

**BAZI TRİMETHOPRİM TÜREVLERİNİN  
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN  
CBMN TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Devrim GÜZEL  
Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı  
Ağustos, 2008

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

**Devrim GÜZEL**'in “**Bazı Trimethoprim türevlerinin genotoksik etkilerinin CBMN testi ile araştırılması**” başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki Yüksek Lisans tezi 30.07.2008 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	<b>Adı-Soyadı</b>	<b>İmza</b>
Üye (Tez Danışmanı)	<b>: Doç. Dr. BERRİN TÜYLÜ</b>	.....
Üye	<b>: Doç. Dr. KADRIYE BENKLİ</b>	.....
Üye	<b>: Yard. Doç. Dr. A. TANSU KOPARAL</b>	.....

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

**Enstitü Müdürü**

**ÖZET****Yüksek Lisans Tezi****BAZI TRİMETHOPRİM TÜREVLERİNİN  
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN CBMN TESTİ  
İLE  
ARAŞTIRILMASI****Devrim GÜZEL****Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı****Danışman: Doç. Dr. Berrin TÜYLÜ  
2008, 63 sayfa**

Genetik hasarın bir göstergesi olan mikronükleusun belirlenmesinde son yıllarda en çok tercih edilen yöntem CBMN (sitokinezi engellenmiş mikronükleus) tekniğidir.

Bu tez çalışmasında, bazı trimethoprim ve türevlerinin genotoksik aktivitesi, insan periferel kan lenfositlerinde *in vitro* CBMN tekniği ile araştırılmıştır. Periferel kan örnekleri sigara içmeyen sağlıklı iki erkek bireyden alınmış ve lenfosit kültürleri 24 ve 48 saatlik sürelerde maddelerin 50 ve 25 µg/ml' lik dozlarıyla muamele edilmiştir. Bu maddelerin insan kan lenfositlerinde meydana getirdiği mikronükleus (mn) frekansları tespit edilmiş ve CPI (hücre) değerleri hesaplanmıştır.

Elde edilen verilere göre, trimethoprim ve türevlerinin uygulanan dozlara ve süreye bağlı olarak mikronükleus frekansında önemli bir artışa sebep olduğu, CPI değerlerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir artışa yol açmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan test maddelerinin insan kan lenfositlerinde *in vitro* CBMN tekniğine göre, genotoksik etkili oldukları, ancak hücre bölünmesi üzerinde önemli bir azalışa neden olmadıkları söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Trimethoprim, Micronucleus, CBMN, Genotoksisite, İnsan lenfositleri

**ABSTRACT****Master of Science Thesis****GENOTOXIC ACTIVITY OF SOME TRIMETHOPRIM  
DIFFERENTIATIONS WITH CBMN TEST  
STUDIES****Devrim GÜZEL****Anadolu University****Graduate School of Sciences****Biology Program****Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Berrin TÜYLÜ****2008, 63 pages**

In recently, CBMN (cytokinesis-blocked micronucleus) technique has been extensively preferred for detecting micronucleus which is a biomarker of genetic damage.

In this study, genotoxic activity of some trimethoprim differentiations were investigated with *in vitro* CBMN technique in peripheral blood lymphocyte. Peripheral blood samples were obtained and cultured from two healthy non-smoking male individuals. Lymphocyte cultures were treated for the last 24 and 48 h with 50 ve 25 µg/ml material doses. MN (micronucleus) frequency which was created by test materials in peripheral blood lymphocyte was analyzed. CPI ( cell ) values was calculated.

According to the values, trimethoprim differentiations caused a significant dose and time-dependent increase in MN frequency. CPI values didn't cause a statistical meaningfulness in lymphocytes.

In conclusion, We can say that these materials which were used this study have genotoxic effects with *in vitro* CBMN technique in human peripheral blood lymphocytes; but didn't cause an important decrease on cell division.

**Key Words:** Trimethoprim, Micronuclei, CBMN, Genotoxicity, Human Lymphocytes

## TEŞEKKÜR

Öncelikle, tez çalışma konumun belirlenmesi ve tez çalışmam boyunca değerli bilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve beni yönlendiren danışman hocam Doç. Dr. Berrin TÜYLÜ' ye;

Çalışmamda kullandığım test maddelerini sağlayan Yard. Doç. Dr. Nesrin Beynek' e;

Deneysel çalışmalarım sırasında kan örneklerinin alınmasında yardımcı olan hocam Yrd. Doç. Dr. Emel ERGENE' ye ve kan veren arkadaşlara; deneysel çalışmalarımdeki katkılarından dolayı arkadaşım Tuba BÜYÜKÇOBAN' a ve bölümün tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan bölümdeki tüm hocalarıma;

Ayrıca yüksek lisans eğitimim boyunca her an varlığı, dostluğu ve desteğini hissettiğim sevgili arkadaşım Beklem BOSTANCIOĞLU' na; lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yardımlarıyla yanımda olan arkadaşım Caner AYDINLI' ya,

Ve özellikle tüm yaşamım ve eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Devrim GÜZEL

Ağustos, 2008

## 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>vi</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Mutasyonlar .....	3
1.1.1. Kromozom mutasyonları .....	4
1.1.1.1. Kromozom yapısındaki değişimler .....	4
1.1.1.2. Kromozom sayısındaki değişimler .....	6
1.1.2. Gen mutasyonları .....	7
1.2. Genotoksik etkili ajanlar .....	9
1.2.1. Fiziksel mutajenler .....	9
1.2.1.1. İyonize radyasyon .....	9
1.2.1.2. Non iyonize radyasyon .....	10
1.2.2. Kimyasal mutajenler .....	10
1.2.2.1. Baz analogları .....	11
1.2.2.2. Alkileyici ajanlar .....	11
1.2.2.3. İnterkale ajanlar .....	11
1.2.2.4. Hidroksile edici ajanlar .....	12
1.2.2.5. Diğer kimyasal ajanlar .....	12
1.2.2.6. Klastojenik ajanlar .....	13
1.2.2.7. Metabolik aktivasyon ile aktive olan ajanlar .....	13
1.3. Genetik Toksikoloji Testleri .....	14
1.3.1. Bakteriyal yöntemler .....	15
1.3.1.1. Ames (salmonella/mikrozom) testi .....	15
1.3.1.2. SOS (umu) testi .....	16

1.3.1.3. <i>E.coli</i> lac I mutasyon test sistemi.....	17
1.3.2. Sitogenetik yöntemler .....	17
1.3.2.1. Yapısal kromozom bozulma (CA) testi .....	17
1.3.2.2. Kardeş kromatid değişimi (SCE) testi.....	19
1.3.2.3. Mikronukleus (MN) testi .....	20
1.3.3. DNA' daki hasarı saptayan diğer yöntemler.....	23
1.3.3.1. Comet (single cell gel electrophoresis ) testi .....	23
1.3.3.2. Mouse lymphoma testi .....	24
1.3.3.3. HPRT gen mutasyon testi .....	25
1.3.3.4. Muta mouse / Big blue yöntemi.....	25
1.4. CBMN Tekniğiyle Yapılmış Çalışmalar .....	25
1.5. Trimethoprim.....	28
<b>2. MATERYAL VE METOD .....</b>	<b>29</b>
2.1. Materyal.....	29
2.1.1. Test maddeleri.....	29
2.1.2. Test maddelerinin genel kimyasal formülleri .....	29
2.1.3. Test maddelerinin dozları ve hazırlanışı .....	34
2.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler: .....	34
2.2. Metod.....	34
2.2.1. Lenfosit kültürü.....	34
2.2.2. Test maddelerinin uygulanması .....	35
2.2.3. Lenfositlerin izolasyonu.....	35
2.2.4. Preparatların hazırlanması .....	36
2.2.5. Preparatların boyanması.....	36
2.3. İstatistiksel Analiz .....	37
2.4. CPI'nın (Hücre Proliferasyon İndeksi) Saptanması .....	37
<b>3. BULGULAR .....</b>	<b>38</b>
<b>4.TARTIŞMA SONUÇ .....</b>	<b>49</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>54</b>

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

	<b><u>Sayfa</u></b>
2.1. 1 numaralı test maddesi.....	29
2.2. 2 numaralı test maddesi.....	30
2.3. 3 numaralı test maddesi.....	31
2.4. 4 numaralı test maddesi.....	32
2.5. 5 numaralı test maddesi.....	33
2.6. 6 numaralı test maddesi.....	33
3.1. Tek, iki ve dört çekirdekli hücreler .....	45
3.2. Üç çekirdekli hücre, tek çekirdekli ve iki çekirdekli hücreler .....	45
3.3. Dört çekirdekli hücre.....	46
3.4. İki ve dört çekirdekli hücreler .....	46
3.5. Bir mikronükleuslu binüklead (iki çekirdekli hücre) hücre .....	47
3.6. İki mikronükleuslu binüklead hücre .....	47
3.7. İki ve üç mikronükleuslu hücreler.....	48
3.8. Beş mikronükleuslu binüklead hücre .....	48



**ÇİZELGELER DİZİNİ**

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>3.1.</b> Trimethoprim'in CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN frekansı ve CPI sonuçları.....	39
<b>3.2.</b> Trimethoprim + Oksalik asit di hidrat' ın CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN frekansı ve CPI sonuçları.....	40
<b>3.3.</b> Trimethoprim + Maleik asit' in CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN frekansı ve CPI sonuçları.....	41
<b>3.4.</b> Trimethoprim + cis-1-2-sikloheksandikarboksilik asit'in CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN frekansı ve CPI sonuçları.....	42
<b>3.5.</b> Trimethoprim + Demir (III) Klorür hekza hidrat' ın CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN frekansı ve CPI sonuçları.....	43
<b>3.6.</b> Trimethoprim + Demir (III) Klorür hekza hidrat + Benzil'in CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN frekansı ve CPI sonuçları.....	44

**KISALTMALAR DİZİNİ**

Bn	: Binüklead hücre
CA	: Kromozom aberasyonu
Cyt-B	: Sitokalsin B
MMC	: Mitomisin C
MN	: Mikronükleus
SCE	: Kardeş kromatid değişimi
TMP	: Trimethoprim

## 1. GİRİŞ

Endüstriyel faaliyetlerle çevreye dağılan zararlı gazlar, ağır metaller, pestisitler, radyoaktif maddeler ve bunların dışında içki ve sigara kullanımı, beslenme gibi insan yaşam alışkanlıkları; ayrıca güneşin zararlı X, gama ışınları, ilaç endüstrisinin gelişimiyle birlikte her geçen gün piyasaya sürülen yeni ilaçların kullanımı ile çevresel ajanlar, insanlara doğrudan ya da dolaylı olarak zarar vermekte ve insanın genetik materyal bütünlüğünü tehdit etmektedir (Ocak ve ark., 2002; Akay, 2004; Kulaksız ve Sancar, 2007; Moller, 2005).

