

**İNSAN HÜCRELERİNDEKİ DNA  
HASAR VE MUTASYONLARININ  
RAPD TEKNİĞİ KULLANILARAK  
ARAŞTIRILMASI**

Tüba ÇULCU  
Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı  
Eylül-2007

## **JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI**

**Tûba ÇULCU'** nun "**İnsan Hücrelerindeki DNA Hasar ve Mutasyonlarının RAPD tekniği kullanılarak araştırılması**" başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki Yüksek Lisans tezi 23.07.2007 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Üye (Tez Danışmanı) : ..... **Yard. Doç. Dr. BERRİN AYAZ TÜYLÜ**  
Üye : ..... **Yard. Doç. Dr. EMEL SÖZEN**  
Üye : ..... **Doç. Dr. KADRİYE BENKLİ**

**Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun**  
..... **tarikh ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.**

**Enstitü Müdürü**

**ÖZET****Yüksek Lisans Tezi****İNSAN HÜCRELERİNDEKİ DNA HASAR VE  
MUTASYONLARININ RAPD TEKNİĞİ KULLANILARAK  
ARAŞTIRILMASI****Tûba ÇULCU****Anadolu Üniversitesi****Fen Bilimleri Enstitüsü****Biyoloji Anabilim Dalı****Danışman: Yard. Doç. Dr. Berrin TÜYLÜ****2007, 94 sayfa**

*In vitro* hücre sistemleri kullanılarak genotoksik etkilerin belirlenmesi risk değerlendirme prosedürlerinde son derece yararlı olabilir. Bu amaçla RAPD tekniğinden çeşitli maddelerin genetik etkilerini değerlendirmek için başlangıç çalışması olarak kullanılabilir. Bu tez çalışmasında; benzo [a] piren, etil metan sülfanat (EMS) ve mitomisin –C' nin( MMC) genotoksik etkileri insan periferik lenfositlerinde RAPD tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Lenfositler her bir madde için 24, 48 ve 72 saat muameleye tutulmuştur ayrıca karşılaştırma yapmak için kontrol grupları da oluşturulmuştur. Maddelere maruz bırakılan ve bırakılmayan hücrelerin RAPD profilleri karşılaştırılmıştır. Bant yoğunluğu, bant artış/azalış gibi farklılıklar RAPD profillerinde gözlenmiştir. RAPD profilleri baz alınarak benzo [a] piren, etil metan sülfanat ve mitomisin –C' DNA kırıkları şeklinde genetik hasara sebep olduğu saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Genotoksisite, İnsan lenfositleri, DNA izolasyonu, PCR, RAPD

**ABSTRACT****Master of Science Thesis****THE INVESTMENT OF DNA DAMAGES AND MUTATIONS IN HUMAN  
CELLS BY USING RAPD TECHNIQUE****Tûba ÇULCU****Anadolu University****Graduate School of Sciences****Biology Program****Supervisor: Assist. Prof. Dr. Berrin TÜYLÜ****2007, 94 pages**

Determining genotoxic effects by using *in vitro* cell systems in risk assessment procedures can be considerably useful. For this purpose, RAPD technique can be used as an initial work for assessing the genetic effects of various materials. In this thesis, the effects of benzo [a] pyren, ethyl methane sulfonate and miyomysin –C on human peripheral lymphocytes were examined by using RAPD technique. Lymphocytes were exposed to each material for 24, 48 and 72 hours and control groups were formed for comparison as well. RAPD profiles of exposed and non-exposed cells were compared. Differences like band density, increases and decreases in bands, and number of bands were observed in RAPD profiles. Depending on these RAPD profiles, it is detected that benzo [a] pyren, ethyl methane sulfonate and miyomysin –C caused genetic damages as DNA breaks.

**Keywords:** Genotoxicity, Human lymphocytes, DNA isolation, PCR, RAPD

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca ihtiyaç duyduğum her an maddi ve manevi yardımlarıyla yanımda olan, her türlü desteği veren danışman hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Berrin TÜYLÜ' ye, özellikle deney aşamasında bilgisi ve sabrıyla beni yönlendiren ve tez çalışmamda büyük emeği olan Sayın Yard. Doç. Dr. Emel SÖZEN' e içtenlikle teşekkür ederim.

Ayrıca ismini sayamadığım Biyoloji Bölümü'ndeki bütün hocalarıma ve arkadaşlarıma ilgi ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bana moleküler biyolojiyi sevdiren saygıdeğer Hocam Prof. Dr. Ali Ateş' e teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan arkadaşım Adalet Kılıç'a çok teşekkür ederim.

Hayatımın her basamağında daima yanımda olan, her zaman ve her konuda bana destek olan değerli aileme sonsuz sevgilerimi sunarım.

Tûba ÇULCU  
Eylül-2007

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iv</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Genotoksik Ajanlar .....	4
1.1.1. Fiziksel mutajenler .....	4
1.1.1.1. İyonlu radyasyon .....	4
1.1.1.2. İyonsuz radyasyon .....	5
1.1.2. Kimyasal mutajenler .....	6
1.1.2.1. Baz analogları .....	6
1.1.2.2. Alkileyici ajanlar .....	7
1.1.2.3. Hidroksile edici ajanlar .....	8
1.1.2.4. Çapraz bağlayıcı (Cross-Linking) ajanlar .....	8
1.1.2.5. Psoralenler .....	8
1.1.2.6. Klastojenik ajanlar .....	9
1.1.2.7. Metabolik aktivasyon reaksiyonları sonucu aktif olan kimyasallar ajanlar .....	9
1.2. Toksik Bileşiklerin Metabolizması .....	10
1.2.1. Faz I reaksiyonları .....	11
1.2.1.1. Oksidasyon reaksiyonları .....	11
1.2.1.2. Redüksiyon reaksiyonları .....	13
1.2.1.3. Kopma reaksiyonları .....	13
1.2.2. Faz II reaksiyonları .....	14
1.3. Genotoksik Ajanların Etki Mekanizmaları .....	15
1.3.1. Kromozom mutasyonları .....	16

1.3.1.1. Kromozom sayı değişmeleri .....	16
1.3.1.2. Kromozom yapı değişmeleri .....	18
1.3.2. Gen mutasyonları .....	21
1.3.2.1. Fenotipe etkilerine göre gen mutasyonları .....	21
1.3.2.2. Genetik materyale etkilerine göre gen mutasyonları .....	22
1.4. DNA Onarımı .....	25
1.4.1. Fotoreaktivasyon ile onarım .....	25
1.4.2. Alkilasyon hasarının onarımı .....	26
1.4.3. Kesme-çıkarma onarım yolu .....	26
1.4.3.1 Baz kesip-çıkarma onarımı (BER) .....	26
1.4.3.2 Nukleotit kesip-çıkarma onarımı (NER) .....	27
1.4.4. DNA polimeraz proofreading ile onarım .....	27
1.4.5. Yanlış eşleşme onarımı (Mismatch Onarım = MER) .....	27
1.4.6. Rekombinasyonel onarım .....	28
1.4.7. SOS onarım mekanizması .....	28
1.4.8. Çift zincir kırıklarının onarımı .....	28
1.5. Genetik Toksikoloji Testleri .....	29
1.5.1. Bakteriyal yöntemler .....	29
1.5.1.1 Ames (Salmonella/Mikrozom) testi .....	29
1.5.1.2 SOS (umu) testi .....	30
1.5.1.3 <i>E.coli</i> lac I mutasyon test sistemi .....	31
1.5.2. Sitogenetik yöntemler .....	31
1.5.2.1 Yapısal kromozom bozulma testi .....	32
1.5.2.2 Mikronukleus testi .....	32
1.5.2.3 Kardeş kromatid değişimi (SCE) testi .....	33
1.5.3. DNA hasarı ya da gen mutasyonlarını saptayan yöntemler .....	34
1.5.3.1 Comet (Single Cell Gel Elektrophoresis ) testi .....	34
1.5.3.2 Mouse lymphoma testi .....	34
1.5.3.3 Muta mouse / Big blue yöntemi .....	35
1.5.3.4 HPRT gen mutasyon testi .....	35
1.6. Yeni Test Gelişmeleri .....	35
1.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....	37

1.7.1. PCR aşamaları .....	43
1.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonuna Dayalı Markerler .....	45
1.8.1. Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD-PCR) .....	45
1.8.1.1 RAPD markerlarının avantajları .....	48
1.8.1.2 RAPD markerlarının sınırları .....	48
1.8.1.3 RAPD Optimizasyonu .....	50
1.9. Çalışmada Kullanılan Maddeler .....	51
1.9.1. Benzo [a] piren .....	51
1.9.2. Etil methansulfonat(EMS) .....	53
1.9.3. Mitomisin-C(MMC) .....	53
<b>2. MATERYAL VE METOD .....</b>	<b>55</b>
2.1. Materyal .....	55
2.1.1. Test maddelerinin dozları ve hazırlanışı .....	55
2.1.2. Kimyasal maddeler .....	55
2.1.3. Tampon ve çözeltiler .....	55
2.1.3.1 DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler .....	55
2.1.3.2 PCR'da kullanılan tampon ve çözeltiler .....	56
2.1.3.3 Agaroz jel elektroforezi için kullanılan çözeltiler .....	57
2.2. Metod .....	57
2.2.1. Lenfosit kültürü .....	57
2.2.2. Test maddelerinin uygulanması .....	57
2.2.2.1 Deney 1 ( 24 saatlik uygulama ) .....	57
2.2.2.2 Deney 2 ( 48 saatlik uygulama) .....	57
2.2.2.3 Deney 3 ( 72 saatlik uygulama) .....	58
2.2.3. Lenfositlerin izolasyonu .....	58
2.2.4. DNA izolasyonu .....	58
2.2.4.1 Klasik yöntem 1 .....	58
2.2.4.2 Klasik yöntem 2 .....	58
2.2.4.3 Kit kullanılarak yapılan yöntem .....	59
2.2.5. DNA konsantrasyonu tayini .....	59



2.2.6. Rartgele çoğaltılmış polimorfik DNA zincir reaksiyonu .....	60
2.2.7. Agaroz jel elektroforezi .....	60
<b>3. BULGULAR .....</b>	<b>61</b>
3.1. Lenfosit Kültürü .....	61
3.2. DNA İzolasyonu .....	61
3. 3. RAPD Profillerinin Değerlendirilmesi .....	62
<b>4.TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>81</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>85</b>

## TABLOLAR DİZİNİ

### Sayfa

1.1. Teknoloji önderliğinde yeni genetik test metotlarının gelişmesi .....	37
1.2. Agaroz jel elektroforezinde jeldeki agaroz derişimi ve bu derişimlerde etkili ayırma yapılabilecek DNA molekül büyüklükleri .....	45
2.1. Kullanılan oligonükleotid primerlerin dizileri ve % G+C oranları .....	57
3.1. 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P1 primeri ile oluşturulmuş RAPD bantlarının LabImage ID 2006 ID Gel Analysis Software programı ile saptanmış moleküler ağırlıkları .....	63
3.2. 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P2 primeri ile oluşturulmuş RAPD bantlarının LabImage ID 2006 ID Gel Analysis Software programı ile saptanmış moleküler ağırlıkları .....	65
3. 3. 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P3 primeri ile oluşturulmuş RAPD bantlarının LabImage ID 2006 ID Gel Analysis Software programı ile saptanmış moleküler ağırlıkları .....	67
3. 4. 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P1 primeri ile oluşturulmuş RAPD bantlarının LabImage ID 2006 ID Gel Analysis Software programı ile saptanmış moleküler ağırlıkları .....	69
3. 5. 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P5 primeri ile oluşturulmuş RAPD bantlarının LabImage ID 2006 ID Gel Analysis Software programı ile saptanmış moleküler ağırlıkları .....	71
3. 6. 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P8 primeri ile oluşturulmuş RAPD bantlarının LabImage ID 2006 ID Gel Analysis Software programı ile saptanmış moleküler ağırlıkları .....	73

3. 7. 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P9 primeri ile oluşturulmuş RAPD bantlarının LabImage ID 2006 ID Gel Analysis Software programı ile saptanmış moleküler ağırlıkları ..... 75
3. 8. 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P10 primeri ile oluşturulmuş RAPD bantlarının LabImage ID 2006 ID Gel Analysis Software programı ile saptanmış moleküler ağırlıkları ..... 77
3. 9. 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P19 primeri ile oluşturulmuş RAPD bantlarının LabImage ID 2006 ID Gel Analysis Software programı ile saptanmış moleküler ağırlıkları ..... 79
3. 10. 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının PID10 primeri ile oluşturulmuş RAPD bantlarının LabImage ID 2006 ID Gel Analysis Software programı ile saptanmış moleküler ağırlıkları ... 81

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

3. 1. Klasik yöntem 1, Klasik yöntem 2 ve Kit yöntemi kullanılarak elde edilen DNA jel fotoğrafı .....	62
3. 2. 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P1 primeri ile oluşturulmuş RAPD bant profili .....	63
3. 3. 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P2 primeri ile oluşturulmuş RAPD bant profili .....	65
3. 4. 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P3 primeri ile oluşturulmuş RAPD bant profili .....	67
3. 5. 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P4 primeri ile oluşturulmuş RAPD bant profili .....	69
3. 6. 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P5 primeri ile oluşturulmuş RAPD bant profili .....	71
3. 7. 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P8 primeri ile oluşturulmuş RAPD bant profili .....	73
3. 8. 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit primeri ile DNA'sının P9 oluşturulmuş RAPD bant profili .....	75
3. 9. 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P10 primeri ile oluşturulmuş RAPD bant profili .....	77
3. 10. 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P19 primeri ile oluşturulmuş RAPD bant profili .....	79
3. 11. 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit	

ID10 primeri ile oluşturulmuş RAPD bant profili .....	81
---	----

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

DMSO	: Dimetilsülfoksit
MMS	: Metil methan sülfanat
EMS	: Etil methan sülfanat
MMC	: Mitomisin-C
B[a]P	: Benzo amino piren
EDTA	: Etilen daimin tetra asedik asid
SCE	: Kardeş kromatid değişimi
CA	: Kromozom aberasyonu
PCR	: Polimolimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	: Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA

## 1. GİRİŞ

Son zamanlarda kimya endüstrisi ve ilaç yapımının hızlı gelişimi, tarım ve evlerde kullanılan kimyasal maddelerin artması ve atom enerjisinin savaşı ve barışçı amaçlarla uygulanması ile ortaya çıkan çevre sorunları, endüstride görülen mesleki zehirlenmeler, medikal ilaçlarla ortaya çıkan zehirlenmeler, tutku yapan maddelerin izlenmesi, besin zehirlenmeleri, adli tıbbi ilgilendiren zehirlenmeler (şüpheli ölümler, trafik ve sporda kullanılan yasal olmayan ilaçlar) nedeni ile kimyasal maddelerin önemi ve onlara olan ilgi giderek artmaktadır (Vural 1984).

İlkel devirlerde savaş, av, besin ya da tedavi aracı olarak kullanılan zehirlerden ileri gelen zehirlenmelerin yerini, yaşadığımız bilim ve teknoloji çağında çevremize sorumsuzca saçılan zehirli atıkların yol açtığı kitle ölümleri almıştır. Her biri potansiyel bir zehir olan kimyasal ve radyoaktif maddelerin üretiminin ve tüketiminin çığ gibi büyümesi bu alanda yapılan çalışmaların önemini artırmaktadır (Dökmeci 2001).

İnsan popülasyonunun çevredeki kanserojen ve mutajen maddelerin etkisinden korunması için bu özelliğe sahip bileşiklerin tespit edilmesi ve etkilerinin değerlendirilmesi önemlidir (Maron ve ark.1983; Debnath ve ark. 1991).

Günlük yaşama önemli ölçüde giren X ışınları, gama ışınları ve radyasyon kaynaklarının (televizyon, telsiz telefon, radyoaktif atıklar, nükleer silahlar, nükleer santraller vb) hatalı ya da kötü amaçlarla kullanımının biyolojik sistemlere zarar verdiği kanıtlanmıştır (Vijayalaxami ve ark. 1992). Buna karşın birçok araştırmacı mutajen kimyasalların, radyasyondan daha zararlı olduğunu savunmaktadır. Çünkü radyasyon kaynağını tespit etmek, korunma önlemi almak ve miktarını ölçmek mümkün iken; birçok kompleks kimyasal madde karışımına maruz kalan bireylerin uğradığı zararın analizi çok daha zor olmaktadır. Hatta kimyasal maddenin mutajenik etkisi varsa bile maruz kalan kişide ve de yavrusunda da görülmeyebilir. Ancak resesif bir allelin, nesiller sonra ortaya çıkma olasılığı vardır. Çok küçük dozları mutasyona neden olabileceği gibi kanserojen de olabilir (Vural 1984; Dökmeci 1994). Diğer taraftan da kimyasal mutajen kaynaklarının sınırsız oluşu durumu daha da zor konuma sokmaktadır.

Kimyasal maddelerin mutajenik aktivitelerini araştıran ilk alışmalar İkinci Dünya Savaşı'ndan hemen sonra bir grup kimyasal üzerinde yapılmış ve ilk olarak mustard gazının etkili bir mutajen olduğu tespit edilmiştir. Dünyanın hemen her yerinde yapılan deneylerle, diğer bazı kimyasallara dikkat çekilmiştir. 1972 yılında yapılan bir araştırmada yiyecekleri renklendirme, koruma ve diğer amaçlarla kullanılan 2500 kadar katkı maddesi olduğu tespit edilmiştir. Yiyeceklerle bulaşarak vücuda giren pestisitler ve çeşitli amaçlarla kullanılan ilaçlar üzerinde durulmuştur. Bu sayede pek çok mutajenite test sistemi geliştirilmiştir (Pai 1985).

Mutajenlerle yüz yüze gelmenin çeşitli yolları vardır. Bunlardan birincisi; diyetimizde bulunan doğal kimyasalları almamız, ikincisi; endüstriyel kimyasallar, pestisidler, sa boyaları kozmetik ve ilaçlar gibi yapay kimyasalları kullanmamız, üçüncüsü ise; sigara dumanı, su ve havadaki kirleticiler gibi karmaşık bileşiklerle yüz yüze gelmemizdir (Bökesoy ve ark. 200).

Kimyasal maddelerin ya da ilaçların dönüşümsüz toksik etkilerinin başlıcaları mutajenik, karsinojenik ve teratojenik olarak ortaya çıkmaktadır (Dökmeci 2001).

Kimyasal maddelerin mutajenik etkileri, hücre çekirdeğinde DNA molekülünü bozarak hücrenel fenotipi değiştirmeleri olayıdır. Mutasyonlar, ksenobiyetiklere (mutajen) bağlı olarak ya da spontan olarak meydana gelebilmektedir. Mutajen etkenler, DNA ift zincirinin yapısında nokta mutasyon ya da geniş alanda değişiklik oluşturabilir (Dökmeci2001).

Kimyasal maddelerin karsinojen etkileri değişik basamaklar içermektedir. Kimyasal maddelerle temas süresi, dozu ve sıklığı önemlidir. Toksik maddeler tarafından kanser indüksiyonunda bir başlatma süreci oluşturmaktadır. Bu başlatma döneminde normal hücrelerin, DNA üzerinde meydana gelen bir etkiyle neoplastik hücrelere dönüşmesi söz konusudur. Bununla birlikte ikincil başka olaylar da hücreleri kanser hücreleri şekline dönüştürebilmektedir. Karsinojen kimyasal maddeler genotoksik ya da epigenetiklerdir. Genotoksik karsinojenler genetik mutasyonlar oluşturabilmek için DNA ile kovalent bir şekilde etkileşirler. Genotoksik maddelerin çoğu prokarsinojenlerdir (nitrosaminler). Epigenetik bir madde genotoksik karsinojenlerin etkisini arttırır (Dökmeci2001).



Kimyasal maddelerin teratojen etkisi, embriyoner gelişim sırasında gebelerin dışardan aldıkları bazı kimyasal maddelerin plasentadan fetal dolaşıma geçerek fetüste oluşturdukları yapısal bozukluklardır.

Bazı genotoksik ajanlar sadece genomun bütünlüğüne zarar vermez aynı zamanda DNA' nın ifadesini doğrudan ya da dolaylı olarak etkileyebilir. Bu etkiler farklı tipteki tümörlerin oranında bir artışa neden olabilir. Uzun dönemli etkileşim sonucu ise maruz bırakılan popülasyonların genetik değişkenliğinde bir alterasyona sebep olabilir. Bu geçekler genotoksisiteyi incelemek için hızlı görüntüleme testlerinin oluşturulmasını zorunlu kılar (Zhiyi ve Haowen 2004).

İdeal bir test yöntemi; hızlı, ucuz, hassas, etik kurallara uygun (insancıl), insan biyolojisi ile ilgili olmalı ve doğru sonuçlar vermelidir. Ancak, tek başına hiçbir test yöntemi bu kriterlerin tümünü sağlayamamaktadır.

Genotoksik ya da mutajenik etkiyi araştıran test yöntemleri; çevresel ya da mesleki olarak belirli ajanlara sürekli maruz kalan bireylerin genetik yapılarının izlenmesi ve hasar tipinin belirlenmesinde (Gomez-Arroyo ve ark. 2000), çevresel kaynaklardan izole edilen her çeşit yapay madde ya da kirletici ajanın mutajenik etkilerinin araştırılmasında (Monarca ve ark. 2001), sentez edilerek, gıda, sağlık, kozmetik, temizlik ve sanayi gibi farklı alanlarda kullanıma sunulan ya da sunulacak olan, kimyasal bileşiklerin mutajenik/karsinojenik potansiyellerinin ya da antimutajenik / antikarsinojenik özelliklerinin tespit edilmesinde (Laffon ve ark. 2001), çeşitli hastalıkların, özellikle de kanser olgularının genetik hasarla ilişkilendirilmesi çalışmalarında (Griffiths ve ark. 1996), son yıllarda giderek yaşamın bir parçası haline alan biyoteknolojik ürünlerin risk değerlendirmelerinin yapılmasında kullanılabilmesi bakımından önem taşımaktadır.

Son birkaç yılda, moleküler alanda hücresel ya da bireysel düzeyde çok sayıda biomarker geliştirildi. Böylece karşılaşılan bu problemleri çözmek için yeni bir perspektif oluşturuldu.

Bunlardan biri RAPD tekniğidir. Rastgele kısa primerler kullanılarak PCR ile genomun multip bölgelerinin rastgele çoğaltılmasıyla oluşan DNA polimorfiziminin belirlenmesine izin verir. Amplifikasyon ürünleri agaroz jelde çözülür ve polimorfizim ler genetik markır olarak hizmet ederler. RAPD tekniği etkili, kolay, hızlı, duyarlı olması ve özellikle genom belirsizlikleri gibi

problemelere uygun olması sebebiyle çok farklı alanlarda uygulanmaktadır. Örneğin moleküler ekolojide taksonomik benzerlikleri, tür içi gen sıralarını ve mutasyonları belirlemek için kullanılır ( Becerril ve ark. 2001).

## **1.1. GENOTOKSİK AJANLAR**

Genomda, kromozomlarda ya da genlerde değişimlere ya da hasara yol açan etkenlere, genotoksik ajan ya da mutajen adı verilmektedir. Mutajenler temel olarak fiziksel ve kimyasal olmak üzere iki sınıfa ayrılabilir. Birçok genetikçi kimyasal mutajenlerin fiziksel mutajenlerden çok daha zararlı olduğuna inanmaktadır. Çünkü radyasyon kaynağını tespit etmek, miktarını ölçmek ve korunma önlemi almak olası iken, aynı anda uzun süreli olarak, birçok kompleks kimyasal madde karışımına maruz kalan bireylerin uğradığı zararın analizi çok daha zor olmaktadır. Diğer yandan kimyasal mutajen kaynakları sınırsızdır. Çünkü farklı alanlarda, her çeşit kimyasal madde üretilerek kullanıma sunulmakta ya da çevrenin bir parçası haline almaktadır.

### **1.1.1. Fiziksel mutajenler**

Birçok radyasyon formu mevcuttur ve bunlar genelde tamirâtı zor mutasyonlara neden olurlar. İkiye ayrılırlar:

#### **1.1.1.1 İyonlu radyasyon**

İyonize ışınlar; X ışını, gama ışını, kozmik ışınlar iyonizasyona yol açan radyasyonlar olup UV 'ye göre daha fazla etkili olmaktadır. Bu tür ışınlar özellikle su ve diğer maddelerde iyonizasyon oluşturarak serbest radikaller (ör. OH) oluştururlar. Serbest radikaller hücre içerisinde DNA, protein ve lipit gibi makromoleküllerin yapısına bağlanarak onların oksidasyonuna sebep olmaktadır. Hedef moleküllerden ayrılan elektronlar DNA' da iplik koparma, baz ve şeker yıkımı gibi geniş çapta kimyasal değişimlere neden olabilir (Turner ve ark. 2004).

UV ışınlamasından en önemli farkları, bunların sahip oldukları yüksek enerji ile dokuların derinliklerine nüfuz etme kabiliyetlerinin çok yüksek olmasıdır (Turner ve ark. 2004; Dilsiz 2004 ).

Atom bombalarından etrafa yayılan gama ışınlarının cam dahil bir çok maddeden geçiş oranları oldukça yüksek ve etkindir. 1986'da gerçekleşen Çernobil faciası sonucu özellikle batı yönünde İngiltere üzerinden Kuzey Amerika'ya ve kuzey yönünde ise İsveç 'e kadar radyoaktif materyal ulaşmış ve etkisini gösterebilmiştir. Facianın yaşandığı 300 km 'lik bölgede yapılan araştırmalar göre bugün yaşamakta olan kişilerin %50'sinde çeşitli mutasyonlar gözlenmektedir (Dilsiz 2004).

UV ışınları tek hücre üzerinde etkili olmasına karşın iyonlu radyasyonlar canlı organizmanın tümünde kalıtsal bozukluğa yol açabilirler. Dolayısıyla mikroorganizma deneylerinde bilhassa UV' den istifade edilir (Dilsiz 2004).

### **1.1.1.2 İyonsuz radyasyon**

İyonsuz radyasyonun en önemli tipi UV ışınlarıdır. DNA veya RNA'da yer alan bazlar, özellikle 260 nm 'deki UV ışınlarını oldukça fazla absorbe ederler. Bu durum aynı zamanda protein yapısına giren ve aromatik halka yapısına sahip triptofan, fenilalanin ve trozin içinde söz konusudur. Genel olarak kabul edilen görüş şudur ki; 260nm' den gelen UV ışınları canlı hücre üzerinde öldürücü seviyede etki gösterebilirler (%95). UV ışınlarının diğer bir etkisi ise dimer Timin (TT) oluşturması ve dolayısıyla aminoasit değişmesine yol açması şeklinde ortaya çıkabilmektedir (Dilsiz 2004). Primidin dimerleri DNA replikasyon ve transkripsiyonu engeller. Normalde primidin dimerleri hücrede çeşitli mekanizmalarla tamir edilir. Primidin dimerleri hücrenin normal mekanizmalarla tamir edemeyeceği düzeyde ise SOS denilen tamir mekanizması devreye girer. SOS, tamir esnasında hassas çalışmaz bu nedenle de mutasyonlara neden olan bir sistemdir (Ateş 2002).

### 1.1.2. Kimyasal mutajenler

Tarımda, tıpta ve sanayide kullanılan bir kısım kimyasal maddenin birikimi ile DNA 'da etkisini gösteren organik bileşimlere kimyasal mutajenler adı verilmektedir (Dilsiz 2004).

#### 1.1.2.1 Baz analogları

Moleküler yapıları nükleik asitlerin yapısındaki bazlara benzeyen moleküllere baz analogları denir. Sadece replikasyon sırasında etkili olurlar (Temizkan 1996). Baz analogları, pürin ve pirimidin bazlarından hangisine benziyorsa, replikasyon esnasında benzerinin yerine girebilir. Bunlar normal bazlara kıyasla daha yüksek oranda hatalı baz çifti yaptıklarından mutasyon hızını arttırlar. 5- bromourasil ve 2- aminopürin baz analogları örneklerindedir (Ateş 2002).

**5-Bromourasil (BU):** 5-Bromourasil yapı olarak timin bazına benzer. Dolayısıyla replikasyon esnasında timinin yerine geçen bir timin analogudur. Timin bazının 5. pozisyonundaki CH<sub>3</sub> yerine 5 bromourasilde Br bulunur.

Timin kadar kararlı bir moleköl olmayan 5-bromourasil, nükleik asit yapısında kolayca keto ve enol tautomerik dönüşümler göstererek mutasyona neden olur. 5 – BU, keto formunda T gibi davranarak A ile baz çifti yapar ve DNA' da bir değişme olmaz. Ancak enol formuna dönüşürse C gibi davranarak G ile eşleşir. Ve TA → CG transisyonu meydana gelir.

