgens in S.L. TA. 1535/pSK 1002; Examination with 151 chemicals*, Mut. Kes., 192, 239, 246 1987.
- [76]ÖZDEMİR, A.; *Bazı 2-Süstitüe 1H-Fenantrö [9,10-d]-İmidazol Bileşiklerinin Sentezleri, Yapı Aydınlatmaları ve Fizikokimyasal Parametrelerinin Tayinleri Üzerinde Çalışmalar*. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 1996.
- [77]PARADHAN S.N., MAIKEL, R.R. ve DUTLA, S.N.; *Pharmacology in Medicine; Principles and Practice*. 1996.
- [78]PARK, J.H., LEE, B.J., LEE, S.K., KİM, K., LEE, K.H., CHE, J.H., KANG, K.S. ve LEE, Y.S.; *Genotoxicity of Drinking Water from Three Korean Cities*, Mutation Research, **466**, 173-178, 2000.
- [79]PHILIPS, D.H; *Modern Methods of DNA Adduct Determination Chemical Carcinogenesis and Mutagens* I. Springer verlag, KG, Berlin, 1990.
- [80]RICE, J.E., MAKOWSKI, G.S, HOSTED, T.J., JR., ve LAVOIE, E.J.; *Methylene-bridged Bay Region Chrysene and Phenantrene Derivatives and Their Keto-analogs: Mutagenicity in Salmonella typhimurium and Tumor-initiating Activity on Mouse Skin*, Cancer Letters, **27**, 199-206, 1985.
- [81]ROLLAS, S.; *İlaçların Metabolizması (Biyotransformasyon)*. Marmara Üniversitesi Yayını No. 525, İstanbul, 1992.
- [82]RUSSEL, P.J. *Genetics*, The Bernamin-Cummings publishing comp inc. Canada, USA 1988.

- [83]SALEH, K., *Mikronükleus Testi ile Bazı Kimyasal Maddelerin ve Çevre Kirleticilerinin Neden Olduğu Klastrojenik Etkilerinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 1997.
- [84]SAVAGE, J.R.K. Annotation; *Classification and Relationship of Induced Chromosome Structural Change*, Journal Medical Genetics, **13**, 103-122, 1976.
- [85]SERA, N., FUKUHARA, K., MIYATA, N. ve TOKIWA, H.; *Mutagenicity of Nitrophenanthrene Derivatives for Salmonella typhimurium: Effects of Nitroreductase and Acetyltransferase*, Mutation Research, **349**, 137-144, 1996.
- [86]SINGER, B., GERUNBEGER, D.; *Molecular Biology of Mutagenesis and Carcinogenesis*, **335**, 1994.
- [87]SMITH, C.J., MC KARNs, S.C., DAVIS, R.A., LIVINGSTON, S.D., BOMBICK, B.R., AVALOS, J.T., MORGAN W.T. DOOLITTLE, D.J.; *Human Urine Mutagenicity Study Comparing Cigarettes Which Burn or Primarily Heat Tobacco*. Mutat. Res. **361**, 1-9, 1996.
- [88]SPIECHOWICZ, E.J., BORANSKI, B., DZIUBALTOWSKA, E., WYSZYNSKA, K., PRZYBOJEWSKA, B., LIRO, W.C., PZRONDO, J.; *Genotoxicity Assesment of Rokanol B2 and Rokamid R1. Intenational Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, **7(2)**, 51-57, 1994.
- [89]TEMİZKAN, G.O.; *Genetik*, İstanbul.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 281, 1994.
- [90]TOPAKTAŞ, M., RENCÜZOĞULLARI, E.; *Sitogenetik*, Adana, 182, 1995.
- [91]TURNER, P.C., MCLENNAN, A.G.; *Molecular Biology*, (Çeviri: KONUK, M.), 2004.
- [92]TUĞLULAR, I. (Editör); *İlaç ve Kinetiği*. Nisan, Bilgehan Matbaa, Bornova/İzmir, 1981.
- [93]ÜN, R.; *Halkalı Organik Bileşikler*. İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 1977.

- [94]VIGANO, L., CAMOIRANO, A., IZZOTTI, A., D'AGOTINI, FÌ., POLESELLO, S., FRANCISCI, C. and De FLORA S.; *Mutagenicity of Sediments Along the Po River and Genotoxicity Biomarkers in Fish from Polluted Areas*, Mutation Research, **515**, 125-134, 2002.
- [95] VRIJSEN, R., MICHUTTE, Y. ve BUEYE, A.; *Metabolic Activation of Quercetin Mutagenicity*, Mutat. Res. **232**, 243-248, 1990.
- [96]VURAL, N.; *Toksikoloji*. Ankara üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları, No. 56, Ankara, 1984.
- [97]WATANABE, T., TAKASHIMA, M., KASAI, T., HIRAYAMA, T.; *Comparison of the Mutational Specificity Induced by Environmental Genoxin Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Salmonella typhimurium his Genes*, Mutat. Res., **394(1-3)**, 103-112 (C.A 128:85332u), 1997.
- [98]WOOD, A.W., CHANG, R.L., LEVIN W., RYAN, D.E., THOMAS, P.E., MAH, H.D., KARLE, J.M., YAGI, H., JERINA, D.M. and CONNEY, A.H.; *Mutagenicity and Tumorigenicity of Phenantrene and Chrysene Epoxides and Diol Epoxides*, Cancer Research, **39**, 4069-4077, 1979.
- [99]WAGNER, A., KESSEL, J.W.; *Treatment of Intestinal Helminthiasis with 6-aril-1,2,3,4-tetrachlorofulvenes*, U.S. **3**, 592, 894 (Cl. 424-352; A61k), C.A. **75**: 117101y, 1971.
- [100]WYSZYN SKA, K., Liro, W.C.; *The Use of Cytogenetic Tests For Evaluation of Mutagenic Properties of Selected Dyes Applied In Textile and Cosmetic Industry*. Genetica Polonica, **32(3)**, 1991.
- [101]YAPI, A.D., MOSTAFA, M., VALENTIN, A., CHAVIGNON, O., TEULADE, J.C., MALLIE, M., CHAPAT, J.P. ve BLACHE, Y.; *New Potential Antimalarial Agents; Synthesis and Biological Activities of Original Diaza-analogs of Phenantrene*, Chem. Pharm. Bull., **48(12)**, 2000.
- [102]ZSOLNAI, T.; *New Fungicides. II. Nitro Compounds*, Biochem. Pharmacol., **5**, 304-387. (C.A. 55: 13749f), 1961.