Genetik materyali tehdit eden ve mutajen olarak bilinen bu maddeler, fiziksel ya da kimyasal, doğal ya da yapay olabilen, DNA'nın yapısını ve düzenini değiştiren (Friedberg ve ark., 1995), direkt ya da dolaylı olarak DNA'yı hedefleyen, proteinlere bağlanan ve genomik değişikliğin sebebi olan ajanlardır (Decordier ve Kirsch-Volders, 2006).

DNA ile etkileşerek karsinogenik etki gösteren kimyasallara genotoksik karsinogenler denildiği bilinmektedir (Güley ve Vural, 1978). Çevredeki kimyasal mutajenlerin kaynakları o kadar çok ve çeşitlidir ki; bunları tespit etmek kaynağı bilinen zararlı çevresel faktörlerden korunmaktan daha da zor olabilmektedir (Bolsover ve ark., 1997).

Fiziksel ve kimyasal ajanlara maruziyetin en tehlikeli sonucu da kanserdir (Korkmaz ve Çolak, 2000; Kent, 1998). Kanser ve kimyasal ajanlara maruziyet arasındaki ilişki uzun bir süredir bilinmektedir. İlk olarak 1761'de Hill, tütün kullananlarda yüksek oranda nasal kanserin görüldüğüne; 1775'de bacalardan çıkan kimyasal gazların skrotum kanserini tetiklediğini öne süren Pott, sonraki 20 yılda da pipo kullanımının dudak kanseriyle ilişkili olduğuna işaret etmiştir. 1895'de Rehn ise anilin boyasının mesane tümörünü indüklediğini bulmuştur (Lu ve Kacew, 2002).

İnsan kanserlerinin %80'den fazlasının çevresel karsinogenik kimyasallarla ilişkili olduğu bilindiği için (Hoshi ve ark., 2004 ), kimyasalların mutajenite ve karsinogenitelerinin araştırılması insan sağlığı açısından çok önemlidir (Dökmeci, 1994; Güley ve Vural, 1978). Kansere neden olan ajanların çoğu mutajenik olduğundan ve mutasyonlar kanser oluşumunun başlamasıyla ilişkili olabileceğinden, birçok *in vitro* ve *in vivo* kısa süreli testler karsinogenik

kimyasalların önceden haber vericisi olarak kullanılmaktadır (Korkmaz ve Çolak, 2000). Bu testlerin önemi ve geçerliliği uluslararası işbirliği programıyla da belirlenmiştir (Karabay ve Oğuz, 2005).

Genetik toksikoloji disiplini 1960'ın sonlarında geliştirilmiş, 1980'lerde genotoksisite ve karsinojenite arasındaki ilişkinin insan sağlığı için ciddi bir tehdit olduğu görülmüş ve genotoksik ve nongenotoksik karsinojenlerin belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır (Castell ve Gomez-Lechon, 1997).

Kısa süreli genotoksisite testleri, kimyasal maddelerin bakterilerde mutajenik etkisini, hücrelerde değişmeye neden olup olmadığını, DNA değişim ve onarımı üzerindeki etkisini ve memelilerdeki mutajenik etkilerini araştırmak gibi çalışmaları kapsamaktadır (Güley ve Vural, 1978).

Sitogenetik testler kimyasal olarak kromozom yapı ve sayısındaki değişiklikleri belirlemek için kullanılmaktadırlar. Kimyasalların genotoksik etkilerini belirlemede kromozom aberasyon (CA), kardeş kromatid değişimi (SCE) ve kromozom hasarı sonucu oluşan mikronükleus (MN) testleri en çok kullanılan ve tercih edilen in vitro testler arasındadır (Barile, 1994).

İnsan periferel lenfositlerindeki CA (kromozom aberasyon), SCE (kardeş kromatid değişimi) ve MN (mikronükleus) oluşumu gibi sitogenetik değişimler, genotoksik karsinojenlerin erken etkileri ve genotoksik maruziyetin belirteçleri olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır (Norppa, 2004).

Modern ilaç sektörünün gelişimiyle birlikte, bakteriyal enfeksiyonları kontrol altına alan bileşiklerin keşfi başlamış, bu bileşikler çeşitli enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılmış ve kullanılmaktadır (Akalin, 1994). Bunlara ek olarak, fenolik ve metal tuzları gibi bir çok bileşiğin de enfeksiyon riskinin azaltılmasında kullanıldığı bilinmektedir (Dougherty ve Projan, 2003).

İlaç kampanyalarında, ilaçların gelişim basamakları süresince ve sonrasında oluşabilecek genotoksik etkilerin belirlenmesi için genotoksisite testleri yapılmakta olup (Rothfuss ve ark., 2006), EPA (Çevresel Koruma Programı)'nın çevresel risk değerlendirmesi kapsamında bu ürünlerin bilimsel kriterlere göre güvenilirliklerinin belirlenmesinden sonra piyasaya sürülmesine izin verilmektedir (Kent, 1998). Bu ilaçların ticari kullanımından önce genotoksisite testleriyle incelenmeleriyle ilgili dünya genelinde birçok düzenleyici

kuruluşa talimatlar verilmiştir. Genetik toksikoloji testlerinin sonuçları ilaçların geliştirilme süreci boyunca karsinogeniteleriyle ilgili bilgi için, ilaç değerlendirme ve araştırılması amacıyla FDA (besin ve ilaç yönetimi) merkezi tarafından kullanılmaktadır ( Snyder ve Gren, 2001).

Mikronükleus (MN) testi, çevresel kirleticilerle insan sağlığının direkt ya da dolaylı olarak tehdidini, genetik materyalde oluşacak hasarın frekansını belirlemeye olanak sağlayan (Norppa ve ark., 2003; Ulupınar ve ark., 2002) ve çok farklı hücre tiplerinde kolaylıkla uygulanabilen bir test olması nedeniyle diğer genotoksisite testleri arasında artan bir öneme sahiptir (Decordier ve Kirsch-Volders, 2006; Fenech, 1998).

MN testi ile mikronükleus frekansının belirlenmesi sadece genotoksik ajanlara maruziyeti belirlemekle kalmaz, aynı zamanda kanser tedavileri için de bir zemin oluşturur. Örneğin koruyucu bir ajan genotoksik hasara karşı etkili ise, kanserli hücrelerde MN sıklığında görülen bir azalış fark edilir ve tedavide bu durum önemli bir belirteç olarak etkili olur (Derafshani, 1997 ).

Bu çalışmada kullanılan test maddeleri, temelde bir antibiyotik olan Trimethoprim'e bazı bileşiklerin eklenmesiyle oluşturulmuş, trimethoprim türevli yeni sentezlenmiş bileşiklerdir. Bu maddelerle ilgili olarak yapılan literatür taraması sonucunda genotoksik etkiye yönelik bir çalışma olmadığı görülmüştür. Yeni sentezlenen maddelerin genotoksik etki yönünden araştırılmasında mikronükleus testinin sıklıkla kullanılıyor olması ise çalışmada MN tekniğinin seçilmesi konusunda destekleyici olmuştur. Bu kapsamda, Trimethoprim ve türevlerinin olası genotoksik etkilerinin CBMN tekniği ile araştırılması ve elde edilen bulguların türevler arasında karşılaştırılmasıyla, klastojenik etkiye yönelik bir değerlendirme yapılması amaçlanmıştır.

### **1.1. Mutasyonlar**

Mutasyon, mutajen denilen fiziksel veya kimyasal ajanlarla uyarılma sonucu (Sen ve Kar, 2005) veya kendiliğinden oluşan (Temizkan, 1999) genetik materyalde meydana gelen rastgele ve ani değişikliklerdir (Başaran,1999; Fairbanks ve Andersen, 1999; Griffiths ve ark., 1996). Mutasyonlar populyasyonda yeni allel meydana getirebildiği gibi var olan allellerin frekansını değiştirebilirler

(Sambamurty, 2005). Mutasyonun kendiliğinden meydana gelme olasılığı düşük olmasına karşın, mutajenlerin etkisiyle ortaya çıkan mutasyon frekansı oldukça yükselmektedir (Temizkan, 1994). Mutasyonlar, kromozom düzeyindeki mutasyonlar ve gen düzeyindeki gen veya nokta mutasyonları olmak üzere iki ana sınıfta incelenebilmektedir (Sambamurty, 2005; Pai, 1985; Russel, 1998).