5-BU enol formunda iken, replikasyon esnasında G ile baz çifti yapar. Sonuçta GC → AT yönlü transisyon meydana gelir (Ateş 2002).

**Aminopürin:** Adenin yerine geçerek Timinle eşleşir. Ancak normal tautomer durumunda 2-aminopürin sitozin ile eşleşir ve sonuçta AT→GC transisyonu gerçekleşir (Ateş 2002).

### 1.1.2.2 Alkilleyici ajanlar

Alkilleyici ajanlar, DNA bazlarını alkilleyerek yanlış baz eşleşmelerine neden olur veya DNA'nın yapısını bozar (Ateş 2002).

II. Dünya Savaşı 'nda keşfedilen kükürt içeren hardal gazları, kimyasal savaş araştırmalarında tanımlanan ilk kimyasal gruplardan biriydi. Hardal gazları alkilleyici ajanlar, nükleotidlerdeki amino veya keto gruplarına bir alkil grubu eklerler (Klug ve Cummings 2003).

İçerisinde karsinojenliği kanıtlanmış ve ya şüpheli olan çok sayıda kimyasal çeşidi bulunan alkilleyici ajanlar, organik makro moleküllerin nükleofilik merkezlerine ilgi gösteren elektrofilik bileşiklerdir (Lawley 1989). Dimetil-nitrosamin, N-metil-N-nitrosourea, 1,2-dimetilhidrazin, Metil metan-sülfonat, Dietil-nitrosamin, N-etil-Nitrosourea gibi monofonksiyonel alkilleyici ajanlar, deneylerde mutajen olarak sıklıkla kullanılırlar (Gollapudi ve ark. 1998).

Bu ajanlar monofonksiyonel veya bifonksiyoneldir. Monofonksiyonel olanlar tek bir reaktif gruba sahiptir ve DNA'daki tek nükleofilik merkezle kovalent bağ yaparlar. Bifonksiyonel ajanlar ise 2 reaktif grup taşımakta ve DNA ile 2 ayrı bölgede reaksiyona girebilmektedir. Potansiyel alkilleme bölgeleri 4 baz içinde belirlenmiş ve herbirinin farklı reaktiviteye sahip olduğu bulunmuştur.

Genelde bazların halkasal nitrojenleri, oksijenlerinden daha nükleofiliktir. Fosfodiester bağlarındaki oksijenin alkilasyonu fosfotriesterlerin oluşumu ile sonuçlanır (Roberts 1978). Diğer yandan alkilasyonla değişime uğrayan bazlarda N-glikosilik bağlarını zayıflatmakta ve çok sayıda alkilleyici ajan bazlarda depurinasyon-depirimidinasyona yol açarak, abazik bölgelerin oluşumuna neden olmaktadır (Loeb ve ark. 1986). Alkilleyici mutajenlerden etilmetan sülfonat (=EMS) timin ile reaksiyona girerse O<sup>6</sup>-etil timin meydana gelir. O<sup>6</sup>-etil timin, guanin ile baz çifti yapar. Sonuçta TA→CG transisyonu meydana gelir (Ateş 2002).

Aynı şekilde EMS, guaninle reaksiyona girerse O<sup>6</sup>-etil guanin meydana gelir. O<sup>6</sup>-etil guanin ise T ile baz çifti yapar ve GC→AT transisyonu oluşur (Ateş 2002).

Alkilleyici ajanlar tarafından alkilenen bazı DNA bazları, bu bazlara özgü enzimlerin görev aldığı tamir mekanizmalarıyla tamir edilir. Fakat bu tamir sistemi de çalışırken mutasyona neden olabilmektedir (Ateş 2002).

### **1.1.2.3 Hidroksile edici ajanlar**

Hidroksilleme etkileri vardır. Yanlış baz eşleşmelerine yol açarlar. Örnek olarak hidroksilamin ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) verilebilir. Hidroksilamin hemen hemen her zaman sitozin ile reaksiyona girer. Sitozinin amino grubundaki hidrojen OH a dönüşür. Reaksiyon sonucu meydana getirilen türev adenin ile eşleşir. Sonuçta tek yönlü bir transisyon oluşur (Ateş 2002).

### **1.1.2.4 Çapraz bağlayıcı (Cross-Linking) ajanlar**

Bifonksiyonel alkilleyici ajanlar DNA'da 2 farklı nükleofilik merkez ile reaksiyona girebilirler. Eğer bu 2 bağlanma bölgesi zıt polinükleotit iplikleri üzerindeyse DNA iplikleri arasında çapraz bağlanma meydana gelmektedir. Eğer aynı polinükleotit zinciri üzerinde yer alıyorsa iplikçi çapraz-bağlanma oluşmaktadır.

DNA iplikleri arasındaki çapraz bağlanma, DNA'daki kimyasalların yol açtığı hasarların önemli bir sınıfıdır. Bu tip hasar DNA iplik ayrımını engellediği için replikasyon ve transkripsiyonu bloke eder. Bu özelliği nedeniyle nitroz asit, mitomisin C, nitrojen mustard, sülfür mustard, cis platinum gibi çeşitli platinyum türevleri ve ışıkla aktive olan psoralen gibi ajanlar kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Fram 1992).

### **1.1.2.5 Psoralenler**

Psoralenler, temel kimyasal yapılarında, UV varlığında DNA'nın pirimidin bazları ile bir ya da iki uçtan bağlanarak reaksiyona giren 3 aromatik halka bulunduran kimyasal yapılardır. Psoralenlerin DNA ile etkileşimi ve bağlantısı 2 şekilde olabilir. Birinci şekli, uzun dalga boylu UV radyasyonunun etkisi ile DNA

ile tek noktadan (timin ile) çift bağ kurulması sonucu meydana gelebilir (Gasparro ve Fresco 1986). İkinci şekli ise kimyasal yapının her 2 reaktif grubunun da bağımsız bir şekilde UV'yi absorbe ederek, iki DNA ipliği üzerinde biri alt, diğeri üst konumda bulunan iki baz arasında karşılıklı çapraz bağlantı kurması şeklinde gerçekleştirilebilir. Birinci bağlantı tipi, çapraz bağlanmayı oluşturan bağlantı şeklerinden 3 kat daha fazla meydana gelmektedir.

Fotoreaktivasyon ile DNA iplikleri arasında çapraz bağlanmayı sağlayan psoralenler, muamele edildikleri bakteri, bakteriyofaj ve ökaryotik hücrelerin biyolojik inaktivasyonuna sebep olmaktadır (Averbeck 1989). Bu nedenle, psoralenin teşvik ettiği çapraz bağlanma reaksiyonları, çeşitli biyolojik sistemlerde meydana gelen iplikler arası çapraz bağlanmanın onarımı çalışmaları için ideal bir model olmuştur (Sage 1993).

#### **1.1.2.6 Klastojenik ajanlar**

Genetik materyale kromatit ve kromozom kırıkları ve dolayısıyla meydana gelen yapısal kromozom anomalileri şeklinde zarar veren ajanlardır (Emerit ve ark. 1985). İyonize radyasyon, nitro furan, benzen, benzo (a) piren, siklofosamid, vinil klorit gibi ajanlar klastojenik etkilidir. Klastojenik etki bazen, memelilerdeki hücrel metabolizma sonucu da meydana gelmektedir. Diğer yandan *in vitro* koşullarda herhangi bir fiziksel ya da kimyasal etken ile muamele edilen kan hücrelerinde klastojenik etki meydana gelebilmektedir. Tümör promotörleri da klastojenik etkiyi uyurabilmektedir. Genel olarak süperoksit dismutas gibi radikal-koruyucu enzimlerin varlığı klastojenik aktivitenin oluşumunu önlemektedir (Emerit ve ark. 1994)

#### **1.1.2.7 Metabolik aktivasyon reaksiyonları sonucu aktif olan kimyasallar ajanlar**

DNA'daki kimyasal hasarla ilgili çalışmalarda, kimyasal olarak reaktif olmayan, nonpolar gruplar taşıyan çeşitli tipte kimyasal bileşiğin canlı vücudundaki metabolik aktivasyon tepkimeleri ile daha reaktif formlara dönüşerek, tıpkı alkilleyici ajanlar gibi, DNA'daki nüfleofilik merkezle etkileşime

girdiği tesbit edilmiştir. Bu özellikte olan çok sayıda bileşik potansiyel mutajen ve karsinojendir. Bu grupta bulunan karsinojenlerin metabolizması hassas türler üzerinde çalışılarak aydınlatılmıştır. Bazı karsinojenik aromatik aminlerin tümöre neden olduğu yıllardır bilinmektedir. Örneğin N,N-dimetil-4-aminoazobenzen sıçanlarda (rat) etkili bir karaciğer karsinojenidir, kendisi sıçan karaciğer proteinlerine bağlanamazken, metaboliti bağlanabilmektedir. Bu bileşiklerin ve pek çok diğer karsinojenin genotoksik aktivitesi metabolik enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir (Anders ve Dekant 1994).

N-2-Asetil-2-Aminofluorene (AAF), insanda kanser olgusunun artmasıyla bağlantılı olan aromatik amin grubu bileşiklerin bir sınıfıdır. Başlangıçta bir insektisit olarak kullanılmış olan bu bileşiğin metabolik aktivasyonundaki ilk basamak, (sitokrom P-450 katalizörlüğünde) bir N-hidroksi türevinin oluşumudur. Bu ürün proksimate karsinojen olarak adlandırılır ve nükleik asitlerle reaksiyona girmez. Fakat ardından sitosolik enzimlerin aktivasyonu sonucu oluşan sülfat ya da asetat ester gibi reaktif alkilleyici bir ajandır (Miller ve Surh 1994).

Bilinen en etkili karaciğer karsinojenleri arasında olan Aflotoksinler doğal bir metabolizma ürünü olup, DNA hasarına yol açabilen ilginç bir örnektir. Fungus kaynaklı aflotoksinler arasında en kuvvetli hepatokarsinojen olanı Aflotoksin B1'dir. Aflotoksin B1, karaciğer mikrozomal enzim ekstraktında bulunan P-450'nin, karışık fonksiyonlu oksijenaz enzimleriyle okside olarak, aflotoksin B1-8,9-epoxide denilen bir ana ürüne dönüşmektedir (Groopman ve Cain 1990).

## **1.2. Toksik Bileşiklerin Metabolizması**

Metabolizma, yaşam için gerekli olan ve organizmada meydana gelen bütün kimyasal reaksiyonları tanımlamak için kullanılır. Biyolojik sistemlere giren yabancı maddeler, metabolize edilerek, orijinal bileşiklere oranla suda daha çok çözünen farklı ürünlere dönüşebilir. Organizmaya yabancı olan kimyasal maddelere "ksenobiyotik" adı verilir. Bunların organizmadaki kimyasal değişimlerine de "metabolizma" denmektedir fakat "biyotransformasyon" bu anlamda daha uygun bir terim olarak kullanılmaktadır (Kalkan 1991).



Biyotransformasyon sonucu maddeler genellikle daha az etkili veya etkisiz bileşikler haline getirilirler. Yani biyotransformasyon etkinliğe yansımaları bakımından bir biyoinaktivasyon olayıdır. Bunun için biyotransformasyona detoksifikasyon (zehirsizlenme) adı da verilir; fakat bu terimin ifade ettiği durum her zaman meydana gelmez. Bazen maddeler biyotransformasyon sonucu daha etkili bileşiklere dönüşürler yani biyoaktivasyon olur (örneğin kodein'in morfine ve difenoksilat 'ın difenoksin 'e dönüşümünde olduğu gibi) . Bu olay sonucu maddeler fazla toksik bileşiklere de dönüşebilirler (Kayaalp 1995).

Biyotransformasyon, ilaç etkisinin ortadan kalkması, toksisitenin azalması ve ilacın vücuttan daha kolay atılması olaylarını gerçekleştirir ( Watson 1997; Bağcı 1985).

Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonu, genellikle spesifik olan enzimlerle gerçekleşir. Bu enzimlerin önemli bir kısmı karaciğerde yerleşmiştir. Ayrıca biyotransformasyon barsak, böbrek, akciğer, beyin ve deride de olabilir. Biyotransformasyon mekanizmaları iki fazda toplanabilir: Faz I reaksiyonları yükseltgenme (oksidasyon), indirgenme (redüksiyon) ve kopma olayları, faz II reaksiyonları ise çeşitli konjugasyon ve ya sentez olaylarını içerir. Birinci fazda lipide çözünen ksenobiyotikler daha polar moleküller haline geçerler. İkinci fazda ise endojen maddelerle birleşen bu polar metabolitler inaktif olarak eliminasyona uğrarlar (Vural 1984; Kayaalp 1995).

### **1.2.1. Faz I reaksiyonları**

Faz I reaksiyonları: Oksidasyon (yükseltgenme), redüksiyon ( indirgenme) ve kopmadır.

#### **1.2.1.1 Oksidasyon reaksiyonları**

Yabancı kimyasal maddelerin biyotransformasyonunun faz I reaksiyonlarının önemli bir kısmı, normal metabolizmanın spesifik enzimlerinden farklı *mikrozomal enzimler* tarafından katalizlenir.

**Mikrozomal enzimler:** Karışık fonksiyonlu oksidasyon reaksiyonlarını kataliz eden nonspesifik multienzim sistemi, hücrenin endoplazmik retikulumundan elde edilen mikrozomlarda yerleşmişlerdir. Bu enzimler başlıca karaciğer mikrozomlarında olduğu gibi başka dokularda da bulunmaktadır. Bu enzim sisteminin başlıca komponenti olan sitokrom P-450 bir hemoproteindir. Birçok oksidasyon reaksiyonlarının en son basamağında rol alır. Mikrozomal enzim sistemi, ksenobiyotiklerin oksidasyonunda NADPH ( indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid), moleküler oksijen ( $O_2$ ), ve  $Mg^{+2}$  kullanılır. Yabancı bir kimyasal maddenin, yani substratın (RH), bu enzim sistemi ile oksidasyonunda, moleküler oksijenin bir atomu substratı oksitlerken (ROH), diğer oksijen atomu da suya indirgenir (Bökesoy ve ark. 2000; Vural 1984).

#### **a) Mikrozomal karışık fonksiyonlu oksidazlarla oluşan reaksiyonlar**

Karışık fonksiyonlu oksidazlar, birçok oksitlenme reaksiyonlarını kataliz ederler. Memeli hücrelerinin birden fazla sitokrom P-450 içerdiği gösterilmiştir. Çeşitli sitokrom P-450'ler kromatografik davranışları, immunolojik spesifiklik ve substrat spesifiklikleri açısından olduğu gibi yapılarındaki polipeptid zincirinin farklılığına göre ayrılmaktadırlar. Ancak genel olarak monooksijenazların oksitleme reaksiyonları aynı temele dayanmaktadır. Bu nedenle de birçok kimyasal yapıdaki maadelerin oksidasyonunda rol oynarlar. Aromatik hidroksilasyon ve epoksit oluşumu, dealkilasyon, oksidatif deaminasyon örnek olarak verilebilir (Bökesoy ve ark. 2000; Vural 1984; Kayaalp 1995).

#### **b) Mikrozomal olmayan (nonmikrozomal) oksidasyonlar**

Yabancı maddelerin oksidasyonunda karışık fonksiyonlu oksidazlar yanında, birçok oksidoredüktazlar da rol oynarlar. Bu enzimler doku homojenatlarının mitokondriyal fraksiyonlarında yerleşmişlerdir (Bökesoy ve ark. 2000; Vural 1984).

Alkol dehidrojenazlar ( $AD_1 H$ ) alkollerin aldehit ve ketonlara oksitlenmesini kataliz eden enzimlerdir (Bökesoy ve ark. 2000; Vural 1984).

### 1.2.1.2 Redüksiyon reaksiyonları

Oksidasyona oranla metabolizmada daha az meydana gelen bir olaydır. NADPH ile birlikte FAD (flavin adenin dinükleotid) veya diğer flavinlerin yardımıyla olur. Aldehitlerin alkollere dönüşümü, azo (N=N) grubunun aminlere dönüşümü ve nitro grubunun amin veya hidroksilamin grubuna dönüşümü bu reaksiyonların en önemli 3 örneğidir. Ayrıca ketonların primer ve sekonder alkollere dönüşümü, çift bağların doyurulması da indirgenmeye örnektir (Bökesoy ve ark. 2000; Vural 1984).

### 1.2.1.3 Kopma reaksiyonları

Kimyasal madde molekülünden bir grubun koparılması ya da molekülün kendini oluşturan daha ufak iki moleküle ayrılması suretiyle olabilir. Bunun çeşitli şekilleri vardır (Kayaalp 1995).

**a) Hidroliz:** Kan, karaciğer, böbrek, sinir sistemi ve diğer yapılarda bulunan çeşitli esterazlar, esterleri hidroliz ederek inaktif hale getirirler (Kayaalp 1995).

**b) Dekarboksillenme:** Karboksil grubu içeren ilaçlar (örneğin, alfa-metil dopa) veya endobiyotikler (örneğin, histidin) çeşitli dekarboksilaz enzimleri etkisi ile karboksil gruplarını kaybederler ve aminlere dönüşürler (Kayaalp 1995).

**c) Glikozidlerin hidrolizi:** Dijital glikozidleri vücutta şeker zincirini oluşturan monosakkaridlerin,  $\beta$ -glikozidaz tarafından koparılması suretiyle biyotransformasyona uğrarlar (Kayaalp 1995).

**d) O-dealkilasyon, N- dealkilasyon ve S-dealkilasyon:** Alkil gruplarının kopmasıyla gerçekleşir (Kayaalp 1995).

### 1.2.2. Faz II reaksiyonları

Hidroksil, amino, karboksil, epoksit veya halojen grubu içeren ksenobiyotikler; faz I reaksiyonları sonucu oluşan metabolitler veya birçok doğal maddeler sentez ( konjugasyon veya faz II ) reaksiyonları sonucu daha polar özellik kazanırlar. Böylece atılımları daha kolaylaşır ve toksisiteleri de azalır (detoksifikasyon veya detoksikasyon) (Güven 1999; Vural 1984).

Vücutta kimyasal maddelerin biyotransformasyonu, kimyasal maddenin veya onun bir metabolitinin bir radikalın veya başka bir madde molekülünün kovalent bağlarla bağlanması suretiyle olabilir. Bu tip kimyasal olaylara konjugasyon denilir. Konjugasyon 8 şekilde olur; bunlardan ilki hariç diğerleri mikrozomal olmayan enzimler tarafından yapılır (Kayaalp 1995).

**a) Glukuronik asitle birleşme:** Fenoller, hidroksilli steroidler, alkoller ve karboksilli asitler glukuronik asilde konjuge edilerek inaktive edilirler (Kayaalp 1995). Reaksiyon uridin difosfat glukuronil transferaz ( UDP- glukuronil transferaz) enzimi tarafından katalize edilir. Bu enzimler karaciğer hücrelerinin mikrozomal fraksiyonunda bulunur (Bökesoy ve ark. 2000; Vural 1984; Kayaalp 1995).

**b) N-metilasyon:** N-metil transferaz enzimleri tarafından yapılır. Bu enzim metil donörü olan aktifleşmiş metioninden aldığı metil grubunu yabancı maddenin azot atomuna bağlar (Kayaalp 1995).

**c) O- metilasyon:** O- metil transferaz enzimleri tarafından yapılır. Metil donörü, bu olayda da aktifleşmiş metionindir (Kayaalp 1995).

**d) N-asetilasyon:** N- asetil transferaz enzimleri tarafından katalize edilir. Asetil grubu asetilkoenzim A'dan sağlanır (Kayaalp 1995).

**e) Sülfat ile konjugasyon:** Primer, sekonder, tersiyer alkoller, fenoller ve arilaminler endojen sülfat ile "sülfat esterlerini" oluşturur. Bu konjugatlar iyonize

ve suda çözündükleri için hızlı bir şekilde organizmadan atılırlar (Bökesoy ve ark. 2000; Vural 1984; Kayaalp 1995).

**f) Glutation ile konjugasyon:** Aromatik hidrokarbonların ve diğer bazı bileşiklerden oluşan epoksidler, karaciğerde indirgenmiş glutation ile konjuge edilerek inaktive edilirler (Kayaalp 1995).

**g) Amino asitler ile konjugasyon:** Bazı yabancı maddeler karaciğerde glisin veya glutamin ile konjuge edilirler (Kayaalp 1995).

**h) Diğer konjugasyon olayları:** Purin veya primidin analogu olan maddeler, riboz ve riboz fosfatlarla konjuge edilebilirler ve böylece ribonükleotid ve ribonükleozid konjugantlarına dönüşebilirler (Kayaalp 1995).

### 1.3. Genotoksik Ajanların Etki Mekanizmaları

DNA kalıtsal materyal olduğu için gelecek nesillere değişmez bir formda aktarılması gerekir (Erkan 1992). Her ne kadar, genler kararlı ve yeni döllere bütün özelliklerini koruyarak geçseler de zaman zaman doğal ve yapay koşullar altında bazı değişikliklere uğrar. Bu değişikliklere mutasyon denir. Mutasyon kalıtsal materyalin türe özgü normal kombinasyonunu değiştirmeyen, kalıtsal yapıdaki herhangi bir değişikliktir (Akman 1983; Demirsoy 1992; Bağcı 1989; Oraller 1990).

Mutasyonlar doğada kendiliğinden meydana gelebildiği gibi, mutajen adı verilen fiziksel ve kimyasal dış etkenler tarafından da meydana gelebilir. Mutasyonların normal koşullarda kendiliğinden (=spontan) meydana gelme oranı  $10^{-5}$ - $10^{-10}$  gibi çok düşükken mutajenlerin etkisi ile mutasyon frekansı oldukça yüksektir (Bağcı 1989; Oraller 1990).

Bir genin baz dizisindeki bir değişim bazen o gen tarafından kodlanmış olan üründe de değişime sebep olabilir. Böyle mutant bir genin mutant enzimi, aminoasit dizisindeki meydana gelen değişme sebebiyle inaktif ya da daha az aktif olabilmektedir. Eğer hücre mutasyon sonucu ihtiyaç duyduğu bir fenotipik

özelliği yitirirse genotipikteki bu değişiklik zararlı ya da öldürücü olabilir. Bununla birlikte bir mutasyon faydalı da olabilir. Örneğin mutant bir gen tarafından kodlanan enzim, hücreye avantaj sağlayan yeni bir aktiviteye sahip olursa bu mutasyon çeşidi nadir de olsa canlıya doğal seleksiyonda avantaj kazandırır (Saleh 1997; Cariello ve Piegorsch 1996).

Toksik maddelerin genetik materyal ile etkileşimi ve bunun sonucunda meydana gelen mutasyon çeşitleri, kromozom mutasyonları ve gen mutasyonları(moleküler düzeyde) olmak üzere iki farklı mekanizma ile açıklanmaktadır.

### 1.3.1. Kromozom mutasyonları:

Kromozom sayı değişimleri ve kromozom yapı değişiklikleri olarak 2 ye ayrılır.

#### 1.3.1.1 Kromozom sayı değişimleri

Canlıların kromozom sayıları cinsten cinse, hatta türden türe değişiklik gösterir ama her tür için sabittir. Mitoz ve mayoz bölünme sırasında kromozomlar bazen düzenli olarak ayrılamazlar ve kromozom sayısı bakımından farklı hücreler meydana gelir (Demirsoy 1992; Griffiths ve ark. 1996).

Kromozom sayı değişimleri Anöploidi ve Öploidi olmak üzere 2 ye ayrılır.

**a) Anöploidi;** normal kromozom setinde bir ya da birkaç kromozomun eksilmesine ya da eklenmesine denir. Organizma tam bir kromozom takımı değil, bir ya da birden fazla kromozom kazanır ya da kaybeder. 3 'e ayrılır (Temizkan 1999; Demirsoy 1992; Şahin 1995). Monosomi, Nullosemi ve Polisomi' dir.

**Monosomi;** bir kromozom eksikliği olması durumudur ( $2n-1$ ). **Nullosemi;** bir takımda kromozomun homoloğu ile birlikte eksik olması yani bir kromozom çeşidinin hiç bulunmaması olayıdır ( $2n-2$ ). **Polisomi;** bir takımdaki kromozomların birinin veya birkaçının artmasıdır. Trisomik fertlerde kromozom

sayısı  $2n+1$ , tetrasomiklerde  $2n+2$ , polisomiklerde  $2n+3$  dür (Klug ve Cummings 2003).

**b) Öploidi;** kromozom takımı sayısındaki değişmedir. Bir takımdaki kromozomların hepsinin birden sayısının tam katlar halinde artması ya da organizmada sadece tek takım kromozom bulunması şeklinde olabilir. Monoploidi, Poliploidi ve Endopoliploidi şeklinde oluşabilir (Klug ve Cummings 2003).

**Monoploidi;** normalde diploid olan bitki ve hayvan hücrelerinde ender olarak bazı bireylerin hücrelerinde sadece bir takım yani  $n$  sayıda kromozom bulunur. Bu olaya monoploidi denir. Böylece bireylere monoploid denir. Monoploidler genellikle dölenmemiş yumurtanın gelişmesiyle oluşurlar. Bir monoploidin germ hücreleri mayozu normal geçiremez, çünkü kromozomlarının eşlenen ortakları yoktur. Böylece monoploidler karakteristik olarak kısır dırlar (Klug ve Cummings 2003).

**Poliploidi;** haploit kromozom takımının ikiden fazla bulunmasına poliploidi denir. Poiploidlerin adlandırılması kromozom takımı sayısına göre yapılmaktadır. Triploit  $3n$ , tetraploit  $4n$ , pentaploit  $5n$ , kromozomun bulunduğu simgeler ve isimlendirme bu şekilde devam eder. Poliploidi 3 gruba ayrılır:

**Otopoliploidi;** bir poliploidin sahip olduğu kromozom takımlarının hepsi aynı türe aitse meydana gelen duruma otopoliploidi (autopoliploidi) denir (Klug ve Cummings 2003).

**Allopoloidi;** bir poliploidin sahip olduğu genomlar birden fazla türe ait ise meydana gelen duruma allopoloidi denir (Klug ve Cummings 2003).

**Endopoliploidi;** diploid olabilecek bazı hücrelerin poliploit olma durumudur. Bu tip hücrelerde replikasyon ve kromozomların ayrılması, çekirdek bölünmesi

olmadan cereyan eder. Endopoloidi, endomitozis denilen işlemin sonucudur (Klug ve Cummings 2003).

### 1.3.1.2 Kromozom yapı değişimleri (Kromozom mutasyonları)

Bazen kromatidler, crossing over olmadan da parça değişimine (kazanılması yada kaybedilmesi) uğrayabilirler (Demirsoy 1992). Kromozom kırılmaları ve tekrar eşleşmeleri sonucu kromozomlar yapısal olarak tekrar organize olurlar. Bu değişimde kromozomun yapısında farklılığa yol açar (Vural 1984; Şahin 1995; Tatlı 1992).

Kalıtılarda değişimlere yol açan olaylar kromozomların yapılarındaki değişimler sonucunda da oluşabilir. Bu olaylarda kromozom sayısı aynı kalır. Ancak kromozomlarda bazı parçaların kaybolması, artması ya da yer değiştirmesi şeklinde kalıtılarda değişimlere uğrayabilir (Demirsoy 1992; Griffiths 1996).

Yapı değişimlerinin hepsinde önce kromozomda ya da kromozomları oluşturan kromatidlerin birinde, bir ya da birden fazla kırılmalar olabilir. Kırılmalar kendiliğinden olabileceği gibi; X ışını, UV, Gamma( $\gamma$ ) ışınları ve kimyasal maddeler gibi dış etkenler tarafından da oluşabilir. Kromozom kırıklarına neden olan etkenlere 'Radiometrik etkenler' adı verilir (Temizkan 1996).

Kromozom yapı değişimindeki kırılmalar iki şekilde meydana gelir. Bunlar kromatid tipi kırılmalar ve kromozom tipi kırılmalardır. Kromatid tipi kırılma kromozomun yalnız bir kromatidinde kırılma olmasıdır. Kopan parça sağlam olan kardeş kromatidin, yanında ve ona çok yakın olarak kalır. Bu tip kırılmaların çoğunda kırık uçlu parçalar yeniden birbirine yapışır. Kromozom tipi kırılmalarda ise her iki kromatid aynı noktadan kırılır, iki kırık uç meydana gelir ve kromozomun biri sentromerli (sentrik), diğeri sentromersiz (asentrik) olmak üzere iki parçaya ayrılır. Kromozom yapı değişiklikleri delesyon, dublikasyon, inversiyon ve translokasyon gibi şekillerde meydana gelebilir (Temizkan 1996).

**Delesyon;** kromozomun parça kaybetmesi olayıdır. Bazı araştırmacılar kromozomun ucundan parça kopup kaybolmasına 'defisiyens', aradaki herhangi



bir bölgeden bir parçanın kopup kaybolmasına 'delesyon' olarak adlandırmışlardır (Temizkan 1996). Her iki şekilde de organizma bazı genlerini kaybetmiş olur. Kopan parça herhangi diğer bir kromozoma bağlanamaz, hücre bölünmesine de katılamaz. Büyük bir olasılıkla yeni oluşacak çekirdeğin dışında kalır (Demirsoy 1992; Oraller 1990; Bozlan ve Bianchi 2000; Başaran 1983).

Delesyonda hücre diploid ise, kaybolan genlerin alleleri kardeş kromozom üzerinde bulunacağından öldürücü olmaz. Fakat gen dengesinin ve sonuçta fenotipin değişmesine neden olur. Eğer yitirilen parça çok büyük ise gen dengesi tamamen bozulur ve ölüm meydana gelir. Erkeklerin X kromozomunda meydana gelecek bu şekilde bir parça yitirilmesi, Y kromozomu üzerinde alleli olmadığı için ölüm gerçekleşebilir. Parça yitirilmesi ile bazı canlıların parazit ya da saprofit yaşama uyum gösterdikleri savunulmuştur. Bu yolla bazı enzimler yitirilince, zorunlu olarak parazitizm veya saprofitizm ortaya çıkar (Demirsoy 1992).

**Dublikasyon;** bir kromozom segmentinin kromozom üzerinde çift olarak taşınmasına dublikasyon denir. Dublikasyonda delesyonun tersine parça çoğalması vardır (Demirsoy 1992; Temizkan 1996; Şahin 1995).

Bu çoğunlukla, düzenli işlemeyen bir krosing- overde meydana gelir. Normal olarak ilk mayoz sırasında eş genler sinaps yaparlar. Ayrılırken normal bir bölünme olmazsa kromotidlerden biri, o gen bakımından diploid olur; diğeri ise o genden yoksun kalır (Klug ve Cummings 2003).

Dublikasyon, evrim bakımından önemlidir. Çünkü hücreye ek DNA girmesini ve böylece orijinal gen kompleksini bozmadan mutasyonların meydana gelmesini sağlar. Genellikle zararlı bir etkisi yoktur fakat bazen gen dengesini bozduğu için zararlı sonuçlar doğurabilir (Klug ve Cummings 2003; Demirsoy 1992).

**İnversiyon;** kromozomdan kopan bir parçanın 180° ters dönerek koptuğu bölgeye tekrar bağlanmasıdır. İnvorsiyonda genetik bilgi kaybı yoktur, sadece doğrusal gen sırası yeniden düzenlenmiştir. Kırılmadan önce, kromozomda halkaya benzer bir yapı oluşur. Kırılmayla ortaya çıkan 'yapışkan uçlar' birbirine yaklaşır ve tekrar birleşir. Ters çevrilen parça kısa ya da uzun olabilir, sentromeri içerebilir ya da içermeyebilir. Ters çevrilen parça sentromeri içine almışsa,

inversiyon perisentrik olarak adlandırılır. Sentromer yeni düzenlenen kromozom parçasının içerisinde değilse bu tip inversiyona parasentrik denir. Parasentrik inversiyonda, gen dizisi ters çevrildiği halde sentromerden uzanan kolların boy oranı değişmez. Bazı perisentrik inversiyonlarda, bunun tersine, kromozom kollarının uzunluklarının birbirine oranı inversiyondan sonra değişir (Klug ve Cummings 2003).

İnversiyon geçirmiş bir kromozom normal bir kromozomla sinaps yaptığı zaman, allel genler karşı karşıya gelmedikleri için düzensizlikler ortaya çıkar. Krosing-over meydana gelmez ve gen kombinasyonlarında azalma ortaya çıkar. Çok yakın türler ve alt türler arasında meydana gelen melezlemelerden bazı uygun olmayan sinapsların ortaya çıkmasının en büyük nedeni, doğada kromozom değişiminin en yaygın şekli olarak görülen inversiyonlar olduğu saptanmıştır (Demirsoy 1992; Oraller 1990; Şahin 1995; Klug ve Cummings 2003).

**Translokasyon;** homolog olmayan kromozomlar arasında kromozom parçalarının yer değiştirmesine translokasyon adı verilir. Kromozom parçasının, homolog kromozoma taşınması halinde ise verici kromozom delesyona, alıcıda dublikasyona uğramış olur.

Basit translokasyonda, bir kromozomda tek bir noktada kırılma olur ve parçalardan biri bir başka kromozomun ucuna yapışır. Kromozom uçlarının yapışkan olamama özelliği nedeniyle basit translokasyon oldukça ender görülür. İnterkalar translokasyonda kromozomların birinde iki yerde, bir başkasında ise tek noktada kırılma olur ve aradan çıkan parça tek noktada kırılma olur ve aradan çıkan parça tek noktada kırığın olduğu kromozomun o bölgesine eklenir. Karşılıklı translokasyon ise en fazla rastlanan ve en iyi araştırılmış olandır. Bu tipte, iki ayrı kromozomda birer kırılma olur ve kopan parçalar birbirinin yerine geçer (Demirsoy 1992; Şahin 1995; Başaran 1983).

Translokasyonlar, yeni gen kombinasyonlarını ve hücrede DNA miktarının değişmesini sağladığı için evrimsel olarak önemlidir (Demirsoy 1992, Şahin 1995; Klug ve Cummings 2003). Translokasyonlar insanda çoğu kez çeşitli fenotipik anormallikler meydana getirirler, düşüklere veya doğumdan sonra birkaç ay içinde ölüme yol açarlar ( Başaran 1983; Klug ve Cummings 2003).

### 1.3.2. Gen mutasyonları

Bir tek gende meydana gelen mutasyonlara gen mutasyonları denir. Kromozom mutasyonlarında birden fazla gen söz konusu iken, gen mutasyonlarında değişiklik bir gen ile sınırlıdır (Ateş 2002).

Gen mutasyonları kendi içerisinde değişik şekilde sınıflandırılmaktadır. Bunlardan biriside fenotip etkilerine ve genetik materyale etkilerine göre sınıflandırmaktır (Ateş 2002).

**1.3.2.1 Fenotipe etkilerine göre gen mutasyonları:** Somatik mutasyonlar, morfolojik mutasyonlar ve besinsel mutasyonlardır.

**a) Somatik mutasyonlar;** gamet olmayan hücrelerde meydana gelen mutasyonlara denir. Somatik mutasyonlar nesilden nesile aktarılmaz, sadece meydana geldiği bireyi etkiler. Gelişmenin erken evrelerinde meydana gelen somatik mutasyonlar çok sayıda hücreyi etkilerken, olgunlaşmış bireyde ortaya çıkan somatik mutasyon daha az hücreyi etkiler. Gametlerde meydana gelen mutasyonlar nesilden nesile aktarılır ve bunlar germ line mutasyonları olarak ifade edilir (Ateş 2002).

**b) Morfolojik mutasyonlar;** bu çeşit mutasyonlara görülebilen mutasyonlar da denir ve genlerde meydana gelen değişiklik morfolojik olarak fark edilebilir. Örnek olarak memelilerde görülen albino durumu verilebilir. Albino durumunda saç, cilt ve gözlere koyu renk veren melanin pigmentinin üretilmesinde anahtar rol oynayan tirozinaz enzimi kodlayan gen kusurludur. Bu nedenle melanin üretilmez.

*Drosophila*'da görülebilen beyaz göz (normalde kırmızı), kıvrık kanat ve yuvarlak olamayan(bar) gözlülük morfolojik mutasyonlardır. Mikroorganizmalarda mutasyonların neden olduğu morfolojik değişiklik bir tek organizmadan değil, koloniden fark edilebilir. *Streptococcus pneumoniae* R tipinin düz olmayan koloni oluşturması, petite olarak isimlendirilen mutant

mayanın normalden daha küçük koloni teşkili örnek olarak verilebilir (Ateş 2002).

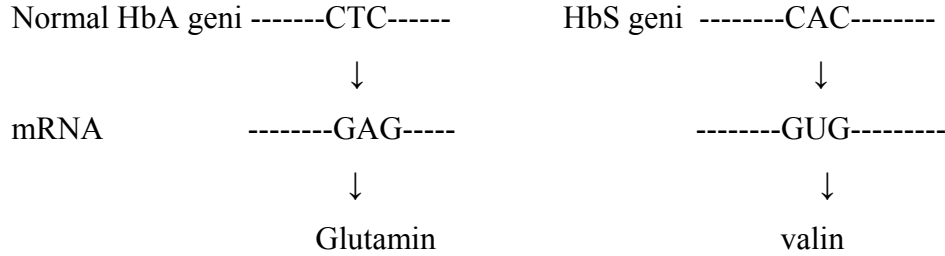
**c) Besinsel mutasyon;** bazı mikroorganizmaların normal tipleri (yabani tip) sadece tuzlar ve glukoz ihtiva eden minimal besi ortamında yaşamlarını sürdürürken, bu organizmaların bazı tipleri minimal ortamda yaşamlarını devam ettiremezler ve ilave maddelere gereksinim duyarlar. Örnek bio *E.coli* ve leu coli, *E. coli'* nin bu mutant tiplerinde söz konusu maddeleri sentezleyen enzimi kodlayan gen kusurludur (Ateş 2002).

### 1.3.2.2 Genetik materyale etkilerine göre gen mutasyonları

Nokta mutasyonları olarak da ifade edilen bu mutasyonlar DNA üzerine etkilerine göre alt gruplara ayrılır. Bunlar bir gende bir veya birkaç bazın değişmesi, ilavesi veya delesyonu şeklinde ortaya çıkabilir. Nokta mutasyonlarına da bir genin mutant alleli ile normal olan yabani tipi arasında sadece bir baz çifti bakımından farklılık olabilir. Genetik materyale etkilerine göre gen mutasyonları; (Klug ve Cummings 2003).

**a) Yanlış anlamlı (missense) mutasyonlar;** gendeki bir baz değişikliği bir kodonun anlamını bir amino asitten başka bir amino aside değiştirir. Yanlış anlamlı mutasyona en iyi örnek orak hücreli anemidir. Bu hastalıkta eritrositlerde bulunan ve oksijen taşıyan bir protein olan hemoglobinde kusur vardır. Bu nedenle eritrositler orak şeklinde olur. Normal bireylerin hemoglobini HbA, orak hücreli bireylerin hemoglobini HbS olarak belirtilir. Her iki hemoglobin tipi de  $\alpha$  ve  $\beta$  zincirlerinden meydana gelir. Ancak  $\beta$  zincirinde HbA da 6. pozisyonda glutamik asit bulunurken, aynı pozisyonda HbS valin amino asidine sahiptir. Bu bir tek amino asit değişikliği HbS taşıyan eritrositlerin orak şeklini almasına neden olmaktadır. Amino asitlerdeki değişikliğin nedeni ise  $\beta$  zincirini kodlayan gendeki mutasyondur (Klug ve Cummings 2003; Ateş 2002).

Şekilde görüldüğü gibi HbA' daki timinin adenine değişmesi, glutamik asit kodonunun valin kodonuna değişmesine neden olmuş ve HbS yapısına valin girmiştir.



Orak hücreli anemi Orta Afrika popülasyonunda oldukça yaygındır. Homozigot durumunda öldürücü olan bu hastalık heterozigot durumda bireyi sıtma hastalığı parazitinin eritrosit içerisinde çoğalmasını önleyerek koruyucu olmaktadır (Ateş 2002).

**b) Çerçeve kayması mutasyonları;** DNA'nın yapısına yeni nükleotidlerin ilavesi veya DNA'nın yapısından birkaç nükleotidin çıkmasıyla oluşan mutasyonlara çerçeve kayması mutasyonları denir. Çerçeve kayması mutasyonlarında bir veya birkaç nükleotidin yapıya ilavesi veya çıkması kodonların okunuşunu değiştirir (Klug ve Cummings 2003).

Çerçeve kayması mutasyonlarında, genin ürünü protein insersiyon veya delesyon bölgesinden itibaren normal proteinden farklılık gösterir. İnsersiyon veya delesyon genin 5' ucuna yakın ise mutant genin ürünü inaktif, 3' ucuna yakınlık durumunda ise ürün kısmen aktif olabilmektedir (Ateş 2002).

**c) Transisyon;** bir baz çiftinin başka bir baz çiftine değişmesidir. En çok rastlanılan mutasyon tipidir. Bu değişimde, bir pürin bazı yerine başka bir pürin bazı, bir pirimidin bazı yerine başka bir pirimidin bazı geçer (Klug ve Cummings 2003).

Spontan olarak transisyonun meydana gelişinde DNA'nın yapısındaki 4 bazın tautomerik form değişikliği etkilidir. Tautomerik form değişikliği, bazlarda bulunan bazı H atomlarının yerlerini değiştirmesiyle ortaya çıkar (Ateş 2002).

-NH<sub>2</sub>, amino grubu-----> NH imino grubuna

-C=O, ketoformu -----> C-OH enol formuna değişebilir.

Geçici olarak meydana gelen tautomerizm baz eşleşmelerini değiştirir. Örneğin Adenin –NH<sub>2</sub> grubu taşıyan formu normalde timinle eşleşir. A-T

Ancak imino formuna dönüşmüş A,C ile eşleşir. Bu durumda T,C ye değişmiştir. Düzeltme olmazsa, bir sonraki replikasyonda, Adenin amino formuna dönerek karşısına T alabilir. A-T ile C ise G ile eşleşir. Ve G-C meydana gelir. Sonuçta meydana gelen yeni DNA çift sarmalının birisi AT yerine G-C ihtiva eder (Ateş 2002).

**d) Transversiyon;** transversiyonda bir pürin bazı ile bir primidin bazı veya bir primidin bazı ile bir pürin bazı birbirlerinin yerine geçer (Klug ve Cummings 2003).

Normal hücrelerde bulunan c-Ha-ras geni (proto-onkogen) ras proteini denilen G-proteini kodlar. G –proteinleri gibi ras proteini GTP bağlar ve hücreyi stimüle eder. Sonra da GTP'yi hidroliz ederek sinyali sonlandırır. Normal fonksiyon yapan c-has-ras geninde G→T transversiyonu, ras proteininde glisin yerine valin geçmesine neden olmakta ve bu durumda GTP hidroliz edilememektedir. Hücre bölünme kontrolünü kaybetmekte ve sürekli bölünmektedir (Ateş 2002).

Bunların dışında birçok nokta mutasyon tipi vardır. Örneğin sessiz (silent) mutasyonda bir amino asidi kodlayan kodon, yine aynı amino asidi kodlayan başka bir kodona dönüşebilir. Fakat bunun organizmaya zararı yoktur. UCA ve UCG kodonları serini kodlar. UCA → UCG ye değişimi proteinin yapısında değişikliğe neden olmaz. Ayrıca genler arası bölgede ve intronlarda meydana gelen mutasyonlarda genin ürününü etkilemediğinden organizmaya zararsızdır (Demirsoy 1992; Klug ve Cummings 2003).

Anlamalı bir kodonunun stop kodonuna dönüşmesine neden olan mutasyona anlamsız (nonsense) mutasyon denir (Klug ve Cummings 2003).

Bir mutasyonun neden olduğu değişiklik, ikinci bir mutasyon etkisiyle düzeltiliyorsa, bu ikinci mutasyona baskılayıcı mutasyon denir. Baskılayıcı mutasyon ile birinci mutasyon aynı gen içinde olursa gen içi (intragenic), farklı genlerde olursa gen dışı (intergenic) baskılayıcı mutasyon olarak isimlendirilir (Ateş 2002).

#### **1.4. DNA ONARIMI**

DNA'nın nesilden nesile değişmeden kalması, molekülün iki önemli özelliğinden kaynaklanır. Birincisi; DNA molekülünün doğru olarak kendini replike etmesi, ikincisi; DNA molekülünde oluşabilen hasarların çeşitli tamir mekanizmalarıyla giderilmesidir. Verilere göre genler oldukça kararlıdır ancak çeşitli nedenlerden dolayı DNA 'da bazı değişiklikler olabilmektedir. Aslında düşük oranda mutasyon genetik çeşitliğe neden olmakta, genetik çeşitlilikte tabi seleksiyonun ham materyalini oluşturmaktadır. Yapılan hesaplamalara göre 200 000 yılda bir ancak bir mutasyon olmaktadır. Mutajenler tarafından DNA' da hasarlar oluşabilmektedir. Bu hasarlar tamir edilmezse mutasyonlar meydana gelebilir (Ateş 2002; Klug ve Cummings 2003).

##### **1.4.1. Fotoreaktivasyon ile onarım**

Sistem fotoreaktivasyon enzimi (PRE) olarak adlandırılan bir proteinin aktivesine bağlıdır. Bu molekül *E. coli* hücrelerinin özütlerinden elde edilir. Enzimin aktivasyon şekli timin dimerleri arasındaki bağları kırmaktır. Böylece UV radyasyonunun DNA üzerindeki etkisini tersine çevirir. Enzim bir dimere karanlıkta bağlanabilirken, dimeri kırmak için bir ışık fotonunu absorbe etmek zorundadır. UV radyasyonunun etkilerini tersine çevirmek için diğere onarım sistemleri olan insan ve diğere ökaryotlarda bu onarım yoktur (Klug ve Cummings 2003).

### 1.4.2. Alkilasyon hasarının onarımı

Alkilleyici ajan olarak bilinen mutajenler, memeli hücre DNA'sındaki bazların ya da fosfatların reaktif bölgelerinde bulunan, N- ya da O- atomlarına metil ya da etil gruplarını aktarırlar (Calleja ve ark. 1999). Alkillenen bazlar yanlış baz eşleşmeleri yapar. DNA meydana gelen bu hasar, metil transferaz enzimi ile özgün bir şekilde onarılır. Bu enzim hatalı bazları değil, sadece onlara bağlı metil gruplarını kopararak uzaklaştırır (Russel 1998).

### 1.4.3. Kesme-çıkarma onarım yolu

Tüm prokaryotik ve ökaryotik organizmalarda bulunur. 3 aşamada gerçekleşir.

1) Bozuk bölge veya hata tanınır ve enzimatik olarak bir nükleaz tarafından kesip-çıkarılır.

2) DNA polimeraz I, sağlam zincirdeki nükleotidlere uygun olarak boşlukları doldurur.

3) DNA ligaz ile çentik yapıştırılır ve boşluk tamamen kapanır (Klug ve Cummings 2003).

İki tip kesip-çıkarma onarımı vardır.

#### 1.4.3.1 Baz kesip-çıkarma onarımı (BER)

Bu onarım DNA bazlarının spontan hidrolizi ve onları kimyasal yolla değiştiren etkenler nedeniyle oluşan azotlu bazların hasarının onarılmasıyla ilgilidir. Onarımın ilk basamağında kimyasal olarak değişen bazın DNA glikozilazlar tarafından tanınması vardır. Enzim bazla şeker arasındaki glikozidik bağı koparır ve apirimidinik (AP) bölge oluşturur. Bazı olamayan bu tür bir şeker, daha sonra AP endonükleaz olarak adlandırılan bir enzim tarafından tanınır. Endonükleaz, AP bölgesinin şeker omurgasında bir çentik oluşturur. Bu durum DNA sarmalında kesip-çıkarma onarımınca tanınan bir bükülme yaratır, aktive



edilen kesip-çıkarma onarımı hasarı düzeltir (Turner ve ark. 2004; Klug ve Cummings 2003).

#### **1.4.3.2 Nukleotit kesip-çıkarma onarımı (NER)**

Baz kesip-çıkarma onarımı DNA'daki modifiye bazları tanır ve değiştirirken, NER UV tarafından uyarılan primidin dimerlerini ve DNA'daki büyük lezyonları onarır. Nukleotit kesip-çıkarma onarımı *uvr* gen ürünleri, DNA'daki lezyonların tanısı ve kesip çıkarılmasıyla ilgilidir. Onarım daha sonra DNA polimeraz I ve DNA ligaz tarafından tamamlanır (Turner ve ark. 2004; Klug ve Cummings 2003).

Ökaryotik NER 'de DNA hasarının tespiti ve kesip çıkarımı, transkripsiyon faktör TFIH' yi de kapsayan en az 18 polipeptid faktörünü içine alan karmaşık bir işlemdir (Turner ve ark. 2004).

#### **1.4.4. DNA polimeraz proofreading ile onarım**

DNA polimeraz III bir hata-okuma işlevine sahiptir. Polimerizasyon esnasında hatalı bir nükleotid yerleştiğinde enzim kompleksinin hatayı tanıma ve hatalı nükleotidi keserek değiştirme ve onu geri döndürme potansiyeli vardır (Klug ve Cummings 2003).

#### **1.4.5. Yanlış eşleşme onarımı (Mismatch Onarım = MER)**

Kesip-çıkarmanın özel bir formu olan yanlış eşleşme onarımı, replikasyon sırasında ve hata-okumasından kaçmış olan herhangi bir yanlış baz eşleşmesi ile ilgilidir (Turner ve ark. 2004).

MER' de değişiklik veya yanlış eşleşme tanınmalı, doğru olmayan nükleotidler uzaklaştırılmalı, doğru nükleotidlerle yer değiştirme gerçekleşmelidir. Fakat yanlış eşleşme düzeltilmesiyle ilgili olarak özel bir problem vardır. Onarım sistemi hangi zincirin doğru (replikasyonda kalıp) ve hangisinin yanlış eşleşmiş bazı (yeni sentezlenmiş zincir) bulundurduğunu nasıl

tanıyacaktır? Eğer yanlış eşleşme tanınır fakat ayrımı yapılmazsa ve kesip-çıkarma rasgele yapılırsa, doğru bazı taşıyan zincirin kesip çıkarılması şansı eşittir (Klug ve Cummings 2003).

#### **1.4.6. Rekombinasyonel onarım**

Primidin dimeri gibi herhangi bir çeşit lezyon bulunduran DNA replike olurken, DNA polimeraz önce lezyonda duraklar ve sonra yeni sentezlenen zincir boyunca bir boşluk bırakarak onun üzerinden atlar. Buna bir yanıt olarak RecA proteini rekombinasyonel bir değiş-tokuş işlemi yürüterek başlangıçta hasarsız komplementer zincirde bulunan bir segmenti bu boşluğa sokup onu tamamlar. Bu işlem "verici" zincirde bir boşluk bırakır. Bu boşluk daha sonra, replikasyon ilerlerken onarım sentezince doldurulur (Klug ve Cummings 2003).

#### **1.4.7. SOS onarım mekanizması**

*E. coli* 'de UV radyasyonu, alkilleyici ajanlar DNA' da bir hasar yaptıklarında SOS cevabı denilen karmaşık bir sistemi uyarırlar. DNA sentezi esnasında, bir lezyonun üstünden atlamak yerine sistem DNA polimerazın lezyon karşısında replikasyonunun devamına olanak veren koşulları hazırlar. Boşluk oluşturulmazken, replikasyon doğruluğundan fedakârlık edilerek uyum sağlanır bu nedenle sistem " hataya-meyilli" olarak tanımlanır (Klug ve Cummings 2003).

#### **1.4.8. Çift zincir kırıklarının onarımı**

İyonize radyasyona maruz kalan DNA sarmalının her iki zincirinin kırılması durumunda bu onarım mekanizması devreye girer. Bakterilerde ve ökaryot hücrelerde meydana gelir. Bu sistem iki DNA parçasının yeniden birleşmesinden sorumludur. Bu onarım yolu bozuklukları, immün yetmezlik ve X-ışını aşırı duyarlılığına neden olur (Turner ve ark. 2004).

Replikasyon sonrası onarıma benzer şekilde, çift zincir kırık onarımıyla ilgili bir yola homolog rekombinasyonel onarım adı verilir. Çünkü hasarlı DNA gerçekten de hasarsız homolog DNA ile değiştirilir. Bu bir zorunluluktur. Çünkü

her iki zincirde kırıldığından onarım esnasında komplementer DNA zinciri olarak kullanılacak hasarsız atasal bir zincir bulunmamaktadır. Bundan dolayı, homolog bölgesinde mevcut olan genetik bilgi hasarlı çift zincir kırığın yerine geçmede kullanılır. Hasarsız homolog bölge rekombinasyonla fiilen hasarlı DNA molekülü içine yerleştirilir. Süreç, genellikle hücre döngüsünü S/G2 fazı sonlarında gerçekleşir (Klug ve Cummings 2003).

Aynı onarım tipini başaran homolog olmayan; nonhomolog rekombinasyonel onarım olarak adlandırılır. Onarım esnasında mekanizma DNA'nın homolog bölgelerine gereksinim duymaz (Klug ve Cummings 2003).

## **1.5. Genetik Toksikoloji Testleri**

### **1.5.1. Bakteriyal yöntemler**

Fiziksel ya da kimyasal ajanların DNA'da meydana getirdiği hasar, bakteriyal mutasyonları ölçebilen kısa zamanlı testlerle saptanmaktadır. Bakteriler gecelik kültürlerinde çok sayıda gelişirler ve nadir mutasyonel olayların saptanmasına olanak sağlarlar. Ayrıca bakteriyal genetik bilgi ve deneyimlerin artışı, çeşitli ajanlara karşı yabancı tiplerden daha hassas olan özel bakteri mutantlarının oluşturulmasına olanak sağlamıştır.

Mutajenite test sistemleri içinde, kısa zamanlı bakteriyal testler daha basit, hızlı ve ekonomik olmaları nedeniyle genel kabul görmektedir. Kısa zamanlı bakteriyal testler içinde en önemli olanları (Gatehouse ve ark. 1990):

#### **1.5.1.1 Ames (Salmonella/Mikrozom) testi**

Ames testi 1970' lerin başında Prof. Dr. Ames ve Dr. Maron tarafından geliştirilen ve daha sonra yaygın olarak uygulanmaya başlayan bir mutajenite testidir (Maron ve Ames 1983, Lee ve ark. 1994).

Salmonella/mikrozom testi, bakteriyal mutasyon testleri içinde detayları en iyi bilinen ve karakterize edilen, geçerliliği, uygulanma kolaylığı ve hassaslığı nedeniyle en fazla kabul görerek tercih edilen ve günümüzde de sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Gatehouse ve ark. 1990; Russell 1998; Friedberg ve ark. 1995).

Test organizması olarak kullanılan *Salmonella typhimurium*, histidin geninde oluşturulan farklı mutasyonlarla (*hisG*, *his C*, ya da *his D*), gelişmek için histidin gereksinimi duyan değişik tipte oksotrofik mutantlara dönüştürülmüştür. Ayrıca histidin mutantlarına ek olarak bu mutantlara bazı diğer mutasyonlar ilave edilir (Erkan 1992).

Bu testin temeli, yapay *Salmonella typhimurium'* in histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş (*his*=oksotrof) olan suşların test bileşeni ile muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyon geçirip *his*<sup>+</sup> hale geri dönüşmesine dayanır. Geri dönüşen (revertant) bakteri kolonileri sayılarak değerlendirilir. Fakat normalde de mutajenlere maruz kalmadan spontan olarak geri dönüşebilen bakteriler olmaktadır. Mutajenik etkiden bahsetmek için spontan revertant koloni sayılması gerekir (Maron ve Ames 1983; Erkan 1992).

Bir mutant suş, tek bir baz değişimi şeklinde nokta mutasyona sahip iken, kendiliğinden ya da bir mutajen uyarısıyla yabani tipe dönüştüğünde, transisyon ya da transversiyon şeklinde mutasyon geçirmiş olmaktadır. Ames yönteminde pozitif sonuç veren bir ajan için, insan ya da diğer memelilerde mutajenik veya karsinojeniktir denilemez. Bakteriyal mutasyonun pozitif olması, ajanın potansiyel zararı konusunda bir ön uyarı anlamı taşır. Ayrıca yüksek organizmalarda yapılacak daha kapsamlı çalışmaları yönlendiren önemli bir belirteçtir. Ames testi bu sebeple dünya çapında pek çok laboratuvarında rutin olarak uygulanmaktadır (Erkan 1992).