### **1.1.1. Kromozom mutasyonları**

Kromozom aberasyonları da denilen kromozom mutasyonları, spontan olarak veya çeşitli kimyasal ajanlar ve radyasyon gibi mutajenlerce indüklenen, kromozomun yapı ve sayı değişimleridir. Ökaryotik kromozomlarda meydana gelen bu değişiklikler sitolojik olarak mayoz yada mitoz bölünme sırasında çeşitli boyama teknikleri kullanılarak tespit edilebilmektedir ( Russel, 1998; Mateuca ve ark., 2006).

#### **1.1.1.1. Kromozom yapısındaki değişimler**

##### a) Delesyon

Kromozomun bir segmentinin kaybı şeklinde meydana gelen mutasyonlardır. Delesyon, bir veya birkaç gende kırıklar sonucu oluşan kromozomdan kayıp şeklinde olmaktadır. Bu kırıklar; sıcaklık, radyasyon, virüsler, kimyasallar, transposibil elementler gibi ajanlarca oluşabilmektedir. Homozigos hücrelerdeki delesyonlar letal olabilmektedir (Russel, 1998; Fairbanks ve Andersen, 1999; Miglani, 2000). İnsanda 5. kromozomun kısa kolundaki delesyon sonucu oluşan “cri du chat” sendromu, bireyde fiziksel kusur ve zekâ geriliğine sebep olmaktadır (Temizkan, 1994). Ayrıca solid tümörlerde de delesyonlar olduğu bilinmektedir (Griffths ve ark., 1996).

## b) Duplikasyon

Bir kromozomun, bazı bölgeleri fazladan taşınması şeklinde meydana gelen değişimlerdir (Temizkan, 1994; Griffiths ve ark., 1996). Duplikasyon şeklindeki mutasyonlar multigen ailelerinin evriminde önemli bir role sahiptir. Örneğin; hemoglobin molekülü  $\alpha$  ve  $\beta$  globin polipeptit gibi 2 farklı alt ünitenin kopyasını içermektedir (Russel, 1998). Duplikasyona en iyi örnek, Drosophilada bar (çubuk) şeklindeki göz yapısının meydana gelmiş olmasıdır (Sambamurty, 2005; Griffiths ve ark., 1996). Bireysel duplikasyonlar gen transfer ve gen yapısı haritalarında kullanılmaktadır (Sen ve Kar, 2005).

## c) İnversiyon

Bir kromozomda 2 bölgede oluşan kırığın oluşturduğu segmentin  $180^\circ$  dönerek tekrar kromozoma ters şekilde yapışması şeklinde meydana gelen mutasyon tipine inversiyon mutasyon denilmektedir. Bu segment sentromer içeriyorsa “perisentrik inversiyon”, sentromer içermiyorsa “parasentrik inversiyon” adını alır (Sen ve Kar, 2005). Perisentrik inversiyonlar yeni karyotiplerin artmasını sağlarlar (Sambamurty, 2005). İnversiyon tipi mutasyonlar, homozigot halde öldürücü iken, heterozigot durumlarda fenotipe değişime yol açarlar. Homozigot inversiyonlu kromozomlu hücrelerde mayozda normal kromozom eşleşmesi olur (Temizkan, 1994).

## d) Translokasyon

Homolog olmayan kromozomlar arasında, kromozom segmentinin veya gen dizisinin pozisyonunda meydana gelen bir değişiklik olup, genetik materyalde bir kazanç ya da kayıp yoktur (Russel, 1998). Homolog kromozomlar arasında, bir kromozomdaki bir parçanın diğer kromozomdaki kırık bölgeye yapışması şeklinde “interkalar (interkromozomal) translokasyon” veya homolog olmayan kromozomlar arasında iki kromozomdan kopan parçaların yer değiştirmesiyle

“karşılıklı translokasyon” (resiprokal translokasyon) şeklinde meydana gelebilmektedir (Miglani, 2000; Griffiths ve ark., 1996). Translokasyonda sonuçları daha fazla önem taşıyan tip, bir kromozomdaki bir kırıkla beraber bir asentrik fragmentin diğer homolog olmayan kromozomdaki fragmentle yer değiştirmesi esasına dayanan resiprokal translokasyondur (Fairbanks ve Andersen, 1999).

İnsanlarda Down sendromlu hastalarda isokromozom 21 veya başka bir ifadeyle “Robertsonian Translokasyon” da denilen özel bir translokasyon tipi bilinmektedir (Pai, 1985; Griffiths ve ark., 1996). Kronik Myelogenous leukemia ve Burkitt’s lymphoma gibi tümörlerde kromozomal translokasyonların görüldüğü bildirilmiştir. Burkitt’s lymphoma, kromozom 8 ve 14’ teki resiprokal translokasyon sonucu meydana gelmektedir (Russel, 1998).

Translokasyonların insanda çoğu kez fenotipik anormallikler meydana getirdiği, hamilelikte düşüklere ya da doğumdan sonra ölümlere yol açtığı, yaşayanlarda da zihinsel kusurlara sebep olduğu bilinmektedir (Temizkan, 1994).

### **1.1.1.2. Kromozom sayısındaki değişimler**

#### **a) Öploidi**

Kromozom takımı sayısındaki değişimler olup, bir takımdaki kromozomların hepsinin sayısının birden tam katlar halinde artması veya organizmada tek takım kromozom bulunmasıdır (Sen ve Kar, 2005). Öploide bireyler monoploid, diploid, triploid, tetraploid ve poliploid şeklinde artan kromozom takımlarına sahiptir (Miglani, 2000). Poliploidi genelde memelilerde, mayoz sırasındaki bir hata sonucu oluşmaktadır. Poliploid memeliler çoğunlukla doğumdan önce düşük yapmaktadırlar. Çok nadiren doğum gerçekleşmesi halinde bu yavrular doğumdan kısa bir süre sonra ölürler (Fairbanks ve Andersen, 1999). Bir poliploidin sahip olduğu kromozom takımlarının hepsi aynı türe aitse bu olaya otoploidi, birden fazla türe aitse alloploidi adını alır (Griffiths ve ark., 1996; Temizkan, 1994).



## b) Anoploidi

Mayoz veya mitozda hücre bölünmesi ve mitotik iplik apparatusunu etkileyen anojen ajanlarca kromozom kaybı ya da eklenmesinin olması şeklindeki mutasyonlara anoploidi denilmektedir. Anoploidi, somatik ve germ hücrelerinde hücre bölünmesi sırasında spontan olarak ya da kimyasalların indüksiyonu ile meydana gelebilmektedir (Iamarcovai ve ark., 2006).

Anoploidi hayvanlarda genellikle ölümcül olup, ölü doğan fetüslerde saptanabilmektedir (Russel, 1998). Anoploid birey, haploid sayıdan bir eksik veya fazla sayıda kromozom taşıyan eşey hücrelerinin döllenmeye katılmasıyla oluşur (Temizkan, 1994). Anormal sentromer yapısı, kinetokor hasarının bir sonucu olan anafazda kromozom kayıpları, anafazda kromozom malsegrasyonu, mitotik kayma, mikroflamentteki kusurlar sonucu sitokinez bölünmesinde oluşan hata gibi mekanizmalar sonucu meydana gelmektedir. Anoploidinin, kanserin erken aşamalarında ortaya çıkabilen bir durum olduğu tahmin edilmektedir. Yapılan çoğu çalışmada solid tümörlerde anoploidiyle ilişkili olan sentromer anormalliklerinin olduğu tespit edilmiştir (Iamarcovai ve ark., 2006).

Anoploidinin en çok bilinen formları trisomi ( $2n+1$ ), ve monosomi ( $2n-1$ ) olup, bunlar dışında nullisomi, polisomi gibi anoploidi çeşitleri vardır. Down sendromlu bireylerin otozomal kromozomlarından 21. kromozomda trizomi görülmekte olup, bu bireyler istisnai olarak olarak yetişkinlik çağına kadar hayatta kalabilmektedirler (Fairbanks ve Andersen, 1999; Miglani, 2000). Otozomal monosomi ise ( $2n-1$ ), insanlarda gelişmeden ölen embriyolarda saptanabilmektedir (Russel, 1998).

### 1.1.2. Gen mutasyonları

Gen mutasyonları, DNA'daki nükleotid dizisinin, bu dizideki bazların sırasının ya da oranının değişmesi şeklinde meydana gelen ve nokta mutasyonu olarak da bilinen mutasyonlardır. Bir mutajenle uyarılma sonucu oluşuyorsa indüklenmiş mutasyon, kendiliğinden meydana geliyorsa spontan mutasyon olarak adlandırılır (Russel, 1998). Bir gendeki değişim sonucu yeni bir allel

oluşur, bu yeni alleli taşıyan organizmaya mutant adı verilir. Bu mutant allel geri mutasyona uğrayarak tekrar eski haline dönebilir. Fenotipte ölüme yol açacak kadar şiddetli etkiler görülebileceği gibi, bazen gendeki mutasyon hiç fark edilmeyebilir (Temizkan, 1994; Sambamurty, 2005). Gen yapısındaki bir mutasyon her zaman fenotipe yansımayaabilir, o genin ürününün yapısını ve aktivitesini değiştirmeyebilir. Böyle bir durumda bu gendeki bir mutasyon **sessiz (silent)** mutasyon olarak adlandırılır (Yıldırım, 2007; Brown, 1992). Örneğin; UAC tripletinin UAU'ya dönüşmesi bir nokta mutasyonu olmasına karşın, her iki triplet de aynı aminoasiti (tirozin) kodladığından protein ürününde bir değişme olmaz. Eğer tripletlerin yapısının değişimi yeni bir amino asitin oluşumuna sebep olursa bu nokta mutasyonuna “**Yanlış anlamlı (missense) mutasyon**” denilmektedir. UAU tripleti tirozini kodlarken, bu UCU' ya dönüşürse serin aminoasiti meydana gelir. Bunların dışında hiçbir aminoasiti şifrelemeyen bir kodon oluşursa, dur anlamına gelen UAA, UAG, UGA gibi tripletler üretilir ve bu tip mutasyon da “**anlamsız (nonsense) mutasyon**” adını alır (Yıldırım, 2007; Friedberg ve ark., 1995).

Gen mutasyonlarını iki ana grupta toplayabiliriz:

a) Baz değişim mutasyonları (Transisyon, Transversiyon)

Bir gen bölgesi içindeki bir bazın farklı bir baz ile yer değiştirmesi sonucu meydana gelen mutasyonlardır. Eğer bir pürin bazı başka bir pürin bazıyla veya bir pirimidin bazı diğer bir pirimidin bazıyla yer değiştirirse bu tip mutasyona **transisyon (karşılıklı geçiş)** mutasyonu adı verilir. Diğer bir durum, bir pirimidin bazının bir pürin bazıyla yer değiştirmesidir. Bu tür mutasyona ise **transversiyon (çapraz geçiş)** mutasyon denilmektedir (Yıldırım, 2007).  $AT \rightarrow GC$ ,  $GC \rightarrow AT$ ,  $TA \rightarrow CG$ ,  $CG \rightarrow TA$  şeklinde transisyon ve  $AT \rightarrow TA$ ,  $GC \rightarrow CG$ ,  $AT \rightarrow CG$ ,  $GC \rightarrow TA$  şeklinde de transversiyon mutasyonları meydana gelebilmektedir (Russel 1998; Brown, 1992 ). Yapılan bir çalışmada  $GC \rightarrow TA$  ve  $GC \rightarrow CG$  tipi transversiyon mutasyonun oksidatif koşullarda ortaya çıktığı görülmüştür ( Kino ve Sugiyama, 2001).

## b) Çerçeve kayması (Frame-Shift ) mutasyonları

Bazı durumlarda DNA'daki nükleotid dizisine 3 veya 3' ün katı olmayan şekilde baz eklenmesi ve çıkarılması şeklinde mutasyon meydana gelebilir. Bu durumda tripletlerin yeri değişeceğinden sentezlenecek proteinin fonksiyonu da değişir. Bu tür mutasyonlar çerçeve kayması (Frame-Shift) mutasyonları adını alır. Proflavin gibi interkale edici ajanların varlığında bu tip mutasyonun arttığı bilinmektedir (Friedberg ve ark., 1995).

İnsanlarda Duchenne Müsküler Distrofi (DMD), pıhtılaşma faktörü IX eksikliği nedeniyle gelişen hemofili B ve  $\beta$  Talesemi gibi hastalıklarda çerçeve kayması mutasyonlarının rol oynadığı belirlenmiştir (Yıldırım, 2007).

## 1.2. Genotoksik etkili ajanlar

### 1.2.1. Fiziksel mutajenler

Radyasyon bilinen ilk mutajenik ajanlardan birisi olup, ilk olarak Muller ve Stadler tarafından X ışınları gibi çeşitli radyasyonların fiziksel mutajen oldukları tespit edilmiştir. Bu mutajenleri iyonize ve noniyonize radyasyon olarak ikiye ayırmak mümkündür (Sen ve Kar, 2005; Friedberg ve ark., 1995).

#### 1.2.1.1. İyonize radyasyon

X, gama, beta ışınları ve nötronlar mutasyona yol açtığı bilinen iyonize radyasyonlardır. İyonize radyasyon suyun serbest radikallerini oluşturarak organizma ve hücrelerde bir dizi hasara yol açmaktadır. Serbest radikaller çok aktif olan elektronlar ile DNA'ya, proteinlere ve hücre lipidlerine bağlanarak bunlarda hasar oluşturabilirler. Hücre bölünmesini bloke ederek hücrenin ölümüne sebep olabilirler (Friedberg ve ark., 1995).

### 1.2.1.2. Non iyonize radyasyon

İyonsuz radyasyona örnek olarak verilecek UV ışınları potansiyel mutajenik özellikteki fiziksel mutajenlerdir. UV ışınları germ hücrelerine nüfuz edemezken, deride hücrelerin DNA'sında hasara yol açtığı bilinmektedir. (Bolsover ve ark., 1997).

### 1.2.2. Kimyasal mutajenler

Bitkilerde bulunan doğal zehirli bileşikler, sentetik besin katkı maddeleri, genotoksik etkili olan endüstriyel kimyasallar vb. ajanlar DNA'yı farklı şekillerde etkileyerek yapısını değiştirmek yoluyla mutasyona yol açabilmektedirler (Suzuki ve Knudston, 1990). Bunlardan bazıları baz değişikliğine, yanlış baz eşleşmelerine, baz eksilme veya artışına sebep olduğu gibi, bazıları da DNA'nın yapısındaki bağları kırarak DNA' da hasara yol açarlar. Bunlar birer kimyasal mutajen olarak mutasyonları tetiklemektedirler (Yıldırım, 2007). Genetikçilerin önem verdiği bir konunun da kimyasalların mutajenik ve genotoksik etkilerinin araştırılması olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda karsinojenlerin çoğunun mutajen olduğu ama tüm mutajenlerin karsinojenik etki göstermeyebileceği anlaşılmıştır (Griffths ve ark., 1996).

Kimyasal maddelerin mutajenik etkileriyle ilgili rapor edilen ilk çalışma 1. ve 2. dünya savaşında kullanılan ve hücrelerde mutasyona yol açtığı görülen nitrojen mustard gazıdır (Friedberg ve ark., 1995). Daha sonra yapılan çalışmalarda gıdalarda katkı maddesi olarak 2500 kimyasal maddenin bulunduğu ve bunların mutajenik etki yapabileceği tespit edilmiştir (Pai, 1985).

Her yıl binden fazla kimyasal ürünün piyasaya sürüldüğü, bunların yüzlercesinin mutajenik olduğu, bu mutajenlerin de % 90'dan fazlasının karsinojenik olduğu bilinmektedir. Bunları göz önüne aldığımızda, bu maddelerin karsinojenik potansiyelleri açısından test edilmesinin insan sağlığı açısından ne kadar önemli ve gerekli olduğu anlaşılmaktadır (Suzuki ve Knudston, 1990; Boyacıoğlu, 2004).

### 1.2.2.1. Baz analogları

Bu kimyasallar DNA'nın yapısındaki pürin ve pirimidin bazlarına benzeyen, DNA replikasyonu sırasında DNA' daki bu bazların yerine geçebilen ve mutasyonu tetikleyen moleküllerdir. Bilinen en önemli baz analogları 5-bromo urasil (5-BU) ve 2-aminopürin (2-AP)'dir. 5-BU, timin baz analogu olup, yapısında metil grubu yerine brom atomu taşımaktadır. Sonuçta bu baz analogları DNA replikasyonuna katılarak mutasyona sebep olmaktadır. Baz analoglarının, transisyon ve spontan tautomerizme yol açtıkları bilinmektedir (Kent, 1998; Russel, 1998; Brown, 1992).

### 1.2.2.2. Alkileyici ajanlar

Yapısında bir ya da fazla sayıda reaktif grubu taşıyan, bu gruba göre mono, bi veya polifonksiyonel alkileyici ajan olarak adlandırılan kimyasallardır. Örneğin, epoksid ve etilen amin, monofonksiyonel alkileyici ajan sınıfına dahilken, sülfat ve sülfonatların çoğu bifonksiyonel alkileyici ajan sınıfına girmektedir (Miglani, 2000; Friedberg ve ark., 1995).

Bu ajanların elektrofilik yapılarının karsinojenik etki gösterdikleri bilinmektedir. DNA'nın nükleofilik merkezine bağlanarak şeker fosfat bağlarının kopmasına sebep olur ve geniş lezyonlar oluştururlar. Terapotik antikanser ilaçlarının potansiyel DNA alkileyici özelliğe sahip olduğu ve karsinojenik etki gösterebildiği bilinmektedir (Sobol ve ark., 2007; Russel 1998; Friedberg ve ark., 1995). Etilmetan sülfanat (EMS), hardal gazı, dimetilsülfonat (DMS), nitrozoguanin (NG) alkileyici ajanlar arasında olup, bu ajanlar çoğunlukla tautomerik kayma sonucu yanlış baz eşleşmesi ile transisyon tipi mutasyona yol açmaktadırlar (Yıldırım, 2007).

### 1.2.2.3. İnterkale ajanlar

DNA'daki baz çiftlerine benzeyen ve bazlar arasına sıkışarak giren ajanlardır. Eğer bu interkalasyon, DNA replikasyonu sırasında olursa inversiyon

ve delesyon tipi mutasyonlar meydana gelebilmekte; DNA' nın sarmal yapısının genişlemesi, baz eklenmesi veya çıkması sonucunda ise frame-shift mutasyona yol açmaktadır (Yıldırım, 2007; Fairbanks ve Andersen, 1999; Friedberg ve ark., 1995). İnterkale edici ajan olarak, akridin sarısı ve proflavin gibi akridin boyaları, laboratuvar çalışmalarında boya olarak kullanılan etidyum bromid gibi kimyasallar örnek olarak verilebilir (Fairbanks ve Andersen, 1999; Brown, 1992 ). Birer alkilleyici ajan olan genotoksik aminlerin, amino florinlerin frame-shift mutasyonuna sebep olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bir derlemede interkale edici ajanların insanlar için ciddi bir potansiyel mutajen ve karsinojen olduğu belirtilmiştir (Ferguson ve Denny, 2007).