### 1.5.1.2 SOS (umu) testi

Umu test sistemi, kimyasal ajanların genotoksik etkilerini saptamak amacıyla kullanılan kolorimetrik, bakteriyel bir test sistemidir (Quillardet ve Hofnurng 1985). SOS-cevap esas alınarak geliştirilmiştir. Regülatör bir sistem olan SOS sistemi, DNA hasarı ile indüklenebilen sistemler içinde ilk olarak karakterize edilmiş olan en kapsamlı, en kompleks ve en iyi anlaşılmiş sistemdir (Oda ve ark. 1985). Umu test sistemi, diğer SOS-cevap genlerinden çok daha dolaysız bir şekilde mutagenesisle ilgili olduğu düşünülen *umu* operonunun ifade edilme düzeyini saptamaya dayanır. *Umu* operonunun ifade edilme düzeyi *umuC-lacZ*

füzyonu aracılığıyla oluşturulan  $\beta$ -galaktosidaz aktivitesinin ölçülmesiyle saptanır (Oda ve ark. 1985).  $\beta$ -Galaktosidaz aktivitesinde kontrole göre en az 2 katlık bir artışın gözlenmesi, umu test sisteminde, kimyasalın mutajenite açısından pozitif olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir (Quillardet ve Hofnung 1985).

### 1.5.1.3 *E.coli* lac I mutasyon test sistemi

Bakterilerde meydana gelen mutasyonların genetik ve moleküler analizinde kullanılan bir ileri mutasyon yöntemi olup ilk kez 1983'de Miller ve arkadaşları tarafından *E. coli* de geliştirilmiştir (Friedberg ve Hanawalt 1995).

Bu sistemde laktoz operonundaki repressörü kodlayan lac I geninde oluşan mutasyon fenotip üzerindeki yansıması belirlenerek değerlendirilmektedir. Lac I mutasyonlarını içeren gen bölgesi bakteriden alınarak bir plazmide ya da M13 fajı klonlama vektörüne aktararak, vektörler çoğaltılarak çok sayıda mutant DNA kopyası elde edilerek, dizi analizi yapılmaktadır (Güven 1999).

Bakteriyal testler, prokaryotik hücrelerdeki özgül mutasyonları belirleme özelliğine sahip olduğu için, geniş çaplı genetik hasarları ve DNA'sı kromozomlarda organize olmuş daha yüksek yapıları organizmalardaki genetik değişimleri belirlemede yetersiz olmaktadır. Ayrıca diploit ökaryotların üreme hücrelerindeki kalıtsal genetik riskleri saptamada da güvenilir sayılmazlar. Bu nedenle genellikle memeli hücrelerinin kullanıldığı *in vivo* ve *in vitro* test yöntemleri geliştirilmiştir.

### 1.5.2. Sitogenetik yöntemler

Sitogenetik çalışmalar, çevresel olarak ya da çalışma ortamında klastojenlere ve radyasyona maruz kalan belirli populasyonlar için (Barquinero ve ark. 1993) bireysel olarak etkilenme dozunu saptamak için kullanılabilir (Fender ve Wolf 1998). Bu testler *in vivo* olarak laboratuvar hayvanlarında *in vitro* olarak da insan kan lökositleri, mesane, yanak, mide, nasal ve sperm hücreleri ile çeşitli kültür hücrelerinde uygulanabilmektedir. Çoğunlukla da, farklı tipteki genetik

hasarların gösterilmesinde sıklıkla tercih edilen, kısa zamanlı lenfosit kültüründe gerçekleştirilmektedir. Bunlardan en önemlileri;

#### **1.5.2.1 Yapısal kromozom bozulma testi (Kromozom Aberasyon Testi= CA)**

Anöploidi ve poliploidi gibi sayısal kromozom bozulmaları ile kromozom tipi, kromatit tipi kopmalar ve anormal birleşme gibi yapısal bozulmalar çok yaygın olarak, bölünen hücrelerin metafazda olanlarını kolsemid ya da kolşisin gibi bir tübülün polimerizasyon inhibitörü kullanarak tutuklama ile saptanmaktadır. Bu test kısaca hücreler metafaz safhasında incelenerek kromozom hatalarının ortaya çıkarıldığı sitogenetik bir yöntemdir ( Akman 1983).

#### **1.5.2.2 Mikronukleus testi (MN)**

Mikronukleus hücre çekirdeği dışında stoplazmada yer alan çekirdek orjinli küçük küresel bir oluşumdur. Mikronukleus mitotik hücrelerdeki kromozom fragmentlerinden ya da anafazda geç kalarak her 2 kardeş çekirdeğe dahil olamayan kromozomlardan kaynaklanır. Mikronukleusun içerdiği kromozomal fragmentler; öncelikli iğ ipliği kinetokor ya da diğer mitotik aparatların fonksiyon kaybından, kromozom alt birimlerinde oluşan hasarlardan, hücresel fizyolojideki değişimlerden ve mekanik parçalanmalardan kaynaklanmaktadır. Mikronukleus içeren hücre sayısındaki artış, maruz kalınan klastojenik (DNA'yı hedefler, kromozom kırılmalarına sebep olur ) veya anöjenik (kromozom sayısının değişimine etkilidir, genellikle DNA'yı hedef almaz ) ajanların genotoksik etkilerini yansıtan bir biomarkerdir (Fenech 2000).

İnsan populasyon çalışmalarında MN sıklığı, çok yaygın olarak fitohemaglutinin (PHA) ile stimüle edilmiş periferik kan lenfositlerinde belirlenmektedir. En sık kullanılan metot ise mitojenle stimüle edildikten sonra sitoplazma bölünmesi engellenen hücrelerin sayımının yapıldığı sitokinez-engelleme mikronukleus (CBMN) tekniğidir. Mikronukleus sıklığının

belirlenmesinde her örnek için her 1000 hücredeki MN sayılarak hesaplama yapılmaktadır (Fenech 2000).

### **1.5.2.3 Kardeş kromatid değişimi (SCE) testi**

SCE testi toksik madde - DNA etkileşimini açığa çıkarmadaki duyarlılığı ve genotoksik kimyasalların kültüre edilmiş ya da muamele edilmiş hayvanlardan alınan hücre örneklerinde SCE sayısını önemli ölçüde arttırması sebebi ile bireysel olarak maruz kalınan genotoksik karsinogenlerin kan lenfositlerinde yarattığı DNA hasarını belirleyen bir indikatör olarak kullanılmaktadır (Albanesi ve ark. 1998).

Replike olan bir kromozomun iki kardeş kromatiti arasında, DNA'nın karşılıklı değişimi şeklinde oluşan mutasyonun saptanması prensibine dayanır. SCE'nin teşvik edilmesi DNA sentezinin başında maksimum iken, S fazının sonunda tamamen biter. Değişmeler homolog lokuslarda meydana gelir ve kromozom morfolojisinde bir farklılık oluşturmaz. SCE oluşumunda DNA ipliğinin kırılıp (kopup) tekrar birleştiği bilinmekle birlikte mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. DNA ile kovalent bağlanan ya da DNA metabolizmasına ve onarımına engel olan maddeler çok etkili şekilde SCE'yi teşvik etmektedirler (Albanesi ve ark. 1998).

SCE yönteminin prensibi, kardeş kromatidlerin birbirine kontrast sağlayacak şekilde boyanmasına dayanır. Kardeş kromatidlerde meydana gelen parça değişimi, boyanma farklılığından hemen anlaşılır. Bu yöntemle sadece kromozomlarda oluşan yapısal değişimler gözlemlendiğinden dolayı SCE yöntemi sınırlı amaçlar için kullanılır (Lee ve ark. 1994; Saleh 1997).

## **1.5.3. DNA hasarı ya da gen mutasyonlarını saptayan yöntemler**

### **1.5.3.1 Comet (Single Cell Gel Electrophoresis ) testi**

Comet testi hücre metafaz safhasında incelenerek kromozom hatalarının ortaya çıkarıldığı sitogenetik bir yöntemdir. Bu yöntem, DNA iplik kırılmaları ve

çapraz bağlanma gibi DNA hasarları ile DNA onarım bölgelerindeki hataları, bir mikrojel sistemi kullanarak belirleyebilmektedir (Ostling ve Johanson 1984; Singh ve ark. 1988). Uygulamada, kan lökositleri, mesane, yanak, mide, nasal ve sperm hücrelerindeki DNA hasarını belirlemek amacıyla *in vivo* ya da *in vitro* olarak kullanılmaktadır.

Son yıllarda, özellikle endüstriyel ürünlerde de kullanımı hızla artan bir test sistemidir. Hücreler erimiş agarozda süspansiyon edilerek lam yüzeyine yayılarak, yüksek konsantrasyonlu tuz çözeltisi ve deterjan ile lizis edilmektedir. Serbest kalan DNA nötral ya da alkali koşullarda elektroforeze tabi tutulur. DNA'nın elektroforez ortamında anoda doğru olan göçü taşıdığı hasar ölçüsünde farklılık gösterir. DNA'daki hasar büyük ise, zerrecikler şeklinde yaygın bir göç sergiler. DNA'nın jel üzerindeki konumu uygun bir boyama yapılarak, flouresan ya da ışık mikroskobu kullanılarak görüntülenmekte ve oluşan DNA kuyruklarının ölçülmesi ile maruz kalınan ajanın genotoksik potansiyeli hakkında fikir edinilmektedir (Albertini ve ark. 2000).

### 1.5.3.2 Mouse lymphoma testi

Fare Lymphoma hücresi ileri mutasyon testinde, Timidin kinaz (TK) aktivitesine sahip, L5178Y (TK+/+ or TK+/-) hücreler test ajanları ile muamele edilirler. Hücrelerin kendini ifade ettiği seçici kültür ortamında, sadece mutant hücreler (TK-/-) seçici ortam koşullarında hayatta kalırlar ve test bileşeninin mutajenitesi, mutantların sayısındaki artış ile ortaya çıkar. Bu test, fare lenfoma hücrelerindeki, gen mutasyonlarını saptayabilen bir *in vitro* mutasyon yöntemidir (Oberly ve ark. 1997).

### 1.5.3.3 Muta mouse / Big blue yöntemi

Test ajanına maruz bırakılan farelerden DNA izole edildikten sonra, bu DNA'lara, rekombinant bakteriyofajlar ile bakteri geni eklenir. Fare genomundaki, bakteri gen ürününün mutasyonel değişimi, mikrobiyolojik



yöntemlerle tespit edilerek, oluşan gen mutasyonları saptanabilmektedir. Bu test, son yıllarda geliştirilmiş *in vivo* bir yöntemdir (Oberly ve ark. 1997).

#### **1.5.3.4 HPRT gen mutasyon testi**

HPRT yöntemi, somatik gen mutasyonlarının *in vivo* ortamlarda pozitif olarak seçilmesi prensibine dayanır. DNA baz çifti değişimleri, büyük ya da küçük çaptaki delesyonları, inversiyonları ve heterolog kromozom rekombinasyonları gibi genetik değişimleri büyük ölçüde yansıtmaya özelliğine sahiptir (Albertini ve ark. 2000).

### **1.6. Genotoksisite Çalışmalarında Yeni Yaklaşımlar**

1980 den beri 150 den fazla farklı genotoksisite testleri bilimsel çalışmalara kaynak sağladı.

Genetik toksikolojide kullanılan metodlarda belirlenen boşluklara uygulanabileceği gözlenen çeşitli teknolojiler Tablo 1.1 listelenir. Spesifik testler teknolojiyle geliştirildi. Bu yeni metodlar yaygın test dizilerinin yerine geçme ya da ilave olarak kullanılması şeklinde değerlendirilir. Bu yeni testlerin öncelikli avantajı herhangi bir dokudan DNA nın *in vivo* olarak daha fazla test edilmesine izin vermesidir (Hayes 2001).

Method	Özellikler	İnvivo Test Gelişimi
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	isolasyona, çoğalmaya ve spesifik endojen memeli genlerinin analine izin veren spesifik gen çoğalmaları	Fare ve ratlardaki HGPRT geninde gen mutasyonu
Shuttle vektörleri	Spesifik DNA ipliklerinde evsahibi organizmanın genomik DNA'sıyla bütünleşen kurtarılabılır vektör	gen mutasyonu için Transgenik fare ve rat modelleri
DNA jel elektrophorezi	Bileşimin büyüklüğü ve temeline dayalı DNA'yı ayırmak için çeşitli jel tiplerinin kullanımı	DNA iplik kırılmaları için Comet deneyi
Flouresan İmmünokimyasal boyamayla birleşmiş İn sitü hibridizasyon	Flouresan boyanın kullanımı gen konumlarını belirlemek için spesifik nükleotid zincileriyle birleştirildi	Küçük delesyonları ve düzenlemeleri belirlemek için spesifik kromozom haritalama ve testler

**Çizelge 1.1.** Teknoloji önderliğinde yeni genetik test metotlarının gelişmesi

## 1.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Genetik özelliklerin ya da gen faaliyetlerinin moleküler seviyede çalışılabilmesi, önemli ölçüde DNA veya RNA moleküllerinin güncel metotlarla analiz edilebilecek miktarda bulunmasına bağlıdır. Örneğin, genlerin klonlanması için az sayıda molekül yeterli olmasına rağmen, analiz edilebilmeleri için uygun hücrelerde çoğaltılarak sayılarının artırılması gerekmektedir. Mevcut moleküler analiz metotları için tahminen  $10^5$ - $10^6$  DNA veya RNA molekülü (gen kopyası) gerekmektedir. Tek bir gen kopyasının analizi ise ancak in situ hibridizasyon gibi sadece bir kaç özel protokol ile mümkün olmaktadır. Dolayısıyla yakın zamana kadar temel moleküler biyolojik araştırmada amaç, mevcut metotların duyarlılığını artırmak veya daha az miktarda molekülün analizini sağlayacak yeni yöntemler geliştirmek olmuştur (Dilsiz 2004).

1985 yılında Kary B. Mullis tarafından, nükleik asit dizilerinin değişik bir yöntem olan ve mevcut yöntemlerin duyarlılığının artırılmasından çok DNA veya RNA dizilerinin sayısal olarak artırılmasına dayanan, dolayısıyla mevcut yöntemlerle analiz edilebilmelerini sağlayan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) geliştirilmiştir. Bu yöntem orak hücre anemisinin tanısının konulmasında uygulamaya konulmuş ve 1993 yılında kendilerine Nobel ödülünü kazandırmıştır. Bir fosilden veya faili meçhul sanık tespitinde bir kan lekesinden gen klonlanması veya DNA analizi için yeterli miktarda DNA bulunmaz. Az miktardaki doku hatta tek bir hücreden elde edilen DNA miktarını arttırabilmek için PCR kullanılmaktadır. Ayrıca virüs tarafından henüz yeni enfekte olmuş olan kan veya lenf içerisindeki etmen PCR ile teşhis edilebilir. PCR, genomik DNA 'da dizisi bilinen veya dizisi henüz tespit edilmemiş olarak klonlanan yabancı DNA'nın çoğaltılmasını( amplifikasyonu) ve bunun dizi analizini tespit etmeye yarayan önemli bir tekniktir. Günümüzde oldukça önem arz eden insan genom projesi bu teknik sayesinde yapılmaktadır (Dilsiz 2004).

PCR'nin önemli bir yönü özel bir DNA dizisini seçip çoğaltarak istenmeyen dizilerin ortaya çıkmasını önlemesidir. Bu özellik sadece dizinin tanınmasını kolaylaştırmakla kalmaz, ek olarak DNA'nın analiz edilmesini de sağlar (Saiki ve ark. 1985 ve Dilsiz 2004).

PCR, DNA'nın önemli ölçüde saflaştırılmasını gerektirmediği için, nükleik asitlerle çalışmada harcanan zaman ve emeği azaltmakta ve hücre-siz klonlama (cell-free molecular cloning) olarak da adlandırılmaktadır (Saiki ve ark. 1985).

Analitik bir araç olan PCR bugün mevcut en hassas araştırmayı sağlar. PCR, uzunluları 2 kb (kilobaz) 'a kadar olan DNA ve RNA dizilerinin seçilerek *in vitro* çoğaltılmasını sağlar ( Saiki ve ark. 1988).

PCR'ın temeli; DNA denatürasyonu, primerlerin birleşmesi ve DNA polimerizasyonu ilkelerine dayanır. Çoğaltılması istenen DNA bölgesinin her iki ucunda belli sayıda diziyi tanıyan ve DNA'nın her iki zincirini de tamamlayıcı olan bir başlatıcı oligonükleotid (primer) çifti zıt ve birbirleriyle çakışan yönlere ilerleyen DNA sentezinin çok sayıda döngüde gerçekleştirilmesinde kullanılır. Her döngüde çift sarmallı DNA, iki yeni çift sarmallı molekülün yapılmasını sağlar. Bu da teorik olarak her döngüde DNA dizilerinin sayısal olarak ikiye katlanmasına yol açar (Kumar 1989). Böylece bir sonraki PCR devri için kalıp sayısı da iki katına çıkmış olur. İlk devir sabit bir 5' ucu ve değişken bir 3' ucu olan bir DNA sentezlenmesi ile sonuçlanır. Daha sonra sentezlenen DNA'nın her iki ucu da sabitlenir. Çünkü bu uçlar ya primer sekanslarından elde edilir ya da primerler tarafından belirlenir. PCR ile orijinal kalıbın her iki molekülünden  $2^n$  sayıda yeni DNA kopyası üretilir( Böylece DNA kopyalarının sayısı her döngüde eksponensiyel olarak artar). 30 döngü sonunda tek bir DNA molekülünün yaklaşık  $2 \cdot 10^9$  kez amplifikasyonu sağlanır. Her DNA molekülü, 20 devirde yaklaşık olarak bir milyon DNA molekülü oluşturabilmektedir. Verim oranı ise deney başına her devirde yaklaşık %85'dir. Bu durum 20 devirde genel verimin  $10^6$  'dan yaklaşık  $2,2 \times 10^5$  (1,8520)'e düşmesine neden olmaktadır. Enzimin tanınması gereken DNA molekülündeki artış ve tekrar tekrar ısınma sonucu enzim aktivitesindeki azalma nedeniyle devir sayısı arttıkça verimde azalmaktadır (Saiki ve ark. 1985; Beceril ve ark. 2001).

PCR yönteminin uygulanması için tam ve doğru bir baz dizisi bilgisine ihtiyaç duyulmaktadır. Yöntem çok duyarlı olduğu için çok küçük miktardaki kontaminasyon bile yanlış sonuçlara neden olur. PCR çalışmalarında diğer bir dezavantaj ise her primer çiftinin kendine özgü birleşme ve uzama koşullarına sahip olmasıdır. Bu koşullar; ısı, devir uzunluğu, primer yoğunluğu, Mg

konsantrasyonu, enzim ve DNA miktarıdır. Uygun primer seçimi PCR'ın başarısını etkileyen en önemli faktördür. Genellikle 15-30 baz uzunluğunda sentetik oligonükleotidler kullanılır. İdeal bir primerde G-C oranı % 50 olmalı, amplifiye edilecek kalıba özellikle 3' ucuna uymalıdır. İki primer hemen hemen aynı erime özelliklerine sahip olmalı ve birbirinin tamamlayıcısı olmalıdır. Ayrıca hedefteki tek olan dizilere hibridize olmamalıdır (Kumar 1989; Mullis ve ark. 1987).

PCR çalışmalarında önceden insan genomik DNA'sındaki spesifik bölgeleri amplifiye etmek için *Echerichia coli*'nin DNA polimerazın Klenow fragmenti kullanılmıştır. Ancak zincirlerin birbirinden ayrılması için gerekli yüksek sıcaklıkta bu enzim aktivitesi kaybettiği için, her döngünün denatürasyon aşamasından sonra enzim eklenmesi gerekmektedir. Zor olan bu aşama, *Thermus aquaticus* adı verilen ve sıcak sularda yaşayan bakterilerden izole edilen sıcaklığa dayanıklı Taq DNA Polimerazın keşfi ile ortadan kalkmıştır. Taq DNA polimeraz 832 amino asite sahip bir proteindir. Taq DNA Polimerazın kullanılmaya başlanmasıyla, gerekli olan maddeler tek bir tüp içerisine konularak, reaksiyon termal cyclus adı verilen cihazda kolayca gerçekleştirilir. Klenow fragmenti ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin uzunlukları 400bp iken, Taq DNA polimeraz ile sentezlenen ürünlerin uzunluğu yaklaşık 10 kb dir (Erlich ve ark. 1991). Bu arada Taq DNA polimeraz enziminin aktivitesi için ortamda serbest magnezyum iyonlarına ihtiyaç vardır (Dilsiz 2004).

PCR ile saç teli, sperm ve değişik dokulardan elde edilen az sayıdaki hücreden DNA amplifikasyonu yapılabilmektedir. Ayrıca parafinlenmiş dokular ve kan içinde bu yöntem uygulanmaktadır (Mullis ve ark. 1987).

Parafinle fiske edilmiş dokuların DNA kaynağı olarak kullanıldığı metotların gelişmesiyle kliniksel çalışmalarda PCR uygulanması artmıştır (Kumar 1989).

Zarar görmüş, kırılmış DNA kalıbının kullanımı bazen kaçınılmazdır. Böyle DNA'lar arkeolojide ve adli tıpta kullanılmaktadır. Saiki ve ark. 1985 yılında Brezilyada bulunan iskelet kalıntılarının Hitler dönemi Almanya'da Yahudilerin tutulduğu Auschwitz Kampının "Ölüm Meleği " olarak bilinen Dr. Josef Mengele' ye ait olup olmadığı DNA parmak izi analizi ile tespit edilmeye

çalışılmıştır. Bu amaçla eser miktarda ve parçalanmış haldeki DNA femurdan izole edilmiştir. Mengele'nin oğlu ve karısının da DNA 'ları elde edilmiş ve bu DNA'ların 10 farklı bölgesinde yapılan karşılaştırma sonucu analiz edilen kemiğin Mengele' ye ait olduğu anlaşılmıştır (Dilsiz 2004).

PCR yöntemi, nükleotid sırası bilinen dizi bölgelerinin dışında kalan bölgelerin çoğaltılmasında da kullanılmaktadır. Ters dönmüş PCR olarak adlandırılan bu yöntem; çoğaltılacak olan diziler *in vitro* yuvarlatma ile ters çevrilip, ayrı bir bölgede yeniden açılır. Böylelikle nükleotid sırası bilinmeyen bir dizi, sırası bilinen iki dizi arasında kalmış olur. Nükleotid sırası bilinen diziler primer bağlanması için kullanılarak nükleotid sırası bilinmeyen dizilerin çoğaltılmasını sağlamaktadır (Triglia ve ark. 1988).

Amplifikasyon protokolünün küçük modifikasyonlarıyla PCR, dizi analizi için kalıp görevi görecekteki iplik ürünlerinin oluşturulması için de kullanılabilir. Ayrıca, PCR genetik haritaların oluşturulmasında da kullanılır (Erich ve ark. 1991).

DNA daki nükleotid dizileri, türlerin olduğu kadar, organizmaların veya virüs flogenisinin evrimsel geçmişinin belirlenmesi yönünden birçok önemli bilgi içerir. Farklı bireylerden alınan genlerin nükleotid dizilerine dayalı olarak filogenetik ağaçların oluşturulması için çeşitli bilgisayar programları geliştirilmiştir. PCR yöntemi kullanılmadan önce bu kadar önemli bilgiler gün ışığına çıkamıyordu (Erich ve ark. 1991).

Her birey genetik olarak eşsizdir. Çoğu DNA bireyler arasında çok az değişir. Fakat var olan varyasyonların bazıları genetik hastalıkla sonuçlanabilir. Ancak, kromozomların 'silent' kısımları bireyde hiçbir etkiye sahip olmayan çok çeşitli bölgeleri içerir. Kromozoma yayılmış bu bölgeler 'minisatellitler' olarak adlandırılır. Bu minisatellitler belirlenme prosedürleri DNA parmakiziyle her bireyin belirlenmesine izin verir. DNA probu kullanılarak birey, populasyon, ya da tür DNA parmak izleri oluşturulabilir (Savva 1998).

DNA parmak izleri çeşitli metodlar kullanılarak açığa çıkarılabilir. DNA ya bağlı DNA parmak izlerinin oluşumu için kullanılan metodların bazıları: microsatellite probu ya da tek lokus probuyla DNA hibridizasyonu. Böyle metodlar örnekten DNA izolasyonunu ve DNA yarıklarıyla restriksiyon

enzimleriyle jel elektrophorezi ile oluşan milyonlarca farklı fragmentleri oluşturmayı içerir. Her bir DNA fragmentindeki duble helixin iki ipliğın ayrılması takip eder. Southern Blotting kullanılır. Bu yöntemin fazla miktarda saf DNA ya ihtiyacı olmasından ve doğru DNA probunun seçilmesi için DNA iplik bilgisinin bazı miktarlarına ihtiyaç duyulmasından dolayı dezavantaja sahiptir. Bu problemlerin çoğundan PCR a dayalı parmak izi metotlarının kullanılmasıyla kaçılabilir (Savva 1998).

Kalıtsal hastalıkların birçoğunun teşhisi restriksiyon parça uzunluğu polimorfizmine bağlıdır. Değişken bir kesilme noktasının varlığı veya yokluğu ailede mutasyonun hangi bireylerde olduğunu göstermektedir. Bu yöntemin güvenilirliği ilgilenilen gen ile tanıtıcı bölge arasındaki uzaklığa bağlıdır. Bu iki bölge birbirine ne kadar yakın ise, mutasyon taşıyan kişilerin tayini o kadar doğru olmaktadır. Mutasyonların bu şekilde iki bölge arasındaki bağıllık analizi ile teşhis edilmesi yeterli miktarda (yaklaşık 1-10 µg) genomik DNA'nın bulunmasına; restriksiyon enzimleri ile DNA'nın kesilmesi, jel elektforezi, Southern blot ve restriksiyon parça uzunluğu poliformizmi haplotiplerinin radyoaktif DNA probları ile tanınmasına bağlıdır. Bu zaman alıcı ve pahalı protokole karşı PCR, daha az miktarda DNA kullanılarak polimorfik bölgelerin çoğaltılmasını sağlamaktadır. Polimorfik veya diagnostik bölge doğrudan çoğaltılmış DNA'nın restriksiyon enzimi ile kesilmesi ve elektroforetik analizi ile gözlenmektedir. Heterozigot durumlarda alellerin her ikisi de görülmektedir. Bilinmesi gereken polimorfik bölgenin etrafındaki DNA dizisidir. Bu diziyi elde etmek için kosmid klonlama ve dizi analizi gerekmektedir. Her ne kadar bugüne kadar dizi analizi yapılan polimorfik bölgelerin sayısı az ise de, yakın gelecekte bu sayının artacağı tahmin edilmektedir. Bu metodun ilk başarılı uygulaması faktör VIII genindeki polimorfik restriksiyon bölgelerin çoğaltılması ile hemofili A tanısında olmuştur. Sistik fibrosizin doğum öncesi tanısında da bu yöntem kullanılmaktadır. PCR ayrıca Y kromozomuna ait bölgelerin çoğaltılması ile doğum öncesi cinsiyet tayininde de kullanılmaktadır ( Saiki ve ark. 1988).

Patojen organizmaların DNA'larının teşhisi de PCR'nin başarıyla uygulandığı diğer bir alandır. Serviks kanserleri ile ilişkisi olduğu gözlenen insan papiloma virüs (HPV)'ünün hücredeki varlığı PCR ile gösterilmektedir. Ayrıca, T

hücresi lenfoma virüsü tip I (HTLV-I) ve insan bağışıklık eksikliği virüsü (HIV) gibi bazı insan retrovirüsleri de bu yöntemle çoğaltılıp tanınabilmektedir ( Saiki ve ark. 1988).

PCR'nin önemli uygulama alanlarından birisi de hastalıklara duyarlılığı sağlayan genetik polimorfizmlerin incelenmesidir. Otoimmün bozukluklar, yüksek tansiyon, koroner kalp hastalıkları gibi karmaşık çok gene bağlı hastalıkların mekanizmalarının anlaşılması ve bu hastalıkların henüz klinik öncesi safhada iken tanınmaları, belirli DNA ve protein işaretlerin (marker) bulunmasına bağlıdır. PCR'nin önemi, bilinen veya hastalığın ortaya çıkmasında rolü olduğu düşünülen haplotip dizilerinin çoğaltılarak kolay incelenmesini sağlamasındadır. Bu diziler hastalığa yakalanma riskini göstermede veya hastalığın mekanizmasının anlaşılmasında önemli olabilir. Kolesterol metabolizması ile ilgili olarak proteinlerin gen yapısının erken arteriosikleroz ve koroner kalp hastalıklarına yakalanmada farklı risk faktörlerini tayin ettiği gösterilmiştir ( Saiki ve ark. 1988).

PCR'nin diğer bir uygulaması da populasyon genetiği ve epidemiyoloji alanındadır. Kişiler arasında alkol, ilaç vs. gibi çevre faktörlerine karşı duyarlılık farkları, eğer bu duyarlılığa neden olan genler biliniyorsa, DNA çoğaltılması ile hızla analiz edilebilecektir. Bu alanda ilk uygulama farklı sınıf I alkol dehidrogenaz (ADH) alellerinin tanınması ve populasyonda ADH izoenziminin dağılımının incelenmesi olmuştur ( Saiki ve ark. 1988).