#### **1.2.2.4. Hidroksile edici ajanlar**

Nükleotid bazlarına hidroksil grubu eklerler. En iyi bilinen hidroksile edici ajan hidroksilamin'dir. Aflotoksin B ise, guanin bazına saldıran ve nükleotidden bu bazı çıkaran güçlü bir mutajendir (Fairbanks ve Andersen, 1999).

#### **1.2.2.5. Diğer kimyasal ajanlar**

Nitröz asitin ( $\text{HNO}_2$ ), DNA'nın yapısındaki adenin ve sitozin bazlarındaki amino gruplarını, keto gruplarına dönüştürerek deaminasyona sebep olduğu ve replikasyon sırasında baz eşleşme özelliğinin değişmesine yol açan bir mutajen olduğu bilinmektedir. Sonuçta adenin deaminasyonu ile oluşan hipoksantin sitozin ile eşleşirken, sitozinin deaminasyonu ile oluşan urasil de adenin ile eşleşmektedir ( Miglani, 2000).

Hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hidroksi radikaller ( $\cdot\text{OH}$ ) ve süperoksit ( $\text{O}_2\cdot$ ) gibi reaktif oksijen türlerinin de DNA' da mutasyona sebep olan diğer önemli kimyasal ajanlar olduğu bilinmektedir ( Yıldırım, 2007).

MMC, aflatoksin B, streptomisin gibi ajanlar da kromozom kırıkları oluşturma özelliğinde olup mutajenik etkiye yol açmaktadırlar ( Miglani, 2000).

### 1.2.2.6. Klastojenik ajanlar

Klastojenler, DNA'da geniş delesyonlar oluşturarak kromozomlarda kırıklara sebep olan fiziksel veya kimyasal ajanlardır. Bleomisin, kampotesin, m-AMSA, o-AMSA'nın klastojen ajan olduğu bilinmektedir (Lynch ve ark., 2008). Ayrıca akridin, aktinomisin D, methotrexate, metil akrilat, S-fluodeoksiüridin, UV radyasyon, benzen, benzo(a) pren, MMS (metil metano sülfanat) bilinen klastojenlerdendir (Kirpnick ve ark., 2005).

İnsan yaşamının hemen hemen her alanında yer alan radyasyon veya radyoaktif maddelerin düşük dozlarının bile insan genetik materyalinde hasara ve kansere sebep olduğu bilinmektedir (Suzuki ve ark., 1981). Yaygın olarak kullanılan pestisitlerin ise, biyolojik test sistemleriyle mutajenik ve klastojenik etkileri ortaya çıkarılmıştır (Karabay ve Oğuz, 2005). Ayrıca metilleyici ajanlar da potansiyel klastojenlerdendir (Sobol ve ark., 2007).

### 1.2.2.7. Metabolik aktivasyon ile aktive olan ajanlar

Normalde toksik olmayan bir kimyasalın, metabolik aktivasyon sürecine girdikten sonra, metabolizma enzimleriyle parçalanarak meydana gelen ürün formunun aktif özellik gösterebileceği bilinmektedir. Parçalanma sonucu oluşan ürün, protein veya DNA'ya elektrofilik veya nükleofilik merkezlerden bağlanarak etkisini göstermektedir. Yani bir bileşiğin biyoaktivasyon sonucu toksisitesi, makromoleküllere bağlanmasıyla ortaya çıkmaktadır. Örneğin, 3-hidroksiasetonilid toksik olmasa da, 4-hidroksiasetonilide bağlanarak tepkimeye girebilmektedir. Aflotoksin B1 de, karaciğer P-450 enzim sisteminde metabolize olmakta, sonuçta oluşan metabolizma ürünü exo epoksit DNA'ya interkale bir ajan olarak bağlanarak aktivasyon göstermektedir (Guengerich ve ark., 2006).

### 1.3. Genetik Toksikoloji Testleri

Toksik olan materyallerin *in vitro*'daki genetik etkilerini ölçmek için kullanılan *in vitro* genetik toksikoloji testleri, diğer tüm *in vitro* toksikoloji testlerinin öncülüdür (Gad, 2000). Genetik toksikoloji çalışmalarıyla belirlenen potansiyel genotoksik etkiler, kanser gibi hastalıkların nedenlerinin belirlenmesinde kullanılabilirler (Jacobson-Kram ve Keller, 2001). Bu testler, canlıların maruz kaldığı potansiyel riskin hızlı bir şekilde tayin edilmesi, geliştirilmekte olan ilaçların insanlarda neden olabileceği riskin ölçülmesi ve yapılabilecek ek testlerin belirlenmesine yardımcı olmak için kullanılmaktadır (Gad, 2000).

Mutasyon ve karsinojenik süreç arasındaki ilişki, karsinojenitenin tahmin edilmesinde, mutajenite testlerinin evrensel olarak benimsenmesini sağlamıştır. Ve günümüzde genetik toksikoloji çok önemli bir disiplini oluşturmaktadır (Castell ve Gomez-Lechon, 1997).

1970'lerde kurulan çevresel koruma programı (EPA), çevrenin ve insan sağlığının korunması amacıyla toksikolojik ve epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen verileri toplamakta, genetik toksikoloji çalışmaları için de önemli bir veri tabanı olmaktadır (Kent, 1998).

Genotoksisite testleri, çevresel ajanların karsinojenik potansiyelinin değerlendirilmesinde hızlı ve ucuz olması, bir kimyasalın gelişiminde erken aşamada *in vitro*'da ölçümün uygulanabilir olması açısından tercih edilen testlerdir (Woolley, 2003; Castell ve Gomez-Lechon, 1997)

Günümüzde de bu testler farmakolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılmakta olup, üretilen bir kimyasalın beklenmedik bir genotoksik etkisinin önceden belirlenmesi amacıyla önem taşımaktadır (Rothfuss ve ark., 2006).

İlk genotoksisite testleri *in vivo*'da yapılırken, daha sonra metabolik aktivasyon sistemlerinin de tanımlanmasıyla *in vitro* testler geliştirilmiştir (Gad, 2000; Lu ve Kacew, 2002).

Günümüzde de genotoksisite çalışmaları birçok alanı kapsayacak şekilde yapılmaktadır. Örneğin gıda katkı maddelerinin genotoksik etkileri (Canımoğlu ve Rencüzoğulları, 2006; Sarıkaya ve Solak, 2003), havasal kirlenici olan egzoz



gazlarının karsinojenik etkileri (Zhang ve ark., 2007), diş beyazlatıcı olarak insanlar tarafından kullanılan ürünlerin genotoksik etkileri (Munro ve ark., 2006); doğadan baz alınarak üretilen yeni ilaçların mutajenik ve genotoksik etkileri (Başaran, 2002) vb. gibi insan sağlığını etkileyen genotoksik ajanlarla ilgili bir çok çalışma yapılmaktadır.

Doğal bir nörotoksin olan TTX (tetrodotoksin)' in potansiyel genotoksitesini *in vivo* ve *in vitro*' da bir grup genotoksitesite testleriyle ölçülmüştür (Guzman ve ark., 2007).

Piyasadaki ilaçların genotoksitesitesinin araştırılması için hazırlanan bir çalışmada, içinde antikanser ilaçların da bulunduğu 467 piyasa ilacıyla ilgili genotoksitesite sonuçları rapor edilmiştir. Buna göre SCE frekansında geniş oranda pozitif sonuç elde edilirken, memeli mutajenez çalışmasında düşük oranda pozitif sonuç elde edilmiştir. Bazı ilaçların hem genotoksik hem karsinojenik olduğu belirlenmiştir (Snyder ve Gren, 2001).

Bir antibiyotik olan streptozotocin ile yapılan bir çalışmada, bu ilacın bakteriyel testlerde ve ökaryotik hücrelerde mutajenik etkili olduğu, fare böbrek, karaciğer ve pankreasında tümör oluşumunu indüklediği görülmüştür (Song ve ark., 2008).

### **1.3.1. Bakteriyel yöntemler**

Kısa zamanlı test sistemleri içinde en yaygın olarak kullanılan testlerden birisi de bakteriyel testlerdir. Bakteriler, basit üreme ortamlarında hızlı ürerler. Bu nedenle bakteriyel testler; basit ve çabuk uygulanmaları, maliyetlerinin ucuz olması gibi nedenlerle tercih edilmektedirler.

#### **1.3.1.1. Ames (Salmonella/mikrozom) testi**

Salmonella/mikrozom testi; bakteriyel mutasyon testleri içinde, detayları en iyi bilinen, geçerliliği, uygulanma kolaylığı ve hassaslığı nedeniyle en fazla kabul gören ve günümüzde de sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. 1970' lerin

başında Prof. Dr. Ames ve Dr. Maron tarafından geliştirilmiştir (Russel, 1998). Mutajenik potansiyeli belirlemede en çok kullanılan testlerden birisi olup, kimyasalların bu testte pozitif sonuç verirken, *in vivo* testlerde negatif sonuç verdikleri de görülmüştür (Karabay ve Oğuz, 2005).

Binlerce kimyasalın bakterilerde mutasyona yol açıp açmadığı Ames testiyle incelenmektedir. Bu yolla çok sayıda potansiyel karsinojen tespit edilmiştir. Ames testiyle yapılan çalışmalar sonucu bazı meyve ve sebzelerin antimutajen bileşikler içerdiği ve diğer toksik kimyasalların hasar verici etkisini azalttığı anlaşılmıştır (Bolsover ve ark., 1997). Mc Bann 1975'te Salmonella Mikrozom testiyle 300 maddenin mutajenitesini araştırmış, bu maddelerin karsinojenite ve nonkarsinojenitelerini incelemiştir. Karsinojenlerin bu testte %90'ının mutajenik olduğu, çok az nonkarsinojenin ise mutajenik etki göstermediğini rapor etmiştir (Lu ve Kacew, 2002).

Heterosiklik birim olan MeIox'in potansiyel bir genotoksik karsinojen olduğu Ames testindeki güçlü mutajeniteyle belirlenmiş, MeIox içeren genotoksik karsinojenlerin DNA'daki hasara sebep olduğu yapılan bir çalışmayla da görülmüştür (Hoshi ve ark., 2004).

### 1.3.1.2. SOS (umu) testi

SOS (umu) testi, bakterilerdeki mutasyonların genetik ve moleküler düzeyde analizinde kullanılan, kısa zamanlı bir ileri mutasyon sistemidir. Mutagenesisle ilgili olduğu düşünülen *umu* operonunun ifade edilme düzeyini saptamaya dayanır.

Antibiyotiklerin potansiyel mutajenite ve genotoksisiteleriyle ilgili bir çalışmada SOS testi kullanılmış ve *in vitro*'da DNA hasarı da Ames testiyle rapor edilmiştir (Isidori ve ark., 2005).

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

Bakterilerdeki mutasyonların tespitinde kullanılan ileri mutasyon sistemi olan bu test sisteminde; laktoz operonundaki represörü kodlayan lac I geninde oluşan mutasyonun fenotip üzerindeki yansıması belirlenerek değerlendirilmektedir. Lac I mutasyonlarını içeren gen bölgesi bakteriden alınarak bir plazmide ya da M13 fajı klonlama vektörüne aktarılarak, vektörler çoğaltılıp, çok sayıda mutant DNA kopyası elde edilerek ve dizi analizi yapılmaktadır (Güven, 1999).

### 1.3.2. Sitogenetik yöntemler

Sitogenetik testler, kromozom yapısı ve sayısındaki değişimlerin belirlenmesinde kullanılan önemli testlerdir (Barile, 1994). Sitogenetik biyomarkırların hassasiyeti insan popülasyon çalışmalarında, kanser riskinin erken aşamada tahmininde ve genotoksik ajanlara maruziyetin ölçülmesinde etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Bonassi ve ark., 2005).

Sitogenetik testler, popülasyonların maruz kaldığı genotoksik ajanların etkisinin belirlenmesinde (Neri ve ark., 2003; Ulupınar ve ark., 2002; Ocak ve ark., 2002), radyasyon gibi tehlikeli faktörlerin maruziyetiyle oluşan genetik değişimlerin biyolojik doz değerlendirilmesinde güvenilir bir biçimde kullanılmaktadır (Friedberg ve ark., 1995).

Sitogenetik testler, ışık mikroskobu kullanılarak kesin olarak kromozomal değişikliklerin tespit edilmesini temel alır. Sitogenetik çalışmalarda kimyasalların meydana getirdiği hasarın ve etkinin belirlenmesinde kardeş kromatid değişimi (SCE), yapısal kromozom bozukluğu (CA) ve mikronükleus testi (MN) kullanılan en yaygın sitogenetik yöntemlerdir (Barile, 1994; Kirkland, 1990).

#### 1.3.2.1. Yapısal kromozom bozulma (CA) testi

Kromozomal aberasyonlar, spontan olarak ya da kimyasal/radyasyon gibi mutajenlerin etkisiyle ortaya çıkan, kromozomun yapısı ve sayısında meydana

gelen değişimlerdir. Kromozomun yapısındaki aberasyonlar; direkt DNA kırığı, hasarlı DNA'nın replikasyonu, DNA sentezinin inhibisyonu veya diğer mekanizmalarla kromozomda değişikliklerin meydana gelmesidir. Kromozom aberasyon testi, kromozomda meydana gelen bu klastojenezisin belirlenmesini amaçlamaktadır. Bu test, insan periferik lenfositlerinin *in vitro*' da önce fitohemoglutinin ile bölünmeye teşvik edilmesi, belirli zamanda kolşisin ve kolsemid gibi iplik inhibitörlerince hücrelerin metafazda tutulması esasına dayanılmaktadır. *In vitro* CA testinde genellikle memeli somatik hücreleri, insanda ise lenfositler kullanılmaktadır. Somatik hücrelerde bu aberasyonların tümör yayılımı sürecinde rol oynadıkları düşünölmektedir (Mateuca ve ark., 2006; Kirkland, 1990).

1980'lerin sonlarına doğru CA testinin uygulaması yaygınlaşmıştır. Bu test, insanların maruz kaldığı ajanların oluşturduğu kromozomal hasarın tespitinde önemli bir işleve sahiptir. Özellikle çevresel ve mesleki maruziyetin hasar tespitinde sıklıkla uygulanan bu testle ilgili her yıl çok sayıda makale yayınladığı bilinmektedir (Bonassi ve ark., 2005).

Antifungal bir ilaç olan flukunazol ile insan lenfositlerinde yapılan çalışmada; bu ilacın kromatid, kromozom kırıkları, poliploidi, disentrik kromozomlar, kromatid değişimleri, yapısal veya sayısal kromozom aberasyonlarına yol açtığı tespit edilmiştir. İnsan lenfositlerinde bu ilacın klastojenik ve anojenik etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Yüzbaşıoğlu ve ark., 2008).

Belirli süre DES (diethylbestrol) uygulanan farelerde, bu kimyasalın kromozomal anomalileri arttırdığı, uzun süreli maruziyette ise CA frekansında artışa yol açtığı tespit edilmiştir (Göze ve ark., 2000).

Laboratuvarda çalışan kişilerde kimyasallara maruziyete bağlı olarak lenfositlerdeki CA seviyesinde etkili denilebilecek bir artış olmaktadır (Santos ve ark., 2005). Pestisitlere maruz kalınan bir bölgedeki insanlarla yapılan bir çalışmada, CA, SCE ve MN testi birlikte uygulanmış ve bu üç testte de kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında CA, SCE ve MN frekansında belirgin oranda artış olduğu gözlenmiştir (Ergene ve ark., 2007).

### 1.3.2.2. Kardeş kromatid değişimi (SCE) testi

Bir kromozomda, kardeş kromatidler arasında parça değişimi olmasına kardeş kromatid değişimi denir. SCE testi, bu parça değişimi sonucu DNA'da meydana gelen ve sonra tekrar birleşen kırıkların tespit edilmesini sağlamaktadır. SCE testinde hücreler, bir timin analogu olan Brd-U (bromodeoksiüridin) ile mitoz sırasında muamele edilir ve Brd-U'nun floresan bir parlaklık vermesiyle kardeş kromatid değişimlerinin tespit edilmesini sağlar. Kanser gibi hastalıklarda, SCE frekansında artış olduğu bilindiği için, mutajenlere maruziyet sonucu oluşabilecek hasarların belirlenmesinde sıklıkla tercih edilen bir tekniktir. Çeşitli mutajenik maddeler alkilleyici özellikleri ile (mitomisin C, nitrojen mustard gibi) kromatid kırıklarını ve değişimlerini indüklemektedirler ( Sen ve Kar, 2005).

Benzin istasyonunda çalışan ve sigara kullananlarla yapılan bir çalışmada, benzene maruziyet ve sigara içiminin genotoksik etkileri incelenmiştir. Kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, benzen maruziyeti ve sigara içiminin mitotik indeks ve replikasyon indeksini azaltıcı yönde birlikte etkili oldukları görülürken; sigaranın ve benzenin CA frekansı üzerinde beraber bir etkisinin olmadığı anlaşılmıştır. Sigara ve benzene maruziyette ise önemli derecede SCE frekansı artışı olduğu kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak anlaşılmıştır (Çelik ve Akbaş, 2005).

Bir anti kanser ilaç olan gemsitabinin belirli dozlarının lenfositlerde CA ve SCE frekansında artışa yol açtığı bir çalışmada belirlenmiştir. Bu ilacın *in vitro*'da doza bağlı olarak hem sitotoksik, hem genotoksik olduğu söylenebilmektedir (Aydemir ve ark., 2005).

Karaciğer kist hidatik tedavisinde kullanılan albendozun genotoksik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, tedavi öncesi ve sonrası bu ilacın kromozomlar üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sonuçta, bu ilacın preiferik kan kültüründe SCE frekansında önemli derecede bir artışa sebep olduğu ve muhtemel bir mutajen olabileceği sonucuna varılmıştır (Altıntaş ve ark., 2005).

Deksamethasonun insan lenfositlerinde CA ve SCE frekansında bir artışa yol açmadığı görülürken, kromatid kırıkları ve gaplar oluşturduğu görülmüştür.

Bu ilacın *in vivo*' da klastojenikken, *in vitro*'da klastojenik etki yaratmadığı anlaşılmıştır (Ahmad ve ark., 2000).

### 1.3.2.3. Mikronukleus (MN) testi

Mikronukleus, hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, anafazda geç kalarak her iki kardeş çekirdeğe dahil olmayan kromozomlardan veya tam ya da asentrik kromozom fragmentlerinden köken alan genetik materyaldeki hasarın belirtisi olan, çekirdek orijinli, etrafı nüklear zar ile sarılı, ana nükleustan daha küçük olan oluşumlardır (Korkmaz ve Çolak, 2000; Norppa ve ark., 2003). Mikronukleusun içerdiği kromozomal fragmentler; kromozom alt birimlerinde oluşan hasardan, hücresel fizyolojideki değişimlerden, iğ ipliği, kinetokor veya diğer mitotik aparatlardaki fonksiyon kaybından ve mekanik parçalanmalardan kaynaklanmaktadır (Fenech, 2000).