Kanser araştırmalarında PCR, onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerdeki spesifik somatik mutasyonların ve kromozom anormalliklerinin belirlenmesinde de rol oynamaktadır. Çeşitli kanser türlerindeki *ras* onkogenlerindeki bilinen mutasyonların belirlenmesi PCR ile gerçekleştirilmiştir. Philadelphia kromozomu olarak alandırılan spesifik bir genetik anormallik olan kronik miyeloid lösemi(CML), belirlenen ilk kanser türüdür. Bu kromozomal translokasyonda *abl* ve *bar* genleri birleşirler ve oluşan füzyon transkripti PCR ile belirlenebilmektedir ( Saiki ve ark. 1988).

Adli tıpta, zan altında bulunan kişinin doğrulanmasında; suç yerindeki bir kıl, birkaç deri hücresi veya bir damla kandan PCR ile amplifiye edilen özgül DNA segmentindeki baz sıralaması, zan altındaki kişinin DNA'sındaki baz



dizilimi ile karşılaştırılmaktadır. Babalık tayininde ise; çocuktaki babadan gelen insan lökosit antijen (Human Leucocyte Antigen= HLA ) gen dizilimi ile babaninki karşılaştırılarak çocuğun babaya ait olup olmadığı söylenebilmektedir ( Dilsiz 2004).

### 1.7.1. PCR aşamaları

PCR 3 aşamada gerçekleşmektedir.

1. DNA ipliklerinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denatürasyon)
2. Primerlerin birleşmesi (annealing)
3. Primerlerin uzaması (extension)

DNA ipliklerinin birbirinden ayrılması (denatürasyon) aşamasında, sıcaklık ile çoğaltılmak istenen DNA çift iplikten tek ipliğe dönüşür. Genellikle kullanılan denatürasyon ısısı 94°C dir (Palumbi 1996). Böyle yüksek ısılarda sarmalları bir arada tutan hidrojen bağlarının ayrılması için DNA denatüre edilir ( Saiki ve ark. 1988).

Primerlerin birleşmesi (annealing) aşamasında DNA için sesifik olan ve primer adı verilen oligonükleotid, ilk evrede elde edilen DNA tek sarmalı üzerinde kendisine tamamlayıcı olan nükleotid dizisi ile birleşir. Primerler hedef DNA'nın amplifikasyonunu başlatmak için kullanılır. Bu sebeple primer (öncü) olarak adlandırılır. Primerin bağlanması sırasında ısı 40-60°C ye düşürülür. Primerlerin bağlanması için gereken ısı ve süre amplifikasyon primerlerinin konsantrasyon ve uzunluklarına bağlıdır ( Saiki ve ark. 1988).

Primerlerin uzaması (extension) aşamasında tamamlayıcı diziyile birleşen primer hibritleştiği te sarmalın karşılığını sentezler. Bu sentez için termostabil özelliği olan *Thermus aquatis* adlı bakteriden elde edilen *Taq* polimeraz enzimi kullanılır. Primerlerin uzaması aşamasında 2 kb uzunluğundaki bir amplifikasyon ürünü için yeterli kabul edilir ( Saiki ve ark. 1988).

PCR tekniğinde bu üç temel aşama bir döngüyü oluşturur ve bu döngü 25-35 kez tekrarlanır. Bu döngünün her tekrarlanışında iki primer arasında kalan özgün DNA parçasının her iki zincirinin birer kopyası çıkarılmış olur. Bu döngüler

sonunda elde edilen PCR ürünlerinin tanımlanmasında agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılır. Elde edilen ürünler agaroz jel kullanılarak elektroforezle ayrıştırılır ve DNA zincirleri ethidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışık kaynağında floresans vererek görünür hale getirilir. 100 baz çiftinden daha küçük moleküllerin ayırımında agaroz jel elektroforezi yetersiz kaldığı için, bunların ayırımında poliakrilamid jel elektroforezi yapılması gerekmektedir. Agaroz jel elektroforezinde, jel hazırlığındaki agaroz derişimi DNA moleküllerinin yürümesini etkileyen en önemli bir faktördür. (Tablo 1.2) (Maniatis 1989).

Jeldeki agaroz miktarı (g/100ml)	Etkili ayırma yapılabilecek DNA molekül Büyüküğü (bp)
0.3	5000-60000
0.6	1000-20000
0.7	800-10000
0.9	500-7000
1.2	400-6000
1.5	200-3000
2.0	100-2000

**Çizelge 1. 2.** Agaroz jel elektroforezinde jeldeki agaroz derişimi ve bu derişimlerde etkili ayırma yapılabilecek DNA molekül büyüklükleri

## 1.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonuna Dayalı Markerler

Özellikle PCR temelli moleküler markerler kompleks genomda DNA analizi için yararlıdır (Beceril ve ark. 2001). DNA parmak izi çalışmalarında kullanılmak üzere çok sayıda moleküler marker geliştirilmiştir. Bu markerlerden başlıcaları DAF, STS, SSR, AFLP, RAPD dir.

DAF, genomun ayrılmış parçalarının çoğaltımına başlamak için, çok kısa rasgele seçilmiş oligonükleotidler (yaklaşık 5 nükleotid uzunluğunda) kullanılır ve karakteristik parmak izi oluşturur. RAPD ye göre düşük primer konsantrasyonu, minimum primer uzunluğu ve yüksek bağlanma derecelerinde reaksiyonu gerçekleştirir (Probhu ve ark. 1996).

DAF, birbiri ile çok yakın olan organizmaların parmak izi, adli tıp, taksonomik ve filogenetik çalışmalarda kullanılabilir. Ancak bu teknikle çoğalam için dizinin bilgisine ihtiyaç duyulmaktadır (Caetano ve ark.1994).

STS (Dizi Etkili Bölgeler) markerleri, uygulamada radyoaktif probamaya gerek duymaz. STS markerleri moleküler haritalamada herhangi bir genin yerini hızlı bir şekilde belirleyebilir (Mclean 1994).

SRS=VNRT (Basit Dizi Tekrarları) markerleri, yüksek miktarda polimorfik olmaları, kodominant olmaları, PCR yoluyla hızlı çoğaltmaya olanak sağlamaları ve bilinen primer dizileri sayesinde öteki marker uygulamalarından daha kullanışlıdır ( Sanghai ve ark. 1994).

AFLP (Amplifiye Fragment Uzunluk Polimorfizmi), genomik DNA' nın restriksiyon enzimleriyle kesimi sonucu oluşan parçaların bir kısmının selektif amplifikasyonu esasına dayanır (Tautz 1994).

### 1.8.1. Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD-PCR)

PCR teknolojisinin keşfinden sonra DNA polimorfizmini meydana çıkarmak için geliştirilen moleküler markerlerden biri olan Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) markerleri Williams ve arkadaşları (1990) tarafından belirtilmiştir (Waugh ve Powel 1992).

RAPD yönteminde, izole edilen DNA'nın çok küçük miktarı (~25ng) PCR yöntemiyle çoğaltılır. Sıcaklık 95°C yükseltilerek DNA denatüre edilir. DNA çoğaltımında genomik DNA'nın belirli bölgelerine homolog olan primer dizileri (tek iplikli diziler) DNA sentezini başlatmada rol oynar. Yüksek sıcaklıkta aktif olan Taq polimeraz enzimi ile iki primer arasında kalan DNA bölgesi çoğaltılır. Elde edilen ürünler ethidyum bromid ile boyanmış jelde yürütülerek DNA fragmentleri UV altında incelenir (Maniatis 1989).

RAPD tekniği tek, rasgele, 10 bazlık DNA oligonükleotid primerini PCR yoluyla genom bölgesini amplifiye etmek için kullanılır. Primerin bağlanma bölgesinin genom üzerinde rasgele dağılmış olduğu düşünülür ve bu bölgedeki polimorfizm amplifikasyon ürünlerinin farklı olmasıyla sonuçlanır ve bir tür parmak izi oluşur. Bu da tür içi ve türler arası benzerlik ölçümünün hesaplanmasında RAPD verilerinin kullanılmasına olanak sağlar. Bu tekniğin metodolojisi basittir. Etkili, kolay, hızlı, duyarlı olması ve özellikle genom belirsizlikleri gibi problemlere uygun olması sebebiyle çok farklı alanlarda uygulanmaktadır (Becerril ve ark. 2001). Genetik çeşitlilik, türler arasındaki ilişkiler, popülasyon yapısı, soyağacı, genetik haritalama, pesti sitlere karşı dirençli geneler ve cinsiyet markerleri gibi pek çok farklı konunun araştırılmasında yaygın olarak kullanılabilir (Harris 1999; Atienzar ve Jha 2006).

RAPD markerleri biyo-çeşitlilikle ilgili çoğu çalışmada kullanılmıştır. Çok sayıda farklı kombinasyonlarda RAPD marker oluşturabilme olasılığı ve bu markerler kullanılarak yapılan PCR tekniğinin basitliği bu tip çalışmaların teşvik sebebidir (Harris 1999).

RAPD ve ilgili metodlar malignant hücrelerde genomik değişkenliği belirlemenin yararlı olduğunu kanıtladı. Genomik değişkenlik nokta mutasyonları, kromozomların yeniden düzenlenmesi, delesyon ve insersiyon gibi moleküler olayları içerir (Atienzar ve Jha 2006).

RAPD mutasyonlar kadar DNA hasarını (DNA adduct, DNA kırılma) geniş oranda belirlenme potansiyeline sahiptir. Kanser çalışmalarında RAPD ve ilgili metodlar değişmiş bilginin öncelikli bilgisine ihtiyaç duymadan eş zamanlı belirlemeye ve genomik değişikliklerin klonlanmasına izin verir (Atienzar ve Jha. 2006).

RAPD profilinde oluşan ilgili bantların analizleri sadece genomik değişikliklerle ilgili olan moleküler olayların bazılarını belirlemekle kalmaz aynı zamanda genlerin özellikle malignansinin başlama ve gelişmesinde oynadığı anahtar rolü keşfeder. Yani, çevresel kirleticilerin potansiyel genetik etkilerini açıklamak için, gösterim metodu olarak RAPD deneyinin kullanımı ve DNA adduct, gen mutasyonu ya da sitogenetik etkilerin ölçülmesi gibi çok daha spesifik metodları uygulamak güçlü bir strateji olabilir. Bütün gen seviyesindeki etkileri yansıtan bu deneyler (RAPD ve ilgili teknolojiler) ortaya çıkan tekniklerin( bireysel genlerin ifadelerini ölçmek amacıyla yapılan mikroarray) kullanımında tamamlayıcısı olarak devam edecektir (Atienzar ve Jha. 2006).

Wolf ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; bant yoğunluğu, bant artış-azalış ve bant sayısını temel alan RAPD parmak izinin 3 temel tipi ele alınır. Ekotoksikolojik makale örnekleri sıkı standart şartlar altında, RAPD tekniğinden toksikolojinin popülasyona genetik etkilerinin başlangıç değerlendirmeleri için yararlanılabildiğini göstermiştir (Wolf 2004).

Primer tanıma bölgesinin varlık/yokluk durumu, primerin tamamlanması/tamamlanmaması ya da primer bölgeleri arasındaki uzaklığa bağlı olarak DNA profillerinin sonuçları bireyler arasında farklılaşabilir. Bu nedenle nokta mutasyonları, inversiyon, delesyon, ilave ya da şekilsiz kromozomal düzenlemelerin primer tanıma bölgesinin varlık/yoklukluğunu etkilemesi durumunda RAPD bantları kaybolur ya da kazanılır (Wolf 2004).

*Invitro* hücre sistemleri kullanılarak genotoksik etkilerin belirlenmesi risk değerlendirme prosedürlerinde son derece yararlı olabilir. Bu amaçla Beceril ve arkadaşları (2001) yaptığı bir çalışma da, RTG-2 hücre sıraları ile çeşitli balık çiftliklerinden alınan gökkuşağı alabalık (*Oncorhynchus mykiss*) bireyleri arasındaki genetik benzerlik RAPD tekniği ile çalışılmıştır. Her iki sistemin şaşırtıcı benzerliği genotoksik ajanların *in vitro* genetik değişiklikleri belirleyen RAPD tekniği sayesinde kanıtlanmıştır ( Beceril 2001).

Theodorakis ve arkadaşlarının(1998) yaptığı çalışmada genotoksikantlara maruz bırakılmış sivrisinek balıklarındaki genotip ve DNA iplik kırıkları arasındaki ilişki RAPD tekniği kullanılarak belirlenmiştir. (Theodorakis 1998).

### 1.8.1.1 RAPD markerlarının avantajları

RAPD ve ilgili metodlar hibridizasyon temelli geleneksel metodlara oranla sayısız avantaj sunar. Araştırılacak genomun öncelik bilgisine ihtiyaç duymaz. Bu deney çok az materyal kaynağına ihtiyaç duyar. Tek rasgele oligonükleotid primerleri kullanılır. Yüksek oranda duyarlılığa sahiptir, ucuzdur, genotoksik etkilerin belirlenmesi için sayısız avantaj sunar (Atienzar ve Jha 2006).

RAPD mutasyonlar kadar DNA hasarını (DNA adduct, DNA kırılma) geniş oranda belirlenme potansiyeline sahiptir. Kanseri çalışmalarında RAPD ve ilgili metodlar değişen bilginin öncelikli bilgisine ihtiyaç duymadan eş zamanlı belirlemeye ve genomik değişikliklerin klonlanmasına izin verir (Atienzar ve Jha 2006).

Radyoaktif olmayan ve basit bir deneysel kurulumu gerektiren bir tekniktir. RAPD 'de kullanılacak uygun kısa primerler ticari olarak elde edilir. Bir termal döngü cihazı, agaroz jel düzeneğinden başka özel bir ekipman gerektirmez (Rafalski ve Tingey 1993).

### 1.8.1.2 RAPD markerlarının sınırları

RAPD markerlarının en büyük dezavantajlarından biri; bu markerlarla yapılan PCR 'in ortam şartlarındaki ufak değişikliklerden çok kolay etkilenmesidir. MgCl<sub>2</sub>, DNA gibi reaksiyon bileşenlerine ve döngü sıcaklıklarına hassas olmasıdır. Bu hassaslık RAPD profillerinde bir probleme neden olabilir (Williams ve ark. 1993; Wolf ve ark. 2004).

Elde edilen ürün profilinin karşılaştırılan gruptaki genetik farklılıktan mı yoksa ortam şartlarından mı kaynaklandığından emin olmak zordur. Bu sebeple her marker için yapılan PCR 'in birkaç kez tekrarlanması ve hepsinden aynı sonucu elde ettikten sonra veri değerlendirmesi uygundur (Williams ve ark. 1993).

İkinci bir sınırlama RAPD bantlarının dominant/resesif karakterlerinden ortaya çıkar. Sonuç olarak heterozigotlar dominant allellerin homozigotlarından ayrılamazlar (Wolf ve ark. 2004).

Üçüncü olarak, oluşan genomik çeşitliğin çeşidi bilinmez. Dördüncü olarak, RAPD beklendiği kadar rasgele genom gözlenmeyebilir. Çoğu RAPD primeri düşük sıcaklıkta başarılı bir annealing için yüksek GC içeriğine sahip olduğu göz önüne alınırsa, onlar genom karşısına dağıtılamayan GC-zengin bölgelerini göstermeye eğilimli olabilir. Sonuç olarak çoğalmanın rasgele olması nedeniyle, çekirdek ve organel DNA' sını PCR süresince çoğalabilir. Örneğin, Aagaard ve arkadaşları *Douglas fir* (*Pseudotsuga menziesii*) ın RAPD parmak izleri bantlarının yaklaşık %19 unun organel DNA sını içerebileceğini gösterdi. Çekirdek DNA' sından oluşan RAPD bantlarının aksine, çoğaltılmış organel fragmentleri Mendel markerları olarak kabul edilemez. Çünkü onlar haploittir ve klonal olarak kalıtsaldır. Bu yüzden organel DNA çoğalımı RAPD parmak izlerinin yorumunu güçleştirebilir (Wolf ve ark. 2004).

Bütün bu problemlerin her bir PCR da blankların kullanımı, rekabetçi PCR, southern blot, çoğaltılmış ürünlerin zincir analizi gibi tekniksel yollarla ya da elektroporetik ayırımın gelişmesiyle ve bant boyama prosedürleriyle üstesinden gelenebilir (Wolf ve ark. 2004).

Çoğu uygulamalarda büyük kullanışlılığa sahip olmasına rağmen, RAPD nin ayırıcı özelliğini azaltan problemlerden biri de kalıp DNA' yı içermeyen negatif kontrol reaksiyonlarda taklit (sahte) amplifikasyon ürünlerinin ortaya çıkmasını içerir. Çoğalma problemlerini araştıran çoğu çalışma, sonuçların artefact, kontaminasyon ya da genomda mutasyon sebebiyle olduğunu önermiştir. RAPD profilleri çoğalamadığı zaman, araştırmacılar varyasyonun böyle bir olayın oluştuğunu gösteren hiçbir delil olmamasına rağmen artefact sebebiyle oluştuğunu talep etmişlerdir (Atienzar ve Jha 2006).

RAPD profillerinde oluşan değişikliklerin tam belirlenmesi çözülememiştir. Gerçektende, DNA lezyonlarının ve mutasyonlarının farklı tipleri RAPD profillerinde (örneğin, bant yoğunluğundaki değişim, bant varlığı ve yokluğu) aynı tip değişimlere neden olabilir (Atienzar ve Jha 2006).

### 1.8.1.3 RAPD Optimizasyonu

**a)Profillerin çoğalabilmesi;** bazı çalışmalarda RAPD deneyinin çoğalabilme azlığı bazı araştırmacıların bu deneyin güvenli olmadığını önermelerine yol açmıştır. Ancak, böyle bir sonuca varılmadan önce çeşitli parametrelerle doğruluğu kanıtlanmalıdır. Örneğin, örneğin ekstrakte edilen DNA' nın kalitesi temel rol oynar. Zayıf kalitede genomik DNA çoğaltılmayan örnekler neden olacaktır. Aynı şekilde DNA konsantrasyonunun değerlendirilmesi önemlidir. Çünkü DNA'nın farklı miktarlarıyla yapılan RAPD deneyi farklı profillere (örneğin, üretilen bantların çoğunluğu ve bant yoğunluğundaki farklılıklar) neden olacaktır. DNA konsantrasyonunun çok azı ( $O.D < 0.1$ ) DNA konsantrasyonunun olduğundan fazla değerlendirilmesine ve 260/280 nm oranının düşük olarak değerlendirilmesine sebep olabilir. Magnezyum, dNTPs, *Taq* enzimi vb.gibi diğer parametrelerde önemli rol oynar.

RAPD prosedürünün çoğu şartlarının iyi oluşturulması sonuçları etkileyebilir. Örneğin, farklı termostabil DNA polimeraz ya da termal döngüler çeşitli RAPD profilleri oluşturabilir (Atienzar ve Jha 2006).

**b)Profillerdeki annealing sıcaklığının etkisi;** çoğu uygulamalarda kullanılmasına rağmen, RAPD metodunun rasgele doğası rahat şartları nedeniyle eleştirilir. Nispeten düşük annealing sıcaklıkları (34-36°C) RAPD deneyinde primer bağlanma olayının maksimum sayıda gerçekleşmesini garantilemek için ve analitik amaçla çoğaltılmış DNA fragmentlerinin fazla sayıda son jenerasyonlarını elde etmek için kullanılır. Ancak DNA hibridizasyonuna eşlik eden sıkı şartların azlığı sahte çoğalma formlarına neden olabilir. Bu bağlamda, annealing sıcaklığının ardışık olarak artırılması ve /veya DMSO kullanılması RAPD şartlarının güvenliğini artırmada önemlidir.

Yüksek annealing sıcaklığında (48-52°C) , spesifik olmayan reaksiyonlar azaltılır. Eğer polimorfizmi belirleme duyarlılığı tehlikeye girmeyecekse yüksek annealing sıcaklığı tercih edilebilir (Atienzar ve Jha 2006).



**c)Profillere her bir PCR kimyasalının etkisi;** DNA 'nın saflık etkisi PCR reaksiyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesinde etkilidir.

DNA kalıp konsantrasyonu genomik profillerin yeniden çoğaltılmasında önemlidir (Atienzar ve ark. 2006).

Primer konsantrasyonu 0.1 ve 0.5 $\mu$ M arasında optimaldir. Yüksek primer konsantrasyonlarında istenen ürünler elde edilemez. Primerler kendi aralarında birleşerek primer-dimer yapılarını meydana getirebilirler (Innis ve Gelfand 1990).

Enzim konsantrasyonu; *Taq* DNA polimeraz için tavsiye edilen konsantrasyon diğer bileşiklerin optimum olması durumunda 100 $\mu$ l reaksiyonda 1-2.5 ünite arasındadır (Innis ve Gelfand 1990).

Deoksinükleotid Trifosfatlar; stok dNTP konsantrasyonları pH 7.0 olmalıdır. 5-10 mM dNTP içeren stok çalışmalar önerilir. Düşük dNTP konsantrasyonu hedef olmayan yerlerde yanlış primer seçimini minimuma indirir ve yanlış birleşim nükleotidlerin çoğaltma ihtimalini azaltır. Hedef dizinin konsantrasyonu ve uzunluğu için uygun olan düşük dNTP konsantrasyonuna karar verilir (Innis ve Gelfand 1990).

Magnezyum konsantrasyonu; primerlerin birleşmesinde, PCR ürünleri ve kalıp DNA ipliklerinin ayrılma sıcaklığında yabancı primer-dimer oluşumuna, enzim aktivitesine ve doğruluğuna etki eder. Mg<sup>2</sup> miktarı toplam dNTP konsantrasyonunun 0.5-2.5 mM üzerinde olmalıdır (Innis ve Gelfand 1990).

## 1.9. Çalışmada Kullanılan Maddeler

Çalışmamızda Benzo [a] piren (B[ $\square$ ]P), mitomisin-C (MMC) ve etil methansulfonat (EMS) maddeleri kullanılmıştır.

### 1.9.1. Benzo [a] piren

Bazı çevresel kimyasal kirleticiler mutajenik ve karsinojeniktir. Bunların önemli bir gurubu poli aromatik hidrokarbonlardır. Bir organizma tarafından maruz kalınan ya da alınan poli aromatik hidrokarbonlar DNA' ya yapışan bazı elektrofilik metabolitlere enzimatik olarak dönüştürülürler. Bunlar DNA'nın

yapısında değişikliğe neden olurlar. Örneğin, monooksijenaz ve epoksid hidrolaz enzimlerin kombine hareketi sayesinde, benzo[ a] piren benzo[a] piren-7,8-diol-9,10-epokside ye dönüştürülür. Oluşan bu ürün DNA'nın ya guanin ya da alkali-labile apürinik bölgelerine stabil kovalent adductlar oluşturan yüksek reaktif elektrofildir. Yüksek dozlarda hatta alçak dozlarda bile maruziyet devam ederse organizma benzo [a] piren'nin bu reaktif metabolitlerini inaktif ya da vücut dışına atmada ya da DNA hasarını tamir etmede başarısız olur. Bu durum özellikle dokularda iyileşmenin yavaşlamasına ya da yetersiz kapasitesinin oluşmasına neden olabilir. (Savva 1998).

Çeşitli endüstriyel ürünlerde ve kömür katranında bulunan benzo [a] piren günümüzde çok etkili karsinojenik bileşiklerden biri olarak bilinmektedir ve çevresel olarak sigara dumanı ve otomobil eksoz gazı gibi benzo [a] piren kaynağı olan bileşiklerde çok yaygın olarak bulunmaktadır. Benzo [a] piren metabolize edilmemiş doğal yapısıyla reaktif olmayan nonpolar bir bileşik olup, bu yapısı nedeniyle DNA çift ipliğindeki bazlar arasına hidrojen bağları kurarak girmektedir. Bu durum DNA hasarına giden yolda bir başlangıç oluşturur. Vücutta P450 enzim sisteminin bileşiklerinden arilhidrokarbon hidroksilaz enzimi benzo [a] piren ve diğer polisiklik aromatik hidrokarbonları, onların ester konjugatları olan fenollere ve dihidrodiolleri metabolize etmektedir (Hall ve Grover 1990). Diğer yandan benzo [a] pirenin bazı metabolizma ürünleri olarak elektrofilik epoksitler oluşmaktadır ki bunlar çok iyi bilinen karsinojenik formlardır ve anti diol-epoksitler olarak adlandırılırlar (Friedberg ve ark. 1995).

Benzo[a] piren gibi genotoksik kirleticilerin etkileri DNA da çeşitli yollarla gözlenebilir. DNA adduct oluşumu <sup>32</sup>P post labelling, DNA adductlarına karşı oluşturulan monoklonal ya da poliklonal antibody immunodenylerle kullanılmasıyla, fluoresan spektroskopisiyle birleşmiş HPLC, ya da mass spektroskopiyile birleşmiş gas kromatografi kullanılarak gözlenebilir. DNA adduct oluşumunu takiben herhangi bir ikinci olay oluşumu ya DNA hipometilasyon ya da bozuk DNA sentezi ölçülerek ve alkalın unwinding deneyi ya da comet deneyi gibi DNA iplik kırılmaların belirleyen metodlar kullanılarak değerlendirilebilir. DNA'daki düzensiz etkiler sitogenetik değişikleri belirleyen ve mutasyonları belirleyen flow sitometri kullanılarak gözlenebilir. Moleküler biyolojideki

gelişmeler DNA hasarını belirlemede yeni fırsatlar sunar. Böyle değişmeler restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm analizleri, DNA parmak izi, polimeraz zincir reaksiyonu vasıtasıyla gen amplifikasyonlarını içerir. Son zamanlarda, sadece bir tane oligonükleotid primer kullanılarak PCR'ın bir modifikasyonu DNA parmak izlerini oluşturmak için uygulanır. Böyle DNA parmak izleri türleri ayırmada, aynı türlerin farklı isolatlarını ayırmada ve bireyleri ayırmada kullanılır (Savva 1998).

### **1.9.2. Etil methansulfonat(EMS)**

Etil methansulfonat (EMS) mutajenik, teratojenik ve karsinojenik organik bileşiktir. Formülü  $C_3 H_8 O_3 S$  'dir.

Etil methansulfonat (EMS) bir DNA alkilleyici ajandır ve nokta mutajeni olarak çalışılır (French 2006). Baskın bir şekilde G-A transisyonuna neden olur (Sengstag ve ark. 1999).

EMS ana-telofaz evresinde kromozom aberasyonları meydana getirir. Ayrıca DNA iplik kırılmaları ve depürinasyonlarla lezyonlara sebep olur (Patra ve ark. 2005).

### **1.9.3. Mitomisin-C(MMC)**

Mitomisin-C, iyi bilinen klastojenik ve mutajenik bir ajandır. Baz değişimleri, kardeş kromatid değiş tokuşu, kromozom aberasyonları ve mikronüklei gibi genetik etkilere neden olan bifonksiyonel alkali ajandır (Poersch ve ark. 2007; Beceril ve ark. 1999).

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar hücre proliferasyon mekanizmalarını inhibe ettiklerinden hem tümör hücrelerinde hem de proliferasyon gösteren normal hücrelere, özellikle kemik iliği, gastro-intestinal epitelyum ve kıl folikül hücreleri üzerine toksik etki gösterebilmektedir (Dökmeci 2001).

MMC sıklıkla kanser tedavisinde güçlü antikanser ajanı olarak kullanılır ve ikincil kanser oluşturan mutajenik ve /veya karsinojenik özelliklere sahiptir ve bu ciddi problemler oluşturur (Niikawa ve ark. 2007).

Hamile bayanlarda kullanılan ilaçlar kategorileşmiştir. Mitomisin, 'D' kategorisine girmektedir. Yani insanda fetotoksik etkileri gösterilmiş ancak zorunlu durumlarda kullanılır (Dökmeci 2001).

Poersch ve arkadaşları (2007) yaptıkları deneyde MMC 'nin mikronükleus ve apoptozis deneyinden sonra CHO-K1 hücrelerinde çok toksik olduğu tespit etmişlerdir (Poersch ve ark. 2007).

## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Test maddelerinin dozları ve hazırlanışı

Bu çalışmada Benzo [a] piren (B[ $\square$ ]P), mitomisin-C (MMC) ve etil methansulfonat (EMS) maddelerinin DNA hasar ve mutasyonlarının RAPD tekniği kullanılarak araştırılmıştır.

Test maddeleri DMSO (dimetilsülfoksit) içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. EMS 0.1  $\mu$ l/ml, Mitomisin C 0.5  $\mu$ g/ml, B[ $\square$ ]P 15  $\mu$ g/ml şeklinde hazırlanmıştır.

#### 2.1.2. Kimyasal maddeler

Lenfosit kültürü için Kromozom Medyum B (Biochrom' dan), EMS (Ethil Methan Sulfonat), B[ $\square$ ]P, Mitomisin C, PBS' dir.

DNA izolasyonunda kullanılan kimyasal maddeler Tris-HCl (10mM-Sigma), NaCl (100mM), EDTA (1mM), SDS (% 0.5M), fenol-kloroform-isoamil alkol, isoamil-kloroform(24:1), Sodyum asetat(3M)' dir.

Polimeraz zincir reaksiyonunda 25mM dNTP(Fermantas), 25mM MgCl<sub>2</sub> (Fermantas), 10 X Taq Polimeraz (Fermantas), Oligonükeotid primerler (Biolegio, Research Genetics) tampon ve çözeltiler kullanılmıştır.

Agaroz jel elektroforezinde kullanılan kimyasal maddeler Agaroz(Sigma), TE Buffer, Ethidum bromür (Sigma)' dür.

#### 2.1.3. Tampon ve çözeltiler

##### 2.1.3.1 DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

- Stok Tris Çözeltisi: 500mM Tris pH: 8.0 'e HCl ile ayarlanır.
- Stok EDTA Çözeltisi: 500mM EDTA (Etilendiamin –tetra asetik asit disodyum tuzu), 5M NaOH (Sodyum Hidroksit ) ile pH:8.0 'e ayarlanır.

- TE Tamponu: 10 mM Tris pH : (8.09, 1mM EDTA(pH:8.0) )stok çözeltiler kullanılarak hazırlanır.

### 2.1.3.2 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'da kullanılan tampon ve çözeltiler

-Nükleotid Karışımı: 25 mM dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP )

-MgCl<sub>2</sub> : 25 mM

- 10 X Taq Polimeraz Tamponu : 100 mM Tris –HCl (pH : 8.3 ), 500 mM KCl, 1mg/ml Jelatin

-Taq Polimeraz : 5u/μl

-Primerler: Kullanılan primerler ve dizileri Tablo 2.1' de verilmiştir.

Primerin adı	Primerin dizisi (5'.....3')	%G+C içeriği
P1	GTGACGCCGC	%80
P2	CCGGACACGA	%70
P3	GAGGCGGCGA	%80
P4	AGCGTCGACT	%60
P5	CTGCGACGGT	%70
P8	AGACGCCGAC	%70
P9	GGGAAGAGAG	%60
P10	GGGTGTGGTT	%60
P19	CCACGGGAAG	%70
ID10	GAGAGCCAAC	%60

Çizelge 2.1. Kullanılan oligonükleotid primerlerin dizileri ve % G+C oranları

### **2.1.3.3 Agaroz jel elektroforezi için kullanılan çözeltiler**

- Agaroz: % 1.2 agaroz TBE tamponunda çözülerek hazırlanır.

-0.5 X TBE tamponu: 0.445 M Tris, 0.445 M Borik asit, 0.01 M EDTA (pH:8.0) ile hazırlandı.

-Ethidyum bromür: 10 mg/ ml derişimde hazırlandı ve koyu şişelerde muhafaza edildi( otoklavlanmadı).

## **2.2. Metod**

### **2.2.1. Lenfosit kültürü**

20-30 yaşları arasında sigara içmeyen, ilaç kullanmayan sağlıklı erkek bireylerden steril şartlarda alınan kan, 5ml Kromozom Medyum-B bulunan tüplere, 12' şer damla (0,2 ml) ilave edilerek ve steril koşullara sahip, % 5 lik CO<sub>2</sub> inkübatöründe 37 °C de, toplam 72 saat inkübe edilmiştir.

### **2.2.2. Test maddelerinin uygulanması**

#### **2.2.2.1 Deney 1 ( 24 saatlik uygulama )**

Periferal kan, her bir doz için Kromozom Medyum-B içeren tüplere ilave edilmiştir. Ardından test maddeleri 48. saatte eklenerek tüpler toplam 72 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

#### **2.2.2.2 Deney 2 ( 48 saatlik uygulama)**

Kan hücreleri medyum içersindeyken, maddeler 24. saatte eklenerek tüpler toplam 72 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

### **2.2.2.3 Deney 3 ( 72 saatlik uygulama)**

Kan hücreleri besi yerine konulurken aynı anda maddeler de ortama ilave edilir. 37 °C'de 72 saat inkübasyona bırakılır.

### **2.2.3. Lenfositlerin izolasyonu**

Kültür süresi olan 72 saatin bitiminde her bir tüp 1200 rpm'de 15 dk santrifüj edilip ve süpernatant atılmıştır. Üzerine 1ml PBS ilave edilmiştir. 1200 rpm'de 15 dk santrifüj edilip ve süpernatant atılmıştır. Tekrar 300µl PBS ilave edilmiştir.

### **2.2.4. DNA izolasyonu**

Bu deneyde 3 farklı DNA izolasyon yöntemi denenmiştir.

#### **2.2.4.1 Klasik yöntem 1**

Sharma ve arkadaşlarının yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. PBS' li kan örneklerimizden 250µl alıp üzerine 500 µl liziz buffer (10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5 SDS, pH 8.0) ilave edilmiştir. 3 µl Proteinaz K(20 mg/ml) ve 4 µl RNase(10mg/ml) A ilave edilerek vortekslenip 37°C de bir gece inkübe edilmiştir. Üzerine eşit miktarda fenol kloroform isoamilalkol, kloroform isoamilalkol eklenerek DNA uzaklaştırılmıştır. 3M Sodyum asetatın 0.1 katı ve soğuk etanol eklenerek DNA çöktürülmüştür. Pellet %70 lik alkolle yıkanılarak kurutulmuştur ve steril suda çözülmüştür.

#### **2.2.4.2 Klasik yöntem 2**

Sharma ve arkadaşlarının yöntemi modifiye edilerek kullanılmıştır. Kültürdeki hücreler 15 ml lik falkon tüplere aktarılmıştır. Santrifüj edilerek sulu kısım uzaklaştırılmıştır. Pellet PBS ile çözülerek santrifüj edilmiştir. Bu işlem 2 kez tekrar edilmiştir. Elde edilen hücre pelleti DNA buffer (1M Tris pH 8.0, 0.5 M



EDTA, dH<sub>2</sub>O) da çözülmüştür. 10 dk buzda inkübe edilmiştir. Santrifüj edilerek sıvı kısım uzaklaştırılır. Tekrar DNA buffer eklenerek çözülmüştür. Üzerine 50µl Proteinaz K( 20 mg/ml) ve 400µl 10 % SDS ilave edilerek 45°C de su banyosunda 1 gece bekletilmiştir. Her seferinde fenol, fenol+kloroform isoamil alkol, kloroform isoamil alkol eklenerek santrifüj sonrası süpernatant yeni tüpe aktarılmıştır. 3M 36µl NaAC ve sulu kısmın hacminin 3 katı kadar 100% etanol eklenerek DNA çökene kadar yavaşça elde çalkalanmıştır. Çöken DNA cam pipet kullanılarak 30 ml 70% etanol içeren 15 ml lik tüpe aktarılmıştır. Tüp 2 saat çalkalamalı platformda yatık halde sallanmıştır. Çöken DNA cam pipet kullanılarak bir miktar 70 % etanol ile ependorfa aktarılarak santrifüj edilmiştir. Çöken pelletin büyüklüğüne göre üzerine steril su konarak bir gece +4 de bekletildikten sonra pellet çözülmüştür.

#### **2.2.4.3 Kit kullanılarak yapılan yöntem**

PBS ile çözülmüş halde bulunan örneklerin üzerine 400µl liziz buffer eklenmiştir. 65°C sıcak su banyosunda 10 dk bekletilmiştir. 600µl kloroform eklenerek elde 1 dk karıştırıldıktan sonra santrifüj edilmiştir. Süpernatant alınarak üzerine 800µl presipitasyon solüsyonu eklenmiştir. Santrifüjden sonra pelleti dökmeden ependorf boşaltılmıştır. 1.2M 150µ NaCl ve 300µl 100% etanol konularak -20°C 'de 10 dk bekletilmiştir. Santrifüj edilerek 70% alkolle yıkanarak kurutulmuştur ve steril suda çözülmüştür.

#### **2.2.5. DNA konsantrasyonu tayini**

Motek NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre kullanılarak örneklerden elde edilen DNA'lar 260 ve 280 nm dalga boylarında okunarak miktar ve saflık dereceleri belirlenmiştir. Ölçümlere göre gerekli oranda seyreltilmiştir.

### 2.2.6. Rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA zincir reaksiyonu (RAPD)

Çizelgede baz dizilimleri ve %G+C oranları verilen rasgele seçilmiş primerlerin her biri ile hedef DNA'nın herhangi bir bölümü rasgele çoğaltılmıştır.

PCR reaksiyonu 0.5 ml propilen tüplerde 25 µl'lik toplam reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir.

#### Uygulanan PCR Programı:

95°C	5sn	} 45 döngü
92°C	55sn	
32–36°C	1dk	
72°C	2dk	
72°C	7dk	1 döngü
4 °C		

### 2.2.7. Agaroz jel elektroforezi

RAPD- PCR ürünlerinin analizi için %1.2 'lik agaroz jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir. Yatay konumda elektroforez kullanılmıştır. Her bir PCR örneğinden 6µl yüklenmiştir.

PCR ürünleri 40-90V arasında serbest akımda yürütülmüştür. Jeller UV translüminatör üzerinde görüntülenmiştir. Jellerin fotoğrafları Uvitec Biolab UV Photomer jel dökümantasyon cihazıyla çekilmiştir.

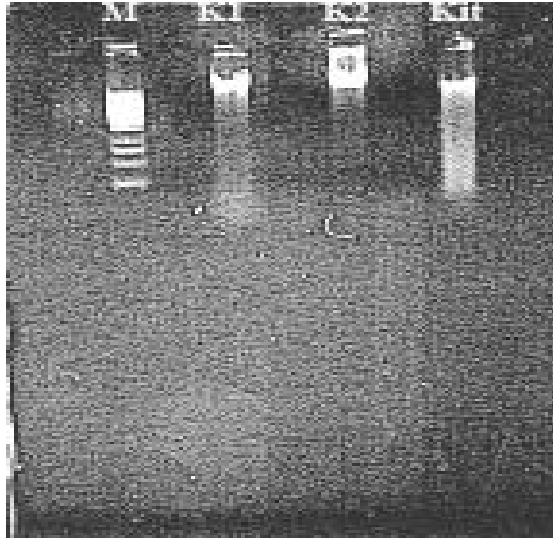
### 3. BULGULAR

#### 3.1. Lenfosit Kültürü

Benzo [a] piren, ve etil methansulfonat (EMS) ve mitomisin-C(MMC) maddelerinin her biri için 24, 48 ve 72 lik saatlik uygulama yapıldı.

#### 3.2. DNA İzolasyonu

Lenfosit kültüründen DNA izolasyonu için 3 metod ayrı ayrı denenmiştir. Üç yöntemde de DNA izolasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1.). Sonuçlar değerlendirildiğinde elde edilen DNA yoğunluğunun bütün yöntemlerde neredeyse aynı olması ve deneyin uygulama kolaylığı nedeniyle daha sonraki basamaklar Klasik Yöntem 1 kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

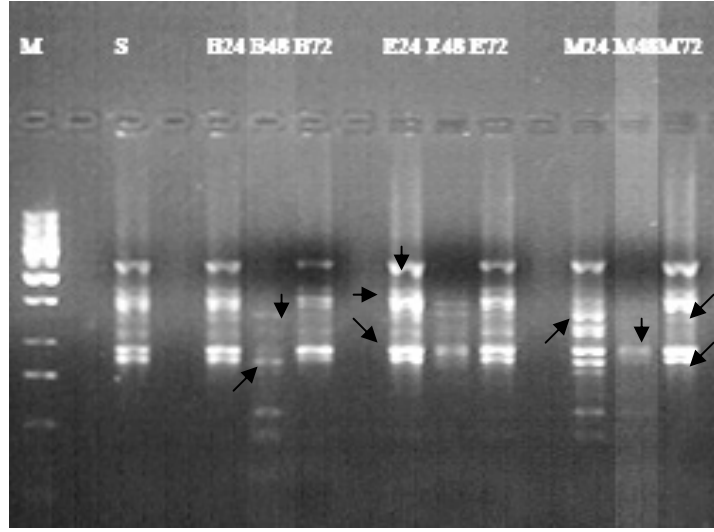


**Şekil 3. 1.** Klasik yöntem 1, Klasik yöntem 2 ve Kit yöntemi kullanılarak elde edilen DNA jel fotoğrafı

### 3. 3. RAPD Profillerinin Değerlendirilmesi

DNA' lar Klasik Yöntem 1 ile izole edildikten sonra RAPD uygulanmıştır. DNA örnekleri jelde yürütülerek fotojrafları çekilmiştir.

**P1 Sonuçları:** RAPD işlemini sonucu oluşan bant profilleri Şekil 3.2' de ve moleküler ağırlıkları Çizelge 3. 1' de gösterilmiştir.



**Şekil 3. 2.** 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P1 primeri ile oluşturulmuş RAPD bant profili. ( oklar bant yoğunluklarını gösteriyor).

B.S	Marker (1kb)	S	B24	B48	B72	E24	E48	E72	M24	M48	M72
1	4.000	1807	1807	-	1807	1807	-	1807	1807	-	1807
2	3.000	1333	1333	-	1333	1333	-	1333	1333	-	1333
3	2.500	1181	1181	-	1181	1181	1181	1181	1181	-	1181
4	2.000	1046	1046	1046	-	1046	1046	1046	1046	-	1046
5	1.500	845	845	-	845	845	-	845	845	-	845
6	1.000	704	704	-	704	704	704	704	704	704	704
7	750	624	624	624	624	624	-	624	624	624	624
8	500	-	-	536	-	-	-	-	536	-	-
9	250	-	-	339	-	-	-	-	339	-	-
10		-	-	258	-	-	-	-	258	-	-

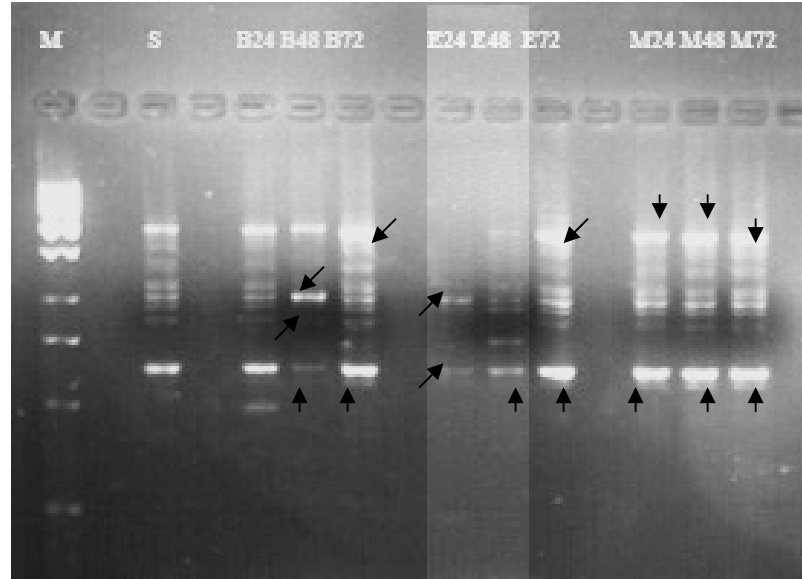
**Çizelge 3.1.** 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P1 primeri ile oluşturulmuş RAPD bantlarının LabImage 1D 2006 1D Gel Analysis Software programı ile saptanmış moleküler ağırlıkları.

Spontanda bulunan bantlar B[a] P 'ne 24 saatlik uygulamada aynı kalmıştır. 48 saatlik uygulamada 1807, 1333, 1181, 845 ve 704 moleküler ağırlıklı bantlar kaybolurken 536, 339 ve 258 moleküler ağırlıklı yeni bantlar oluştuğu tespit edilmiştir. Ayrıca 1046 ve 624 moleküler ağırlıklı bantlar spontanla aynı kalırken bant yoğunluğunda belirgin bir azalma olmuştur. 72 saatlik uygulamada 1046 moleküler ağırlıklı bant kaybolurken diğer bantların yoğunlukları azalmıştır.

EMS 'nin 24 ve 72 saatlik uygulamalarında bant kaybı ya da kazanımı meydana gelmemiştir. 24 saatlik uygulamada 1807, 1181, 704 ve 624 moleküler ağırlıklı bantlarda yoğunluk artışı saptanmıştır. EMS 'nin 48 saatlik uygulamasında 1807, 1333, 845 ve 624 moleküler ağırlıklı bantlar kaybolduğu ve spontanla ortak kalan bantların yoğunluklarında azalış meydana geldiği tespit edilmiştir.

MMC 'nin 24 saatlik uygulamasında bant kaybı gözlenmediği 536, 339 ve 258 moleküler ağırlıklı yeni bantlar oluştuğu belirlenmiştir. Bu oluşan yeni bantlar B[a] P 'nin 48 saatlik uygulamasında oluşan bantlarla aynıdır. 1181, 1046 ve 845 moleküler ağırlıklı bantların yoğunluklarında artma saptanmıştır. MMC 'nin 48 saatlik uygulamasında spontanla sadece 704 ve 624 moleküler ağırlıklı bantlar ortak kalmıştır. Ayrıca bu bantların yoğunluklarında azalış belirlenmiştir. MMC 'nin 72 saatlik uygulamasında bant kaybı gözlenmemiştir. 1807, 1181, 704 ve 624 moleküler ağırlıklı bantların yoğunluklarında artış belirlenmiştir.

**P2 Sonuçları:** RAPD işlemini sonucu oluşan bant profilleri Şekil 3.3' de ve moleküler ağırlıkları Çizelge 3. 2' de gösterilmiştir.



**Şekil 3. 3.** 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P2 primeri ile oluşturulmuş RAPD bant profili ( oklar bant yoğunluklarını gösteriyor).

B.S.	Marker (1kb)	S	B24	B48	B72	E24	E48	E72	M24	M48	M72
1	3.000	2017	2017	2017	2017	-	2017	2017	2017	2017	2017
2	2.500	1800	1800	-	1800	-	-	1800	1800	1800	1800
3	2.000	1570	1570	-	1570	-	-	1570	1570	1570	1570
4	1.500	1339	1339	-	1339	-	-	1339	1339	1339	1339
5	1.000	1222	1222	1222	1222	1222	1222	1222	1222	1222	1222
6	750	1115	1115	-	1115	-	-	1115	1115	1115	1115
7	500	951	951	951	951	-	-	951	951	951	951
8	250	-	-	-	-	-	830	-	-	-	-
9		660	660	660	660	660	660	660	660	660	660
10		-	-	-	576	-	-	576	576	576	576
11		-	491	-	-	-	-	-	-	-	-

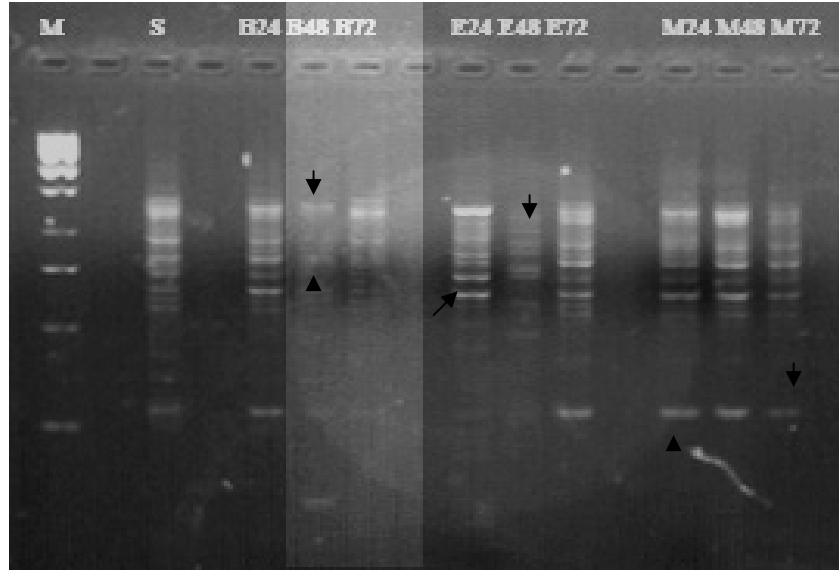
**Çizelge 3.2.** 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P2 primeri ile oluşturulmuş RAPD bantlarının LabImage 1D 2006 1D Gel Analysis Software programı ile saptanmış moleküler ağırlıkları.

Spontanda bulunan bantlar B[a] P 'nle 24 saatlik uygulamada aynı kalmış ve 491 moleküler ağırlığında yeni bir bant oluştuğu gözlenmiştir. 48 saatlik uygulamada 1800, 1570, 1339 ve 1115 moleküler ağırlıklı bantlar kaybolduğu ve 660 moleküler ağırlıklı bant spontanla ortak olmasına rağmen yoğunluğunun azaldığı belirlenmiştir. 72 saatlik uygulamada bant kaybının meydana gelmediği ve 576 moleküler ağırlıklı yeni bandın oluştuğu saptanmıştır.

EMS 'nin 24 saatlik uygulamasında sadece 1222 ve 660 moleküler ağırlıklı bantların spontanla ortak kaldığı ve diğer bantların kaybolduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu ortak bantların yoğunluklarında belirgin bir azalma saptanmıştır. EMS 'nin 48 saatlik uygulamasında 1800, 1570, 1339, 1115 ve 951 moleküler ağırlıklı bantların kaybolduğu ve 830 moleküler ağırlıklı yeni bant oluştuğu görülmüştür. Spontanla ortak kalan bantların yoğunluklarında da azalma saptanmıştır.

EMS 'nin 72 saatlik ve MMC 'nin 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalarında ki etkinin aynı olduğu, bant kaybının olmadığı ve 576 moleküler ağırlıklı yeni bir bandın oluştuğu saptanmıştır. Ayrıca 2017, 1222 ve 660 moleküler ağırlıklı bantların yoğunluğunda bir artış gözlenmiştir.

**P3 Sonuçları:** RAPD işlemini sonucu oluşan bant profilleri Şekil 3.4' de ve moleküler ağırlıkları Çizelge 3. 3' de gösterilmiştir.



**Şekil 3. 4.** 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P3 primeri ile oluşturulmuş RAPD bant profili ( oklar bant yoğunluklarını gösteriyor).

B.S	Marker (kbp)	S	B24	B48	B72	E24	E48	E72	M24	M48	M72
1	4.000	2173	2173	-	2173	-	-	-	-	-	-
2	3.000	1854	1854	-	1854	1854	-	1854	-	1854	-
3	2.500	1653	1653	1653	1653	1653	-	1653	1653	1653	1653
4	2.000	1189	1189	-	1189	1189	-	-	1189	1189	1189
5	1.500	983	983	983	-	983	-	983	983	983	983
6	1.000	839	839	-	-	839	839	839	839	839	839
7	750	674	674	-	-	674	-	674	674	674	674
8	500	590	-	-	-	590	590	590	590	590	-
9	250	-	-	-	-	-	550	-	-	-	-
10		521	-	-	-	521	-	-	-	-	-
11		172	172	-	-	-	-	172	172	172	172
12				125							

**Çizelge 3. 3.** 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P3 primeri ile oluşturulmuş RAPD bantlarının LabImage 1D 2006 1D Gel Analysis Software programı ile saptanmış moleküler ağırlıkları.

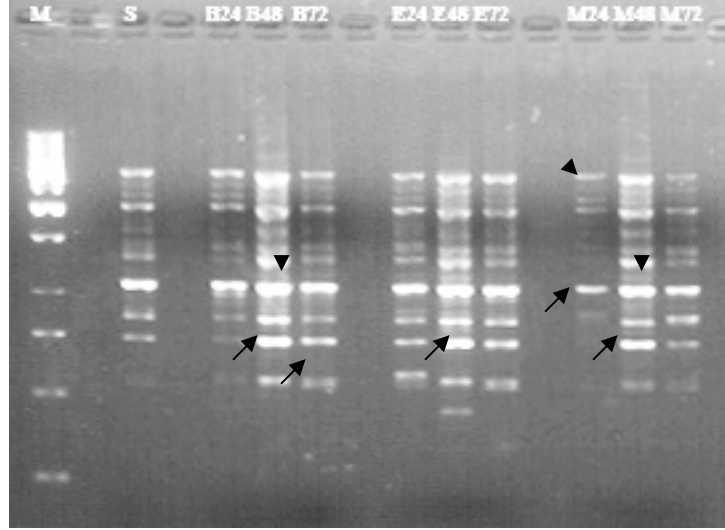


B[a] P' nin 24 saatlik uygulamasında 590 ve 521 moleküler ağırlıklı bantların kaybolduğu gözlenmiştir. B[a] P' nin 48 saatlik uygulamasında ise 2173, 1854, 1189, 839, 674, 590, 521 ve 172 moleküler ağırlıklı 8 bandın kaybolduğu, 125 moleküler ağırlıklı yeni bir bandın oluştuğu ve spontanla orta kalan 2 bandın yoğunluklarında azalma olduğu belirlenmiştir. B[a] P' nin 72 saatlik uygulamasında 983, 839, 674, 590, 521 ve 172 moleküler ağırlıklı bantların kaybolduğu saptanmıştır.

EMS 'nin 24 saatlik uygulamasında 2173 ve 172 moleküler ağırlıklı bantların kaybolduğu ve 1854 moleküler ağırlıklı bandın yoğunluğunda artış olduğu gözlenmiştir. EMS 'nin 48 saatlik uygulamasında 2173, 1854, 1653, 1189, 983, 674, 521 ve 172 moleküler ağırlıklı bantların kaybolduğu ve 550 moleküler ağırlıklı yeni bir bandın oluştuğu saptanmıştır. EMS 'nin 72 saatlik uygulamasında 2173, 1189 ve 521 moleküler ağırlıklı bantların kaybolduğu belirlenmiştir.

MMC 'nin 24 saatlik uygulamasında 2173, 1854 ve 521 moleküler ağırlıklı bantların, 48 saatlik uygulamasında 2173 ve 521 moleküler ağırlıklı bantların, 72 saatlik uygulamasında 2173, 1854, 590 ve 521 moleküler ağırlıklı bantların kaybolduğu belirlenmiştir.

**P4 Sonuçları:** RAPD işlemini sonucu oluşan bant profilleri Şekil 3.5' de ve moleküler ağırlıkları Çizelge 3. 4' de gösterilmiştir.



**Şekil 3. 5.** 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P4 primeri ile oluşturulmuş RAPD bant profili ( oklar bant yoğunluklarını gösteriyor).

B.S	Marker (1kb)	S	B24	B48	B72	E24	E48	E72	M24	M48	M72
1	5.000	2972	2972	2972	2972	2972	2972	2972	2972	2972	2972
2	4.000	2695	2695	2695	2695	2695	2695	2695	-	2695	2695
3	3.000	2397	2397	2397	2397	2397	2397	2397	2397	2397	2397
4	2.500	2174	2174	-	2174	2174	2174	2174	2174	2174	2174
5	2.000	1823	-	1823	-	-	1823	-	-	1823	1823
6	1.500	1590	1590	1590	1590	1590	1590	1590	-	1590	1590
7	1.000	1471	1471	1471	1471	1471	1471	1471	-	1471	1471
8	750	1186	1186	1186	1186	1186	1186	1186	1186	1186	1186
9	500	-	-	-	-	1141	-	-	1141	-	-
10	250	920	920	920	920	920	920	920	-	920	920
11		772	772	772	772	772	772	772	-	772	772
12		-	-	-	-	576	-	-	-	-	-
13		-	-	554	554	554	554	554	-	554	554
14		-	-	-	-	-	429	-	-	-	-

**Çizelge 3. 4.** 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P1 primeri ile oluşturulmuş RAPD bantlarının LabImage 1D 2006 1D Gel Analysis Software programı ile saptanmış moleküler ağırlıkları.