Mikronukleus (MN) oluşumu; oksidatif stres, klastojen veya anojen ajanlara maruziyet, hücre döngüsü veya DNA tamir genlerindeki genetik hasar gibi faktörlerin etkisiyle meydana gelmekte olup, MN frekansındaki artış ve kanser riski arasında bir ilişki olduğu tahmin edildiği için, mikronukleus formasyonu kromozomal hasarın, genom kararsızlığı ve kanserin biyomarkırı olarak kabul edilmektedir (Dörter ve ark. 2003; Moller, 2005; Iamarcovai ve ark., 2008)

MN ilk olarak 1891'de Howell ve Jolly tarafından insan eritrositlerinde tanımlanmıştır. Bu yüzden "Howell-Jolly cisimciği" olarak adlandırılmıştır (Decordier ve Kirsch-Volders, 2006).

1950'lerde bitki hücrelerinde kromozomal hasarın ölçülmesinde kullanılmıştır. 1970'lerde ise Boller ve Schmidt tarafından hayvan hücrelerinde çalışılmış, ilk kez mikronukleus testi terimi kullanılmaya başlanmış ve çevresel ajanların genotoksik potansiyellerini belirleyen bir sistem olarak MN testi kabul görmüştür. Daha sonraki yıllarda Hedlle ve arkadaşları tarafından kültüre edilmiş insan lenfositlerinde, kimyasal karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır (Kirsch-Volders ve ark., 2003).

MN testi, çevresel kirlenmelerle insan sağlığının direkt ya da dolaylı olarak tehditini, genetik materyalde oluşacak hasarın frekansını belirlemeye olanak sağlayan bir test olması (Norppa ve ark., 2003; Ulupınar ve ark., 2002) ve çok farklı hücre tiplerinde kullanılabilirliği sayesinde diğer genotoksisite testleri arasında artan bir öneme sahiptir (Decordier ve Kirsch-Volders, 2006; Fenech, 1998).

Mikronükleusları; ağız, burun, bronş ve ürateryal epitel dokularda belirlemek ve bu dokularla çalışmak mümkündür. Karsinojenlere maruz kalmış bireylerde, artan kanser riskini göstermek amacıyla bu dokulardaki morfoloji bozukluğunu, kromozom kırıklarını, premalign değişikliklerini belirlemek için MN testi yapılabilmektedir (Demirel ve Zamani, 2002). Fakat çoğunlukla, farklı genetik hasar tiplerini belirlemek amacıyla kısa zamanlı lenfosit kültürü tercih edilmektedir (Fenech ve ark., 1999).

MN testi, hücre bölünme kinetiği tam olarak anlaşılmadığı için, bölünmeyen ya da bölünen hücre gruplarında etkili olarak kullanılamayabileceğinden; bir hücre popülasyonunda bölünmeyen ve mitoz geçiren hücrelerin ayırt edilmesi gerekmektedir. *İn vivo*’da MN’yi tespit etmek kolay olsa da, mitozdan sonraki DNA hasarının indüksiyonu *ex vivo* çekirdek bölünmesini gerektirdiği için Fenech ve Morley daha yeni ve yaygın kullanılabilen sitokinezi bloke edilmiş mikro nükleus tekniği denilen CBMN tekniğini geliştirmişlerdir ( Fenech ve Morley, 1986; Mateuca ve ark., 2006)

Genetik hasarın bir göstergesi olan mikronükleusun belirlenmesinde son yıllarda en çok tercih edilen teknik sitokinez engelleme mikronükleus (CBMN) tekniğidir. 1985’de ilk kez Fenech ve Morley tarafından tanımlanmış olan bu teknik kromozomal hasarın belirlenmesinde hassas ve güvenilir olduğu için dünya genelinde birçok laboratuvar da kabul görmektedir (Fenech, 1998).

CBMN Tekniği, hücre bölünmesinin fitohemoglutinin (PHA) ile uyarılmasının ardından ilk çekirdek bölünmesini geçiren hücrelerde, 44. saatte sitokalasin-B (cyt-B)’nin ilavesiyle sitokinezin engellenmesi ve ortamdaki iki çekirdekli (binüklead, bn) hücrelerdeki MN’lerin belirlenmesi esasına dayanmaktadır (Fenech ve Morley, 1985; Norppa ve ark., 2003). Cyt-B, aktin polimerizasyonunu inhibe eden, *Helminthosporium dematiadeum*’dan elde edilen

bir ekstremdir. Hücre bölünmesini, sitokinez evresinde aktin filamentlerinin ucuna bağlanarak ve aktinin polimerize olmasını engelleyerek durdurur.

CBMN tekniğinde, her örnek için 1000 iki çekirdekli hücredeki mikronükleuslar sayılır (Fenech, 2000).

CBMN testi sadece mikronükleusların belirlenmesini sağlamaz. Ayrıca;

- Nükleoplazmik köprülerin (NPB)
- Gen amplifikasyon belirteçlerinin (NBUD)
- Hücre bölünmesi inhibisyonunun
- Nükleer bölünme indeksinin
- Nekrozis ve apoptozisin de belirlenmesini sağlamaktadır (Mateuca ve ark., 2006).

CBMN tekniği, ilk olarak insan lenfosit hücrelerinde MN'nin tespiti için geliştirilmesine rağmen, günümüzde tümör, kemik iliği hücresi gibi birçok hücrede de uygulanmaktadır (Fenech, 2000). Biyomonitörleme çalışmalarında MN varlığı ilk olarak 1985'lerde CBMN tekniğinin tanımlanmasıyla belirlenmiştir (Bonassi ve ark., 2005).

İnsan Mikronükleus Projesi (HUMN) adıyla bilinen, insan lenfositlerinde CBMN sonuçlarının toplandığı ve karşılaştırıldığı uluslararası bir veri bankası vardır. Dünya genelinde 30'dan fazla laboratuvarın CBMN tekniği ile ilgili yapılmış çalışmaların verileri toplanmaktadır (Fenech ve ark., 2003).

### **MN (mikronükleus) sayım kriterleri**

MN'ler morfolojik olarak tek tip olup, nükleustan daha küçüktür. MN aşağıdaki özelliklerle karakterize edilebilmektedir:

- Lenfositlerdeki MN çapı ana çekirdek çapının  $1/16$ ' sını ile  $1/3$ ' ü arasındaki değerlerdedir. MN'nin alanı, ana çekirdeklerin alanının  $1/256$  ile  $1/9$ 'u arasındadır.
- MN'ler oval veya küreseldir, asla dörtgen olmamalıdır.
- MN'ler kolaylıkla boya gibi artefaklardan ayrılabilirler.
- MN'ler ana nükleusa bağlı değildir.



- MN'ler ana çekirdeğe dokunabilirler, eğer sınırlar ayrılabilirse ana nükleusun üstünde olabilirler.
- MN'ler genellikle ana çekirdekle aynı yoğunlukta boya alırlar. Fakat bazen ana nükleus daha koyu boyanabilir.

### **İki çekirdekli hücre sayım kriterleri**

CBMN tekniğinde iki çekirdekli (binüklead) hücreleri hesaplama kriterleri şunlardır:

- Hücreler iki çekirdekli olmalı.
- İki çekirdekli hücrelerdeki çekirdekler bozulmamış bir çekirdek membranına sahip olmalı ve aynı sitoplazmik sınırlar içinde bulunmalı.
- İki çekirdekli hücrelerdeki çekirdekler yaklaşık aynı büyüklükte olmalıdır. Bu nükleusların boyama yoğunluğu da aynı olmalıdır.
- İki çekirdekli hücredeki çekirdekler nükleoplazmik köprü ile bağlanmış olabilir. Bu köprü çekirdek çapının  $\frac{1}{4}$  'ünden daha büyük olmamalıdır.
- İki çekirdekli hücredeki çekirdekler birbirine dokunabilir. Ama birbirlerinin üstünde olmaması istenmektedir. Eğer çekirdeklerin sınırları belirlenebiliyorsa bu durumda hesaba alınabilir.
- Sitoplazmik sınır veya iki çekirdekli hücrenin membranı bozulmamış olmalıdır. Komşu hücrenin sitoplazmik sınırından açıkça ayrılabilirdir (Fenech ve ark., 2003).

### **1.3.3. DNA' daki hasarı saptayan diğer yöntemler**

#### **1.3.3.1. Comet (single cell gel electrophoresis ) testi**

Tek hücre alkali jel elektroforezi olarak da bilinen bu yöntem, DNA'da meydana gelen hasar sonucu oluşan kırılmaların kuyruklu yıldız (comet) görünümünde olmasından dolayı "Comet" ismiyle de anılır ve *in vitro* genotoksisite çalışmalarında yaygın bir kullanım alanı olan yöntemlerden biridir (Başaran, 2002).