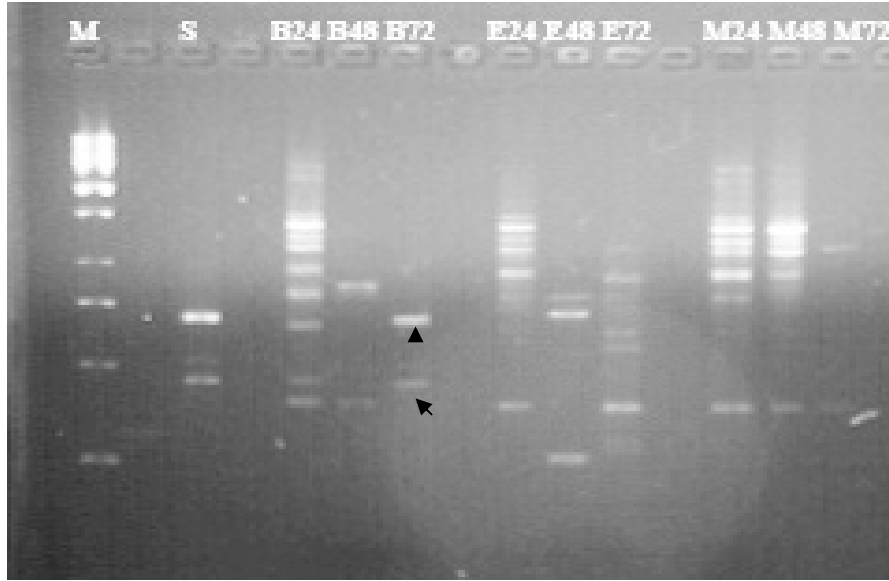
B[a] P' nin 24 saatlik uygulamasında 1823 moleküler ağırlıklı bandın varlığını koruyamadığı belirlenmiştir. B[a] P' nin 48 saatlik uygulamasında 2174 moleküler ağırlıklı bandın kaybolduğu ve 554 moleküler ağırlıklı yeni bant oluştuğu saptanmıştır. Ayrıca 1186, 920 ve 772 moleküler ağırlıklı bantların yoğunluğunda artış gözlenmiştir.

B[a] P' nin 72 saatlik uygulamasında 1823 moleküler ağırlıklı bandın kaybolduğu ve 554 moleküler ağırlıklı bandın oluştuğu saptanmıştır.

EMS 'nin 24 saatlik uygulamasında 1823 moleküler ağırlıklı bandın kaybolduğu ve 1141, 576 ve 554 moleküler ağırlıklı yeni bantların oluştuğu gözlenmiştir. EMS 'nin 48 saatlik uygulamasında spontanda bulunan bantlara ek olarak 554 ve 429 moleküler ağırlıklı bantların oluştuğu, 920 ve 772 moleküler ağırlıklı bantların yoğunluğunun arttığı saptanmıştır. EMS 'nin 72 saatlik uygulamasında 1823 moleküler ağırlıklı bandın kaybolduğu ve 554 moleküler ağırlıklı yeni bandın oluştuğu belirlenmiştir.

MMC 'nin 24 saatlik uygulamasında 2695, 1823, 1590, 1471, 920 ve 772 moleküler ağırlıklı bantların kaybolduğu ve 1141 moleküler ağırlıklı yeni bandın oluştuğu gözlenmiştir. MMC 'nin 48 saatlik uygulamasında spontanda bulunan bantlara ek olarak 554 moleküler ağırlıklı yeni bandın oluştuğu ve 2972, 1471, 2174, 1186 ve 772 moleküler ağırlıklı bantların yoğunluklarının arttığı belirlenmiştir. MMC 'nin 72 saatlik uygulamasında bant kaybı gözlenmeyip 554 moleküler ağırlıklı yeni bandın oluştuğu saptanmıştır.

**P5 Sonuçları:** RAPD işlemini sonucu oluşan bant profilleri Şekil 3.6' de ve moleküler ağırlıkları Çizelge 3. 5' de gösterilmiştir.



**Şekil 3. 6.** 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P5 primeri ile oluşturulmuş RAPD bant profili ( oklar bant yoğunluklarını gösteriyor).

B.S	Marker (kbp)	S	B24	B48	B72	E24	E48	E72	M24	M48	M72
1	4.000	-	2490	-	-	-	-	-	2490	-	-
2	3.000	-	2250	-	-	-	-	-	2250	-	-
3	2.500	-	1734	-	-	1734	-	-	1734	1734	-
4	2.000	-	1567	-	-	1567	-	-	1567	1567	-
5	1.500	-	1413	-	-	1413	-	-	1413	1413	-
6	1.000	-	1274	-	-	1274	-	1274	1274	1274	1274
7	750	-	1091	-	-	1091	-	1091	1091	1091	-
8	500	-	-	984	-	-	-	-	-	-	-
9	250	-	887	-	-	-	887	887	887	-	-
10		-	-	-	-	-	760	-	-	-	-
11		<b>741</b>	-	-	<b>741</b>	-	-	-	-	-	-
12		-	-	-	-	-	-	651	-	-	-
13		-	-	-	-	-	-	572	-	-	-
14		<b>516</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15		<b>442</b>	<b>442</b>	-	<b>442</b>	-	-	-	-	-	-
16		-	360	360	-	360	-	360	360	360	360
17		-	-	-	-	-	230	-	-	-	-

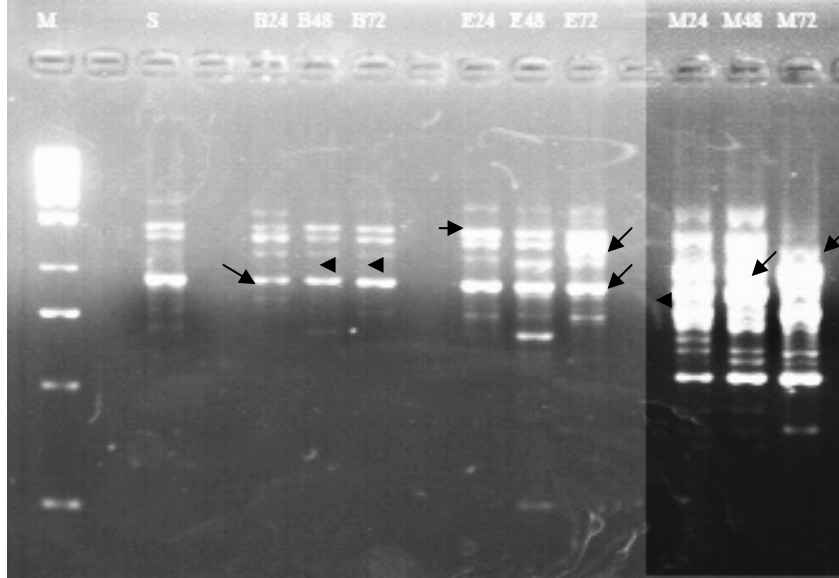
**Çizelge 3. 5.** 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P5 primeri ile oluşturulmuş RAPD bantlarının LabImage 1D 2006 1D Gel Analysis Software programı ile saptanmış moleküler ağırlıkları.

B[a] P' nin 24 saatlik uygulamasında spontanda bulunan 741 ve 516 moleküler ağırlıklı bantlar kaybolurken 2490, 2250, 1734, 1567, 1413, 1274, 1091, 887 ve 360 moleküler ağırlıklı 9 tane yeni bant oluştuğu gözlenmiştir. B[a] P' nin 48 saatlik uygulamasında spontanda bulunan bütün bantların kaybolduğu ve 984 ve 360 moleküler ağırlıklı yeni bantların oluştuğu belirlenmiştir. B[a] P' nin 72 saatlik uygulamasında 516 moleküler ağırlıklı bandın kaybolduğu saptanmıştır.

B[a] P' nin 48 saatlik uygulamasında, EMS 'nin ve MMC 'nin bütün uygulamalarında spontanda bulunan bütün bantlar kaybolduğu ve yeni bantların oluştuğu belirlenmiştir. EMS 'nin 24 saatlik uygulamasında 1714, 1567, 1413, 1274, 1091 ve 360 moleküler ağırlıklı, EMS 'nin 48 saatlik uygulamasında 887, 760 ve 230 moleküler ağırlıklı, EMS 'nin 72 saatlik uygulamasında 1274, 1091, 887, 651, 572 ve 360 moleküler ağırlıklı yeni bantların oluştuğu belirlenmiştir.

MMC 'nin 24 saatlik uygulamasında 2490, 2250, 1734, 1567, 1413, 1274, 1091, 887 ve 360 moleküler ağırlıklı, MMC 'nin 48 saatlik uygulamasında 1734, 1567, 1413, 1274, 1091 ve 360 moleküler ağırlıklı, MMC 'nin 72 saatlik uygulamasında 1274 ve 360 moleküler ağırlıklı yeni bantların oluştuğu saptanmıştır.

**P8 Sonuçları:** RAPD işlemini sonucu oluşan bant profilleri Şekil 3.7' da ve moleküler ağırlıkları Çizelge 3. 6' da gösterilmiştir.



**Şekil 3. 7.** 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P8 primeri ile oluşturulmuş RAPD bant profili ( oklar bant yoğunluklarını gösteriyor).

B.S	Marker (kbp)	S	B24	B48	B72	E24	E48	E72	M24	M48	M72
1	3.000	<b>1903</b>	-	-	-	<b>1903</b>	<b>1903</b>	<b>1903</b>	<b>1903</b>	<b>1903</b>	-
2	2.500	-	1766	-	-	-	-	-	-	-	-
3	2.000	<b>1579</b>	<b>1579</b>	<b>1579</b>	<b>1579</b>	<b>1579</b>	<b>1579</b>	<b>1579</b>	<b>1579</b>	<b>1579</b>	-
4	1.500	<b>1412</b>	<b>1412</b>	<b>1412</b>	<b>1412</b>	<b>1412</b>	<b>1412</b>	<b>1412</b>	<b>1412</b>	<b>1412</b>	-
5	1.000	-	1286	1286	1286	1286	1286	1286	1286	1286	1286
6	750	<b>1067</b>	<b>1067</b>	<b>1067</b>	<b>1067</b>	<b>1067</b>	<b>1067</b>	<b>1067</b>	<b>1067</b>	<b>1067</b>	<b>1067</b>
7	500	-	-	-	-	820	820	820	820	820	820
8	250	-	-	-	-	-	695	-	695	-	-
9		-	-	-	-	-	-	-	621	621	621
10		-	-	-	-	-	-	-	-	566	566
11		-	-	-	-	-	-	-	506	506	506
12		-	-	-	-	-	-	-	-	-	348
13		-	-	-	-	-	195	-	-	-	-

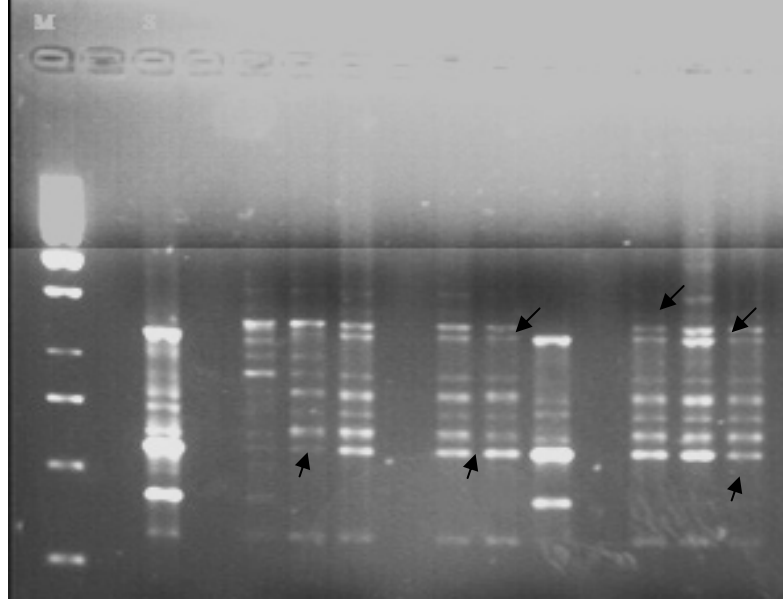
**Çizelge 3. 6.** 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P8 primeri ile oluşturulmuş RAPD bantlarının LabImage 1D 2006 1D Gel Analysis Software programı ile saptanmış moleküler ağırlıkları.

B[a]P' nin 24 saatlik uygulamasında 1903 moleküler ağırlıklı bandın kaybolduğu, 1766 ve 1286 moleküler ağırlıklı bantların oluştuğu belirlenmiştir. B[a] P' nin 48 ve 72 saatlik uygulamalarında 1903 moleküler ağırlıklı bandın kaybolduğu ve 1286 moleküler ağırlıklı yeni bir bandın oluştuğu saptanmıştır.

EMS 'nin 24 ve 72 saatlik uygulamalarında 1286 ve 820 moleküler ağırlıklı bantların oluştuğu ve 1579 ve 1412 moleküler ağırlıklı bantların yoğunluklarının arttığı saptanmıştır. EMS 'nin 48 saatlik uygulamasında 1286, 820, 695 ve 195 moleküler ağırlıklı yeni bantların oluştuğu saptanmıştır.

MMC 'nin 24 saatlik uygulamasında spontanda bulunan bantlara ek olarak 1286, 820, 695, 621 ve 506 moleküler ağırlıklı, MMC 'nin 48 saatlik uygulamasında ise 1286, 820, 621, 566 ve 506 moleküler ağırlıklı bantların oluştuğu saptanmıştır. Ayrıca 24 ve 48 saatlik uygulamaların her ikisinde de 1903, 1779 ve 1412 moleküler ağırlıklı bantların yoğunluklarında artış belirlenmiştir. MMC 'nin 72 saatlik uygulamasında 1286, 820, 621, 566, 506 ve 348 moleküler ağırlıklı yeni bantların oluştuğu ve 1067 moleküler ağırlıklı bandın yoğunluğunun arttığı gözlenmiştir.

**P9 Sonuçları:** RAPD işlemini sonucu oluşan bant profilleri Şekil 3.8' de ve moleküler ağırlıkları Çizelge 3. 7' de gösterilmiştir.



**Şekil 3. 8.** 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P9 primeri ile oluşturulmuş RAPD bant profili ( oklar bant yoğunluklarını gösteriyor).

B.S	Marker (1kb)	S	B24	B48	B72	E24	E48	E72	M24	M48	M72
1	4.000	-	-	-	-	-	-	-	-	2025	-
2	3.000	-	1604	1604	1604	1604	-	-	-	1604	-
3	2.500	-	1358	1358	1358	1358	1358	-	1358	1358	1358
4	2.000	<b>1149</b>	<b>1149</b>	-	<b>1149</b>	<b>1149</b>	<b>1149</b>	<b>1149</b>	<b>1149</b>	<b>1149</b>	<b>1149</b>
5	1.500	<b>957</b>	<b>957</b>	<b>957</b>	-	-	-	-	-	<b>957</b>	-
6	1.000	<b>851</b>	<b>851</b>	<b>851</b>	<b>851</b>	<b>851</b>	<b>851</b>	-	<b>851</b>	<b>851</b>	<b>851</b>
7	750	<b>783</b>	-	<b>783</b>	<b>783</b>	<b>783</b>	<b>783</b>	-	<b>783</b>	<b>783</b>	<b>783</b>
8	500	-	-	-	-	-	-	745	-	-	-
9	250	<b>709</b>	-	<b>709</b>	<b>709</b>	<b>709</b>	<b>709</b>	<b>709</b>	<b>709</b>	<b>709</b>	<b>709</b>
10		<b>663</b>	-	<b>663</b>	<b>663</b>	<b>663</b>	<b>663</b>	<b>663</b>	<b>663</b>	<b>663</b>	<b>663</b>
11		<b>600</b>	-	-	<b>600</b>	<b>600</b>	<b>600</b>	<b>600</b>	<b>600</b>	<b>600</b>	<b>600</b>
12		<b>430</b>	-	-	-	-	-	<b>430</b>	-	-	-
13		<b>335</b>	-	<b>335</b>	<b>335</b>	<b>335</b>	<b>335</b>	-	<b>335</b>	<b>335</b>	<b>335</b>

**Çizelge 3. 7.** 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P9 primeri ile oluşturulmuş RAPD bantlarının LabImage 1D 2006 1D Gel Analysis Software programı ile saptanmış moleküler ağırlıkları.

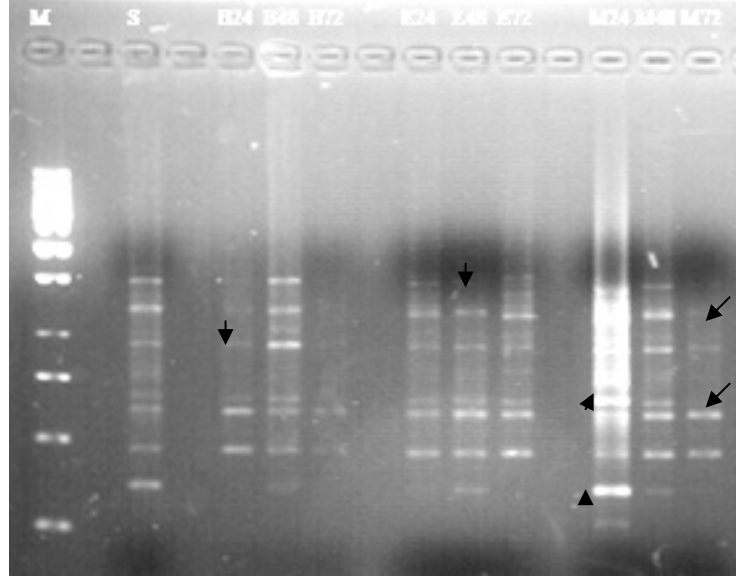


B[a]P' nin 24 saatlik uygulamasında 709, 663, 600, 430 ve 335 moleküler ağırlıklı bantların kaybolduğu ve 1604, 1358 moleküler ağırlıklı yeni bantların oluştuğu belirlenmiştir. Ayrıca 1149 moleküler ağırlıklı bandın yoğunluğunda azalma tespit edilmiştir. B[a]P' nin 48 saatlik uygulamasında 1149, 600 ve 430 moleküler ağırlıklı bantların kaybolduğu; 1604, 1358 moleküler ağırlıklı yeni bantların oluştuğu ve 663 moleküler ağırlıklı bandın yoğunluğunda azalma gözlenmiştir. B[a]P' nin 72 saatlik uygulamasında 957 ve 430 moleküler ağırlıklı bantların kaybolduğu, 663 ve 600 moleküler ağırlıklı bantların yoğunluğunda bir azalma olduğu saptanmıştır.

EMS 'nin 24 saatlik uygulamasında B[a]P' nin 72 saatlik uygulamasıyla aynı etkilerin gerçekleştiği gözlenmiştir. EMS 'nin 48 saatlik uygulamasında 957 ve 430 moleküler ağırlıklı bantların kaybolduğu, 1358 moleküler ağırlıklı yeni bandın oluştuğu ve 600 moleküler ağırlıklı bandın yoğunluğunun azaldığı belirlenmiştir. EMS 'nin 72 saatlik uygulamasında 957, 851, 783 ve 335 moleküler ağırlıklı bantların kaybolduğu ve 745 moleküler ağırlıklı yeni bandın oluştuğu saptanmıştır.

MMC 'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarında 950 ve 430 moleküler ağırlıklı bantların kaybolduğu, 1358 moleküler ağırlıklı yeni bir bandın oluştuğu belirlenmiştir. Ayrıca 1149 ve 600 moleküler ağırlıklı bantların yoğunluğunda azalma gözlenmiştir. MMC 'nin 72 saatlik uygulamasında 430 moleküler ağırlıklı bandın kaybolduğu ve 2025, 1604, 1358 moleküler ağırlıklı yeni bantların oluştuğu saptanmıştır.

**P10 Sonuçları:** RAPD işlemini sonucu oluşan bant profilleri Şekil 3.9' da ve moleküler ağırlıkları Çizelge 3. 8' de gösterilmiştir.



**Şekil 3. 9.** 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P10 primeri ile oluşturulmuş RAPD bant profili ( oklar bant yoğunluklarını gösteriyor).

B.S	Marker (kbp)	S	B24	B48	B72	E24	E48	E72	M24	M48	M72
1	5.000	1692	-	1692	-	1692	-	1692	1692	1692	1692
2	4.000	-	-	-	-	-	-	1573	-	-	-
3	3.000	1532	1532	1532	-	1532	1532	1532	1532	1532	1532
4	2.500	1359	-	1359	-	-	-	-	1359	1359	1359
5	2.000	1049	1049	1049	-	1049	1049	1049	1049	1049	1049
6	1.500	827	-	-	-	-	827	827	827	-	-
7	1.000	705	705	705	-	705	705	705	705	705	-
8	750	613	613	613	613	613	613	613	613	613	613
9	500	464	464	464	464	464	464	464	464	464	464
10	250	358	-	358	-	-	358	-	358	358	-
11		-	-	-	-	-	-	-	266	-	-

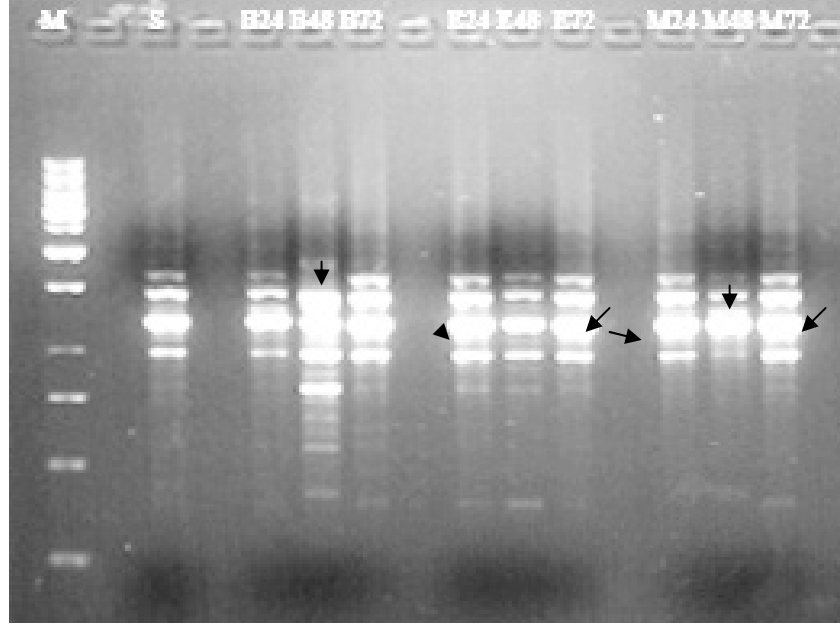
**Çizelge 3. 8.** 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P10 primeri ile oluşturulmuş RAPD bantlarının LabImage 1D 2006 1D Gel Analysis Software programı ile saptanmış moleküler ağırlıkları

B[a]P' nin 24 saatlik uygulamasında spontanda bulunan 1692, 1359, 827 ve 358 moleküler ağırlıklı bantların kaybolduğu ve 1359 moleküler ağırlıklı bandın yoğunluğunun azaldığı saptanmıştır. B[a]P' nin 48 saatlik uygulamasında 827 moleküler ağırlıklı bandın varlığını koruyamadığı tespit edilmiştir. B[a]P' nin 72 saatlik uygulamasında 1692, 1532, 1359, 1049, 827, 705 ve 358 moleküler ağırlıklı bantların kaybolduğu belirlenmiştir.

EMS 'nin 24 saatlik uygulamasında 1359, 827 ve 358 moleküler ağırlıklı bantların, EMS 'nin 48 saatlik uygulamasında 1692, 1359 moleküler ağırlıklı bantların kaybolduğu ve EMS 'nin 72 saatlik uygulamasında 1359 ve 358 moleküler ağırlıklı bantların kaybolduğu ve 1573 moleküler ağırlıklı yeni bir bandın oluştđu tespit edilmiştir.

MMC 'nin 24 saatlik uygulamasında spontanda bulunan bantlara ek olarak 266 moleküler ağırlıklı bant oluşumu belirlenmiştir. MMC 'nin 48 saatlik uygulamasında 827 moleküler ağırlıklı bandın, 72 saatlik uygulamasında ise 827, 705 ve 358 moleküler ağırlıklı bantların kaybolduğu saptanmıştır.

**P19 Sonuçları:** RAPD işlemini sonucu oluşan bant profilleri Şekil 3.10' da ve moleküler ağırlıkları Çizelge 3. 9' da gösterilmiştir.



**Şekil 3. 10.** 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P19 primeri ile oluşturulmuş RAPD bant profili ( oklar bant yoğunluklarını gösteriyor).

B.S.	Marker (kbp)	S	B24	B48	B72	E24	E48	E72	M24	M48	M72
1	6.000	-	-	1800	-	-	-	-	-	-	-
2	5.000	<b>1650</b>	<b>1650</b>	-	<b>1650</b>	<b>1650</b>	<b>1650</b>	<b>1650</b>	<b>1650</b>	-	<b>1650</b>
3	4.000	<b>1435</b>	<b>1435</b>	<b>1435</b>	<b>1435</b>	<b>1435</b>	<b>1435</b>	<b>1435</b>	<b>1435</b>	<b>1435</b>	<b>1435</b>
4	3.000	<b>1304</b>	<b>1304</b>	<b>1304</b>	<b>1304</b>	<b>1304</b>	<b>1304</b>	<b>1304</b>	<b>1304</b>	<b>1304</b>	<b>1304</b>
5	2.500	<b>1050</b>	<b>1050</b>	<b>1050</b>	<b>1050</b>	<b>1050</b>	<b>1050</b>	<b>1050</b>	<b>1050</b>	<b>1050</b>	<b>1050</b>
6	2.000	-	-	787	787	787	787	787	-	-	787
7	1.500	-	-	715	-	-	-	-	-	-	-
8	1.000	-	-	634	-	-	-	-	-	-	-
9	750	-	-	576	-	-	-	-	-	-	-
10	500	-	-	356	-	-	-	-	-	356	-
11	250	-	-	-	331	331	331	-	-	-	331

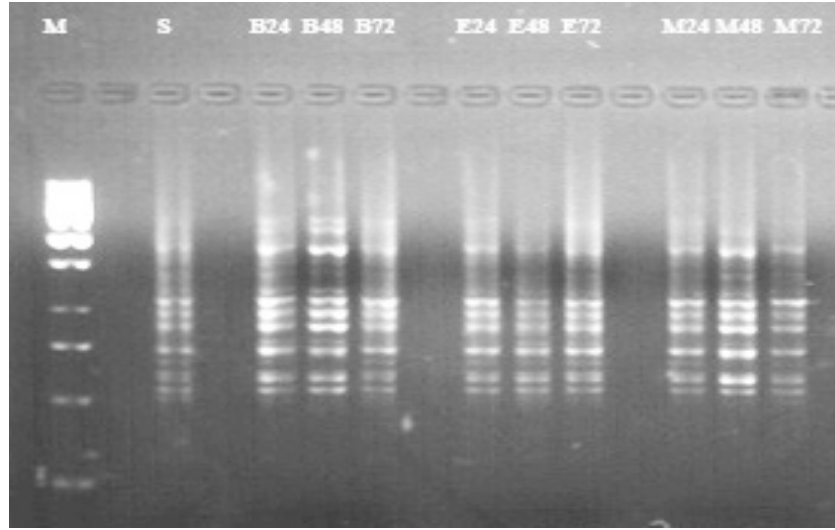
**Çizelge 3. 9.** 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının P19 primeri ile oluşturulmuş RAPD bantlarının LabImage 1D 2006 1D Gel Analysis Software programı ile saptanmış moleküler ağırlıkları

B[a]P' nin 24 saatlik uygulamasında spontanda bulunan bantların değişme olmadan korunmuş olduğu gözlenmiştir. B[a]P' nin 48 saatlik uygulamasında 1650 moleküler ağırlıklı bandın kaybolduğu ve 1800, 787, 715, 634, 576 ve 356 moleküler ağırlıklı yeni bantların oluştuğu tespit edilmiştir. B[a]P' nin 72 saatlik uygulamasında 787 ve 331 moleküler ağırlıklı yeni bantların oluştuğu saptanmıştır. B[a]P' nin 48 ve 72 saatlik uygulamalarında 1435, 1304 ve 1050 moleküler ağırlıklı bantların yoğunluklarının arttığı saptanmıştır.

EMS 'nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarında 787 ve 331 moleküler ağırlıklı bantların oluştuğu tespit edilmiştir. EMS 'nin 72 saatlik uygulamasında sadece 787 moleküler ağırlıklı bandın oluştuğu belirlenmiştir. EMS 'nin 24 ve 72 saatlik uygulamalarında 1304 moleküler ağırlıklı bandın yoğunluğunda atma gözlenmiştir.

MMC 'nin 24 saatlik uygulamasında spontanda bulunan bantların değişme olmadan korunmuş olduğu belirlenmiştir. MMC 'nin 48 saatlik uygulamasında 1650 moleküler ağırlıklı bandın kaybolduğu, 356 moleküler ağırlıklı yeni bir bandın oluştuğu ve 1050 moleküler ağırlıklı bandın yoğunluğunda azalma olduğu saptanmıştır. MMC 'nin 72 saatlik uygulamasında spontanda bulunan bantlara ek olarak 787 ve 331 moleküler ağırlıklı bantların oluştuğu belirlenmiştir. MMC 'nin 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalarında 1304 moleküler ağırlıklı bandın yoğunluğunda atma gözlenmiştir.

**ID10 Sonuçları:** RAPD işlemini sonucu oluşan bant profilleri Şekil 3.11' de ve moleküler ağırlıkları Çizelge 3. 10' da gösterilmiştir.



**Şekil 3. 11.** 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının ID10 primeri ile oluşturulmuş RAPD bant profili

B.S.	Marker (1kb)	S	B24	B48	B72	E24	E48	E72	M24	M48	M72
1	4.000	-	2454	2454	2454	2454	-	2454	2454	-	2454
2	3.000	-	2254	2254	-	-	-	-	-	-	-
3	2.500	-	-	-	-	-	-	-	-	1506	-
4	2.000	<b>1984</b>	<b>1984</b>	<b>1984</b>	<b>1984</b>	<b>1984</b>	<b>1984</b>	<b>1984</b>	<b>1984</b>	<b>1984</b>	<b>1984</b>
5	1.500	<b>1326</b>	<b>1326</b>	<b>1326</b>	<b>1326</b>	<b>1326</b>	<b>1326</b>	<b>1326</b>	<b>1326</b>	<b>1326</b>	<b>1326</b>
6	1.000	<b>1218</b>	<b>1218</b>	<b>1218</b>	<b>1218</b>	<b>1218</b>	<b>1218</b>	<b>1218</b>	<b>1218</b>	<b>1218</b>	<b>1218</b>
7	750	<b>1095</b>	<b>1095</b>	<b>1095</b>	<b>1095</b>	<b>1095</b>	<b>1095</b>	<b>1095</b>	<b>1095</b>	<b>1095</b>	<b>1095</b>
8	500	<b>985</b>	<b>985</b>	<b>985</b>	<b>985</b>	<b>985</b>	<b>985</b>	<b>985</b>	<b>985</b>	<b>985</b>	<b>985</b>
9	250	<b>796</b>	<b>796</b>	<b>796</b>	<b>796</b>	<b>796</b>	<b>796</b>	<b>796</b>	<b>796</b>	<b>796</b>	<b>796</b>
10		<b>630</b>	<b>630</b>	<b>630</b>	<b>630</b>	<b>630</b>	<b>630</b>	<b>630</b>	<b>630</b>	<b>630</b>	<b>630</b>
11		<b>555</b>	<b>555</b>	<b>555</b>	<b>555</b>	<b>555</b>	<b>555</b>	<b>555</b>	<b>555</b>	<b>555</b>	<b>555</b>

**Çizelge 3. 10.** 24, 48 ve 72 saat B[a] P, EMS ve MMC uygulanmış lenfosit DNA'sının PID10 primeri ile oluşturulmuş RAPD bantlarının LabImage 1D 2006 1D Gel Analysis Software programı ile saptanmış moleküler ağırlıkları.

B[a]P' nin 24 ve 48 saatlik uygulamalarında spontanda bulunan bantlara ek olarak 2454 ve 2254 moleküler ağırlıklı bantlar olduğu gözlenmiştir. B[a]P' nin 72, EMS 'nin 24, MMC 'nin 24 ve MMC 'nin 72 saatlik uygulamalarında 2254 moleküler ağırlıklı bandın olduğu tespit edilmiştir. EMS 'nin 48 saatlik uygulamasında herhangi bir değişme saptanmamıştır. MMC 'nin 48 saatlik uygulanmasında 1506 moleküler ağırlıklı bant olduğu belirlenmiştir.

#### 4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Teknolojinin gelişmesiyle tüm canlılar günlük yaşamda sık sık doğal ya da yapay kimyasal maddelerle yüz yüze gelmektedir. İnsan popülasyonunu çevredeki kanserojen ve mutajen maddelerin etkisinden korunması için bu özelliğe sahip bileşiklerin tespit edilmesi ve etkilerinin değerlendirilmesi gereklidir (Maron ve ark.1983; Debnath ve ark.1991).

Bazı genotoksik ajanlar sadece genomun bütünlüğüne zarar vermez aynı zamanda DNA' nın ifadesini doğrudan ya da dolaylı olarak etkileyebilir. Bu etkiler farklı tipteki tümörlerin oranında bir artışa neden olabilir. Uzun dönemli etkileşim ise, maruz bırakılan popülasyonların genetik materyalinde değişimlere sebep olabilir ( Zhiyi ve Haowen 2004).

Genotoksik ya da mutajenik etkiyi araştıran çeşitli test yöntemleri vardır. Bilimsel alandaki gelişmeler sayesinde son birkaç yılda, moleküler alanda hücresel ya da bireysel düzeyde çok sayıda biomarker geliştirildi. Bunlardan biri RAPD tekniğidir. Dolayısıyla bu alanda yapılan çalışmalara da yeni bir perspektif oluşturmuştur.

RAPD yöntemi nokta mutasyonları, kromozomların yeniden düzenlenmesi, delesyon ve insersiyon gibi moleküler olayları içeren genomik değişiklikleri belirlemede kullanılabilir (Atienzar ve Jha 2006).

Zhiyi ve arkadaşları (2004) Zebra balığı olan *Danio rerio* nun genotoksik kimyasal olan siklofosfamid'e maruz bırakılmasını içeren çalışmalarında RAPD metodunu kullanılarak farklılıkları tesbit etmişlerdir. Maddeye maruz bırakılmadan önce test gruplarında 4 stabil bant gösterilmiştir. Fakat siklofosfamide maruziyetten sonra polimorfizm sonunda stabil bantlardan bazılarının kaybolduğu tesbit edilmiştir. Ayrıca kontrol grupları ve uygulama grupları karşılaştırıldığında bant örneklerinde farklı uzaklıklar gözlenmiştir (Zhiyi 2004).

Çevresel kirleticiler yaşayan organizmalarda zararlı etkilere sebep olabilirler. Conte ve arkadaşlarının (1998) yaptığı çalışmada *Arabidopsis thaliana* bitkisinde ağır metallerin genotoksik etkilerini değerlendirmek için PCR temelli 'moleküler parmakizi' sistemi uygulanmıştır. Ağır metallere maruz bırakılan

bitkilerle bırakılmayan bitkiler karşılaştırıldığında, maruz bırakılan bitkide maruz bırakılmayan bitkide gözlenemeyen polimorfik bantlarla karşılaşmıştır. Maddeye maruz bırakılan ve bırakılmayan bitki genomlarının karşılaştırılması, RAPD analizinin çevresel kirleticilerin yaşayan organizmaların DNA larını nasıl modifiye ettiğini değerlendirmede kullanılabileceğini göstermiştir (Conte ve ark.1998).

Çalışmamızda Benzo [a] piren, mitomisin-C(MMC) ve etil methansulfonat (EMS) maddelerinin insan periferel lenfositlerinde DNA hasar ve mutasyon oluşturup oluşturmadığı, RAPD tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Literatür taraması yapıldığında, RAPD tekniğinin insan lenfosit hücrelerinde genotoksosite çalışmalarında daha önce kullanılmadığı görülmüştür. Yapılan bu çalışmanın, daha sonra yapılacak araştırmalar için başlangıç adımı olduğu düşünülmektedir.

RAPD' ler bazı "belirleyici" RAPD bantlarının varlık/yokluk vasıtasıyla ayırıcı marker olarak yaygın olarak kullanılır. Ayrıca, endokrin bozucular, benzo[a]piren, mitomisin –C, Cu ve UV radyasyonunu içeren çeşitli bileşiklerin genotoksik tanısı için ekotoksikolojide başarılı bir şekilde kullanılır (Wolf ve ark. 2004).

Çeşitli endüstriyel ürünlerde ve kömür katranında bulunan benzo [a] piren günümüzde çok etkili karsinojenik bileşiklerden biri olarak bilinmektedir ve olarak sigara dumanı ve otomobil eksoz gazı bileşiklerde çok yaygın olarak bulunmaktadır.

RAPD' nin potansiyelini değerlendirmek için Atienzar ve arkadaşlarının (2006) yaptığı bir çalışmada *Daphnia magna* B[a]P 'e maruz bırakılmıştır. 25 ve 50  $\mu\text{g l}^{-1}$  B[a]P dozları sırayla 6 ve 7 gün bireylere uygulanmıştır. Ölüm oranı her iki deney için günlük olarak kaydedilmiştir ve genomik DNA hergün izole edilerek RAPD deneyi gerçekleştirilmiştir. 25 ve 50  $\mu\text{g l}^{-1}$  B[a]P ye maruz bırakılan *Daphnia magna* 'dan oluşturulan RAPD profillerindeki başlıca değişikliklerin bant yoğunluğundaki azalış/artış olduğu saptanmıştır. RAPD örneklerinde meydana gelen değişikliklerin çoğu B[a]P kaynaklı DNA hasar (B[a]P DNA adductlar, DNA kırıkları) ve mutasyonlar (nokta mutasyonları ve yeni düzenlemeler) dir. Kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında 50  $\mu\text{g l}^{-1}$  B[a]P



maruziyette bant yoğunluğunun arttığı,  $25 \mu\text{g l}^{-1}$  B[a]P maruziyette bant yoğunluğunun azaldığı kaydedilmiştir (Atienzar ve Jha 2006).

Çalışmamızda B[ $\alpha$ ]P' i  $15 \mu\text{g/ml}$  dozu için insan periferal lenfositlerinde 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalar yapılmıştır. Çalışılan 10 primerden elde edilen RAPD profillerinde B[ $\alpha$ ]P' nin bant kaybına neden olduğu, yeni bant oluşturduğu ve bant yoğunluğunda artış/azalış meydana getirdiğini tespit edilmiştir.

Etil methansulfonat (EMS) mutajenik, teratojenik ve karsinojenik organik bileşiktir. DNA iplik kırılmaları ve depürinasyonlarla lezyonlara sebep olur (Patra ve ark. 2005).

İlaçları içeren genotoksik ajanlar genetik materyalin bütünlüğünü etkileyebilir ve DNA ifadesini direk ya da indirek olarak bozabilir. Noel ve arkadaşları (2006) aday ilacın genotoksitesini değerlendirmek için RAPD tekniğini kullanmışlardır. Çalışmada *Swiss mice* (*Mus musculus*) lar EMS' ye maruz bırakılmıştır. RAPD profillerine bakıldığında, genetik hasarlar EMS' ye maruz bırakılmış hayvanlarda belirlenmiştir. RAPD aday ilaçların genotoksik etkilerini değerlendirmek için bütün genomu taramada kullanışlıdır. Profiller genomik DNA kullanılarak oluşturularak EMS uygulama öncesi ve sonrası karaciğerden izole edilmiştir. Genetik hasarlar muamele öncesi ve sonrası profiller karşılaştırıldığında gözlemlenmiştir. Yapılan çalışma RAPD analizinin aday ilaçların klinik öncesi genotoksik etkilerini değerlendirmede yararlı olabileceğini göstermektedir (Noel 2006).

Noel ve arkadaşları EMS' nin genotoksik etkilerini değerlendirmek için yaptıkları çalışmada RAPD profillerinde farklılıklar gözlemişlerdir. Muamele sonrası karaciğer, kan ve kemik iliği DNA örneklerinin RAPD profillerinde bant yoğunluğunda artış/azalış ve yeni bantların varlığı/yokluğu gibi farklılıklar tespit edilmiştir.

Çalışmamızda EMS  $0.1 \mu\text{l/ml}$  dozu için insan periferal lenfositlerinde 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalar yapılmıştır. Çalışılan 10 primerden elde ettiğimiz RAPD profillerinde EMS' nin bant kaybına neden olduğu, yeni bant oluşturduğu ve bant yoğunluğunda artış/azalış meydana getirdiğini tespit edilmiştir.

Mitomisin-C (MMC) sıklıkla kanser tedavisinde güçlü antikanser ajanı olarak kullanılır ve ikincil kanser oluşturan mutajenik ve /veya karsinojenik özelliklere sahiptir (Niikawa ve ark. 2007).

Becerill ve arkadaşlarının (1999) yaptıkları bir çalışmada, balık hücreleri mitomisin-C (MMC)' ye maruz bırakılmıştır. Kontrol grupları ve deney grupları arasındaki farklar RAPD tekniği kullanılarak gösterilmiştir. MMC 'ye maruz bırakılan balıkların RAPD profillerinde yeni bantların varlığı ve kontrol grubundaki bazı bantların yokluğu belirlenmiştir (Becerill 1999).

Çalışmamızda Mitomisin-C 0.5 µg/ml dozu için insan periferik lenfositlerinde 24, 48 ve 72 saatlik uygulamalar yapılmıştır. Çalışılan 10 primerden elde ettiğimiz RAPD profillerinde MMC' nin özellikle yeni bant oluşturduğu ve bant yoğunluğunda artış/azalış meydana getirdiğini ve daha az bant kaybına neden olduğunu tespit edilmiştir.

MMC 'nin RAPD profilleri incelendiğinde EMS ve B[a]P 'ne göre daha fazla etkili olup, yeni bant oluşturma sayısının fazla olduğu tespit edilmiştir.

Deneysel çalışmalarımız sonucu elde ettiğimiz bulgulara göre, B[a]P, EMS ve MMC' nin bant sayısındaki artış/azalış ve bant yoğunluğundaki artış/azalış gibi etkilerle, insan hücrelerinde DNA hasar ve mutasyona sebep olabildiği tespit edilmiştir. Yapılan çalışma mutajenik etkileri bilinen bu üç madde için başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Dolayısıyla bu test yöntemi insan lenfositlerinde diğer maddeler için de etkin bir şekilde uygulanabilir.

## KAYNAKLAR

- Akman, M., Bakteri Genetiği, Cumhuriyet Üniversitesi Yayını, 2. Baskı, Sivas (1983).
- Albanesi, T., Polani, S., Cozzi, R. ve Perticone, P. (1998), *DNA strand methylation and sister chromatid exchanges in mammalian cells in vitro*, Mutat. Res., **429**, 239-248
- Albertini, R.J., Anderson, D., Doulgas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A. (2000), *IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogen in humans*, Mutat. Res., **463**, 111-172.
- Anders, M.W. ve Dekant, W. (1994), *Conjugation-dependent carcinogenicity and toxicity of foreign compounds*, Adv. Pharmacol, **27**, 511-519.
- Ateş, A. (2002), Moleküler Biyoloji, Selçuk Üniversitesi, 97–133.
- Atienzar, F.A., Jha, A.N. (2006), *The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review*, Mutation Research **613**, 76-102.
- Bağcı, H. (1985), *Yaz Okulu Moleküler Biyoloji Ders Notları*, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, 25–55.
- Bağcı, H. (1989), *Comparisons of the Promutagen-Actvity Capacity of S9 Liver Preparation From Rat and Fish, Using the in Vitro Salmonella Mutagenicity Test*, Mutation Research, 195–201.
- Barquinero, J.F., Barrious, L., Caballin, M.R., Miro, R. ve Ribas, A. (1993), *Cytogenetic analysis of lymphocytes from hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation*, Mutat. Res., **286**, 275-279.
- Başaran, N. (1983), *Tıbbi Genetik*, Anadolu Üniversitesi Basımevi, 152-168, Eskişehir.

- Becerril, C., Acevedo, H., Ferrero, M., Sanz, F., ve Castano, A. (2001), *DNA fingerprinting comparison of Rainboe Trout and RTG-2 line using random amplified polymorphic DNA*, *Ecotoxicology*, **10**, 115-124.
- Becerril, C., Ferrero, M., Sanz, F., Castano, A. (1999), *Detection of mitomycin C-induced genetic damage in fish cells by use of RAPD*, *Mutagenesis*, Vol.14,No: 5, pp.449-456.
- Bolzan, A.D. ve Bianchi, M.S. (2000), *Genetokxicity of Streptonigrin*, *Areview, Mutation Research*, **488**, 25–37.
- Bökesoy, A., Akıcı, İ., Melli, M., (2000), *Genel Farmakoloji ve Toksikoloji*, Ankara, 86-101.
- Caetano-Anolles ve Gresshoff P.M. (1994), *DNA amplification fingerprinting: A general tool with applications in breeding idendification and phylogenetic analysis of plants*. *Moleküler Ecology and Evulation : Approaches and Applications Switzerland*, 17-31.
- Calleja, F., Jansen, J.G., Vrieling, H., Laval, F. ve Vanzeeland, A. A. (1999), *Modulation of the toxic and mutagenic effects induced by methyl methanesulfonate in Chinese hamster ovary cells by overexpression of the rat N-alkylpurine-DNA glycosylase*, *Mutat. Res.*, **425**, 185-194.
- Cariello, N.F. ve Piegorsch, W.W. (1996), *The Ames Test: The Two-Fold Rulo Revisited*, *Mutation Research*, 369, 23-31.
- Debnath, A.K.,Compadre, R.L., Debnath, G., Shusterman, A.J ve Hansch, G. (1991), *Strure-Activity Relationship of Mutagenic Aromatic and Heteroaromatic Nitro Compounds Correletion Molecular with Orbital Energies and Hydrophobicity*, *Journal of Medicinal Chemistry*, **34(2)**, 786-797.
- Demirsoy, A. (1992), *Yaşamın Temel Kuralları*, Genel Biyoloji, 1(1), Ankara.
- Dökmeci, I. (1994), *Akut Zehirlenmelerinde Tanı ve Tedavi*, *Toksikoloji*, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 547-588.
- Dilsiz, N. (2004), *Moleküler Biyoloji*, Ankara, 61-70

- Emerit, I., Khan, S.H. ve Cerutti, P. (1985), *Treatment of lymphocyte cultures with hypoxanthine-xanthine oxidase system induces the formation of transferable clastogenic material*, Free Radical Biol. Med., **1**, 51-57
- Erkan, S. (1992), *Moleküler Biyoloji*, Bornova/İzmir.
- Erlich H.A., Gelfand D. VE Sninsky I. (1991), *Recent advances in the polymerase chain reaction*, Science, 252, 1643-1650.
- Fender, H. ve Wolf, G. (1998), *Cytogenetic investigations in employees from waste disposal sites*, Toxicology Letters, **96**, 149–154.
- Fenech, M. (2000), *the in vitro micronucleus technique*, Mutation Research, Fund. Mol. Mec. Mut., **455**, 81-95.
- Fram, R.J. (1992), *Cisplatin and platinum analogues: recent advances*, Curr. Opin. Oncol., **4**, 1073-1079.
- French, C.T., Ros, C.D., Keysar, S.B., Joshi, D.D., Lim, C., Fox, M.H. (2006), *Comparison of mutagenic potential of 17 physical and chemical agent analyzed by the flow cytometry mutation assay*, Mutation Research, **602**, 14-25.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C. ve Siede, W. (1995), *DNA repair and mutagenesis*, ASM Press, Washington, D.C., USA.
- Gatehouse, D.G., Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. ve Foster, R. (1990), *Bacterial mutation assay, Basic mutagenicity Ukems recommended procedures* (Ed:Kirkland, D.J.), The Bath Press, Avon, Great Britain, UK.
- Gollapudi, B. B., Jackson, K. M. ve Stott, W. T. (1998), *Hepatic lac I and cII mutation in transgenic (lambdaLIZ) rats treated with dimethylnitrosamine*, Mutat. Res., **419**, 131-135.
- Gomez-Arroyo, S., Diaz-Sanchez, Y., Meneses-Perez, M.A., Villalobos-Pietrini, R. ve Leon-Rodriguez, J.(2000), *Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides*, Mutat. Res., **466**, 117-124.

- Griffits, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. ve Gelbart, W.M. (1996), *An introduction to genetic analysis*, W.H. Freeman and Company, New York, USA.
- Groopman, J.D. ve Cain, L.G. (1990), *Interactions of plant toxins with DNA: aflotoxins, sterigmacystin, safrole, cycasin and pyrrolizidine alkaloids, Chemical carcinogenesis and mutagenesis I* (Ed: Cooper, C.S., Grover, P.L.), Springer-Verlag, KG, Berlin.
- Güven, K. (1999), *Biyokimyasal ve moleküler toksikoloji*, Dicle Üniversitesi Basımevi, Diyarbakır.
- Hayes, A.W. (2001), *Principles of Methods of Toxicology*, Fourth Edition
- Harris, S.A. (1999), *RAPDs in systematics-a useful methodology*, In *Molecular Systematics and Plant Evolution*. Hollingsworth, P.M., Bateman, R.m., Gornall, R.J. edited, Taylor and Francis, London, 211-228.
- Innis, M. A., ve Gelfand, D.H. (1990), *in PCR protocols: A Guide to methods and Applications*, Academic press, San Diego, pp. 3-11.
- Kalkan, N. (1996), *Ames Test Yöntemi ile Dört Ayrı Sentetik Quinoxalin Türevinin Farklı Türevinin Farklı Dozlardaki Mutajenik Aktivitesinin ve Mutajenliğinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- Kayaalp, O. (1995), *Tıbbi Farmakoloji*, Hacettepe Taş Yayınları, Ankara.
- Klug, W.S., Cummings, M.R. (2003), *Genetik Kavramlar*, Çeviri Editörü: Prof. Dr. Cihan Öner, Palme Yayıncılık, 268-271.
- Kumar, R. (1989), *The Technique of polymerase chain reaction, Technique, Tercnique a journal of methods in Cell and Molecular Biology*, 1No:3, pp:133-153.
- Lee, H., Bian, S.S. ve Chen, Y.L. (1994), *Genotoxicity of 1, 3-dithiane and 1,4-dithiane in the CHO/SEC Assay and the Salmonella / Mikrosomal Test*, *Mutat. Res.*, **312**, 213-218.
- Loeb, L.A. ve Preston, B.D. (1986), *Mutagenesis by apurinic/aprimidinic sites*, *Annu. Rev. Genet.*, **20**, 201-230.
- Maniatis, T., Sambrook, J. ve Fritchi, F.F. (1989), *In molecular cloning a laboratory manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor.

- Maron, D.R. ve Ames, B.N. (1983), *Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test*, Mutation Research, **113**, 173-215.
- Mclean, O. (1994), Mapping plant genomes with molecular markers.
- Miller, J.A. ve Surh, Y.J. (1994), *Historical perspectives on conjugation dependent bioactivation of foreign compounds*, Adv. Pharmacol., **27**, 1-16.
- Monarcha, S., Feretti, D., Zanardini, A., Moretti, M., Villarini, M., Spiegelharder, B., Zerbini, I., Gelatti, U. ve Lebbolo, E. (2001), *Monitoring airborne genotoxicants in the rubber industry using genotoxicity tests and chemical analyses*, Mutat. Res., **490**, 159-169.
- Mullis, K., B. ve Faloona, F. A. (1987), Specific synthesis of DNA in vitro via a Polymerase catalyzed chain reaction. Meth. Enzymol, **15**, 335-350.
- Niikawa, M., Shin, S., Nagase, H. (2007), *Suppressive effect of –or pre- treatment of aspirin metabolite on mitomycin C-induced genotoxicity using the somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster*, Biomedicine&Pharmacotherapy, **61**, 113-119.
- Oberly T., Younch D., Garriott M.(1997), *A comparison of the soft agar and microtitre methodologies for the L5178Y TK+/- mouse lymphoma assay*;Mutation Research 3888:59-66.
- Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T. ve Shinagausa, H. (1985), *Evaluation of the new system (umu test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens*, Mut. Res., **147**, 219-229.
- Oraller, G. (1990), *Genetik*, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi, 125–177, İstanbul.
- Ostling, O. ve Johanson, K. J. (1984), *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **123**, 291-298.
- Pai, C.A. (1985), *Foundation of genetics. A science for society*, Kefford Press, Singapur.
- Palumbi, S.R. (1996), *The polymerase chain reaction in molecular systematics*, Nucleic Acids II, Second II, Sunderland USA.

- Patra, J., Sahoo, M.K., Panda, B.B. (2005), Salicylic acid triggers genotoxic adaptation to methyl mercuric chloride and ethyl methane sulfonate, but not to maleic hydrazide in root meristem cells of *Allium cepa* L., *Mutation Research*, 581, 173-180.
- Probhu, R., Jensen, H., Webb, D., Luk, S., Smith, S., ve Gresshoff, P.M. (1996), *Genetic relatedness among soybean lines revealed by DNA amplification fingerprinting, FFLP, and pedigree data*, *Crop Sci.*(in publication).
- Poersch, A., Santos, F.V., Maciel, M.A.M., Camara, J.K.P., Dantos, T.N.C., Colus, I.M.S. (2007), *Protective effect of DCTN(trans- dehydrocrotonin ) against induction of micronuclei and apoptosis by different mutagenic agents in vitro*, *Mutation Research*, **629**, 14-23.
- Quillerdet, P. ve Hofnung, M. (1985), *The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins:procedures*, *Mutat. Res.*, **147**, 65-78.
- Rafalski, J.A., VE Tingey, S.V. (1993), *Genetic diagnostic in plant breeding: RAPDs, microsatellit and machines*. Review, **9(8)** : 275-279.
- Roberts, J.J. (1978), *The repair of DNA modified by cytotoxic mutagenic and carcinogenic chemicals*, *Adv. Radiat. Biol.*, **7**, 211-435.
- Russell, P.J. (1998), *Genetics*, The Benjamin-Cummings publishing company, inc., Canada, USA.
- Sage, E. (1993), *Distribution and repair of photolesions in DNA genetic consequences and the role of sequence context*, *Photochem. Photobiol.*, **57**, 163-174.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn G. T., Erlich, H.A. ve Arnheim, N. (1985), *Enzymatic amplification of beta- globulin Genomic sequences ve restriction site analysis for diagnosis of sickle anemia*, *Science*, **230**, pp.1350-1354.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T ., Mullis VE Erlich, H.A. (1988), *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*, *Science*, **239**,487-491.



- Saghai Maroof, M.A., Biyashev, R.B., Yang, G.P., Zhang, Q., Allard, R.V. (1994), *Extra ordinarily polimorphic microsatellite DNA barley spscies diversty, chromozal location*, Genome, 37, pp.794-801.
- Saleh, K. (1997), *Mikronükleus Testi ile bazı Kimyasal maddelerden ve Çevre Kirleticilerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye.
- Savva, D. (1996), *Use of DNA fingerprinting to detect genotoxic effect*, Ecotoxicology and Environmental Safety 41, 103-106.
- Schneider, M., Quistad, G.B. ve Casida, J.E. (1999), *Gulutathione activation of chloropicrin in the salmonella mutagenicity test*, Mutant, Res., 439, 233-238.
- Sengstag, C., Mörbe, J.L., Weibel, B. (1999), *Codon 249 of the human TP53 tumor suppressor gene is no hot spot for aflatoxin B1 in a heterologous background*, Mutation Research 430, 131-144
- Singh, N.P., Mccoy, M.T., Tice, R.R. ve Schneider, E.L. (1988), *A simple technique for quantitation of low livils of DNA damage in individual cells*. Experimental Cell research, 175, 184-191.
- Şahin, Y. (1995), *Genel Biyoloji II.*, Bilim teknik Yayınevi, 334-349.
- Tatlı, A. (1992), *Evrin ve Yaratılış*, Damla Matbabacılık, 95-107, Konya.
- Tautz, D., ve Sclötter, C. (1994), *Curr.Opin.Genet.*, 4, 832.
- Temizkan, G.O. (1996), *Moleküler Genetik*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, 281.
- Triglia, T., Peterson, M.G. ve Kemp, D.J. (1988), *A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences*, Nucleic Acids Res., 16, 8186.
- Turner, P.C., Mclennan, A.G., Bates, A.D., White, M.R.H. (2004), *Moleküler Biyoloji*, 89-99
- Vijalaxami, R.R. ve Tice, G.H.S. (1992), *Assesment of radition-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique*, Mutat.Res., 271, 243-252.
- Vural, N. (1984), *Toksikoloji*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fak. Yayınları, 73, 32-124.

- Watson, J.D., Gilman, M., Witowski, J., Zoller, M., *Recombinant DNA*.  
Second Edition, (1997).
- Waugh, R. ve Powell, W. (1992), *Using RAPD markers for crop  
improvement*, Focus, **101**,186-191.
- Williams, J.G.K.,Hafaney, M.K., Rafalsky, J.A. ve Tingey, S.V. (1993),  
*Genetic analysis using RAPD markers*, Methods in Enzimology,  
**218**, 704-740.
- Wolf, H.D., Blust, R., Backelijau, T. (2004), *The use of RAPD in ecotoxicology*,  
Mutation Research **566**, 249-262.
- Zhiyi, R., Haowen, Y. (2004), *A method for geotoxicity detection using  
random amplified polymorphism DNA with Danio reio*, Ecotoxicology  
and Environmental Safety, **58**, 96-103.