Comet testinin alkali versiyonu ilk defa 1988'de Singh tarafından bulunmuştur. Bu yöntem, DNA' daki tek iplik kırılmalarının, kararsız alkali bölgelerin, DNA-DNA/DNA-protein çapraz bağlanmalarının ve onarım bölgelerindeki hataların belirlenmesini sağlamaktadır. DNA'daki çok küçük orandaki hasarların dahi tespitini sağlayabilmesi, çeşitli hücre tiplerine uygulanabilmesi, kolay ve ucuz olması, birkaç gün gibi kısa bir sürede sonuçlanabilmesi gibi birçok avantajdan dolayı tercih edilmektedir. Olası insan mutajen ve karsinojenlerinin tespitine olanak sağlamaktadır (Tice ve ark., 2000; Collins ve ark., 1997)

Bir lam üzerine yayılmış hücreler, agarozda süspanse edilip, çekirdek proteinleri ve sitoplazmanın taşınmasını sağlayan; Triton-X denilen deterjan ve yüksek konsantrasyonlu bir tuz çözeltisinde lizis edilir. Ortamda kalan DNA'ya alkali olarak yüksek ph'da elektroforez uygulanır. DNA bu ortamda katottan anoda doğru taşınır (Collins ve ark., 2001). DNA'daki hasara göre jel üzerinde yayılmış DNA parçacıkları kuyruk şeklinde florasan ya da nonflorasan mikroskopta uygun bir boyama yapılarak gözlenebilir. Bu kuyruğun ölçülmesiyle incelenen kimyasal maddenin DNA'da meydana getirdiği hasarın boyutuyla ilgili tahmin yapılabilmektedir (Albertini ve ark., 2000).

Akciğer kanserli hastalar ve kontrol gruplarında DNA'daki oksidatif hasarı ölçmek için Comet testi uygulanmış ve kemoterapi öncesi ve sonrası hastalar ve kontrol gruplarındaki DNA hasarı arasında bir fark olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlara bağlı olarak oksidatif DNA hasarının akciğer kanser riskiyle ilişkili olamayacağı sonucuna varılmıştır (Shama ve ark., 2003). İnterkale edici ajan, alkilleyici ajan ve okside edici ajanlar gibi bazı genotoksinlerin sebep olduğu genotoksisiteyi belirlemede Comet testinin uygun olduğu bilinirken; çapraz bağlayıcı ajanların oluşturduğu hasarı belirlemede bu testin negatif sonuç verdiği bir çalışmayla da tespit edilmiştir (Henderson ve ark., 1998).

### **1.3.3.2. Mouse lymphoma testi**

Timidin kinaz geninin kullanıldığı fare lymphoma testi, çok geniş oranda kullanılan, tk lokusundaki gen ve kromozomal mutasyonları belirleyen *in vitro*

memeli gen mutasyon testidir. Gen ve kromozom mutasyonları sonucu oluşan DNA hasarını belirler (Soriano ve ark., 2007). Kimyasallarca indüklenen gen mutasyonu, kromozomal hasarı belirlemede faydalı ama pahalı bir testtir. Bu testte kullanılan hücreler timidin kinaz lokusu heterozigot olan hücrelerdir (Clements, 2000).

### 1.3.3.3. HPRT gen mutasyon testi

HPRT yöntemi, somatik gen mutasyonlarının, farklı memeli kültür hücrelerinde, *in vivo*' da veya *in vitro* ortamda, pozitif olarak seçilmesi temeline dayanmaktadır. DNA'daki baz çifti değişimlerini, büyük ya da küçük orandaki delesyonları, heterolog kromozom rekombinasyonları ve inversiyon gibi genetik materyalde meydana gelen değişimleri büyük oranda yansıtan, çok geniş oranda kullanılan bir test sistemidir. Hprt geni, büyük ya da küçük orandaki delesyonlar, DNA baz çifti değişimleri, heterolog kromozom rekombinasyonları gibi genetik değişimleri belirtme özelliğine sahiptir (Albertini ve ark., 2000).

### 1.3.3.4. Muta mouse / Big blue yöntemi

Son zamanlarda geliştirilmiş *in vivo* bir test olan muta mouse/big blue test sistemi, bakteriyel *lac I* ve *lac Z* genlerinin, bakteriyofajlar aracılığıyla fare genomuna aktarımını ve ardından bu genlerin fare genomundaki ifade düzeyini, meydana gelecek mutasyonları ölçmeyi esas alan bir test sistemidir. Farelere test ajanlarıyla maruziyetinin ardından bakteri genlerinin aktarımı ve bu genlerdeki mutasyonların saptanmasını sağlamaktadır (Nohmi ve ark., 2000).

## 1.4. CBMN Tekniğiyle Yapılmış Çalışmalar

Bir antikanser ilaç olan doxorubicin ile ilgili yapılan bir çalışmada CBMN tekniği sonuçlarına bakıldığında, MN frekansında doza bağlı olarak meydana gelen artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüş; ayrıca nekrotik hücre

sayısında da belirgin bir artış gözlenmiştir. Bu ilacın klastojenik ve anojenik etkili olduğu sonucuna varılmıştır ( Dhawan ve ark., 2003).

Başka bir çalışmada CBMN tekniği ile beraber başka testler de uygulanmıştır. Bir estrogen olan katekolestrojenin genotoksik aktivitesi ile ilgili yapılan *in vitro* testler sonucunda, CBMN testinde az miktarda MN olduğu, SCE’de zayıf genotoksik aktivitenin desteklendiği, AMES testinde ise mutajenik bir aktivite olmadığı rapor edilmiştir ( Rossi ve ark., 2007).

Bir sülfanomid ailesi üyesi ve antimikrobiyal bir ilaç olan sülfamethoxazole ile insan periferel lenfositlerindeki genotoksisite çalışmasında, bu ilacın MN frekansında anlamlı bir artışa sebep olduğu görülmüş, sitotoksik etkili olduğu ve lenfositlerde zayıf kromozomal hasarı indüklediği sonucuna varılmıştır (Abou-Eisha ve ark., 2004).

Doğal bir flavonoid olan apigeninin genotoksisitesi CBMN tekniği ile araştırılmış ve apigeninin doza bağlı olarak insanlar için genotoksik bir tehlike içerdiği, yüksek dozlarda klastojenik etkili olduğu sonucuna varılmıştır ( Noel ve ark., 2006).

Un beyazlatıcı olarak kullanılan potasyum bromatın genotoksik etkisini araştırmak için, SCE, CA ve MN testleri uygulanmış; 24 ve 48 saatlik periyotlardan sonra CA ve SCE’ nin indüklendiği, hücre proliferasyon indeksinin ve MI (mitotik indeks)’ in azaldığı görülmüştür. 48 saatlik süreç boyunca bütün dozlarda MN oluşumunun meydana geldiği belirlenmiş ve *in vitro* sonuçlara göre potasyum bromatın insan kültür hücre sisteminde önemli bir genotoksisiteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır ( Kaya ve Topaktaş, 2007).

Başka bir çalışmada ise, hastanede çalışan ve ultrasound’a maruz kalan kişilerin lenfositlerindeki MN frekansını ölçmek için CBMN tekniği uygulanmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu bireylerde MN frekansında istatistiksel olarak anlamlı önemli bir artış olduğu görülmüştür (Garaj-Vrhovac ve ark., 1999).

CBMN tekniğinin uygulandığı göğüs kanserli hastalarda iyonize radyasyonun DNA hasarı üzerindeki etkisi MN frekansındaki artış ile gösterilmiştir (Fenech, 2002).

Çevresel ajanlara maruz kalan çocuklarda MN frekansının yaşla ilgisinin olup olmadığı ile ilgili bir araştırmada, 0-18 yaş arası genç ve çocuklarda MN testi ile yapılmış çalışmalar incelenmiş, bu yaş grubu arası gençlerde çevresel kimyasallara maruziyetle MN seviyesi arasında bir ilişki olduğu ve çocukların çevresel ajanlara karşı hassasiyetinin MN frekansını arttırdığı görülmüştür (Neri ve ark., 2003).

Sağlıklı, sigara içmeyen, bleomisin ile muamele edilen donörlerden alınan kandaki lenfositlerde MN frekansı CBMN tekniği ile ölçülmüş ve bleomisinin genotoksik etkili olduğu görülmüştür ( Maffei ve ark., 2008).

Carla (2006), antitümoral aktiviteye sahip bir bileşik olan violacein denilen antibiyotik genotoksitesini dört farklı hücre tipi kullanarak Comet ve MN testiyle incelemiştir. Comet testinde violaceinin DNA'da meydana getirdiği hasar tespit edilmiş, elde edilen sonuçlar *in vitro*' da bu bileşiğin memeli hücrelerinde çok düşük konsantrasyonlarda dahi genotoksik etkili olabileceğini desteklemiştir.

Akciğer kanser hastalarındaki kromozomal hasarı ve bunun biyomarkırlarını belirlemek için CBMN testi ile bir çalışma yapılmıştır. CBMN tekniği ile MN sayısı, nükleoplazmik köprüler, nüklear budlar kanser risk tahmininde önemli olan biyomarkırların hastalarda kontrol grubuna göre fazla çıktığı görülmüş, CBMN tekniğinin akciğer kanser risk belirteci olarak genetik hasarı belirlemede hassas ve güçlü bir teknik olduğu anlaşılmıştır ( El-Zein ve ark., 2006).

Yapılan bir çalışmada dietilsbestrol, grisefuluin, urinkristin sülfat gibi anojenlerin tek ve iki çekirdekli hücrelerde MN frekansını arttırdığı görülürken, birer klastojen olan MMC, bleomisin ve duxorubicinin sadece iki çekirdekli hücrelerde MN frekansını arttırdığı belirlenmiştir ( Rosefort ve ark., 2004).

Bosna-Hersek'teki savaşta kullanılan bir genotoksin olan DU (zayıflatılmış uranyumun)'nun savaştan sonraki yıllarda da o çevredeki insanlardan alınan kan örneklerindeki genotoksik etkisi araştırılmıştır. CBMN tekniği sonuçlarına göre MN frekansında kontrol gruplarına göre belirgin oranda artış olduğu anlaşılmıştır. Bu durum DU gibi genotoksinlerin uzun yıllar doğada kaldığı ve bu bölgelerde yaşayan insanlarda genotoksik etki yaratabileceğini göstermektedir (Krunic ve ark. 2005).

### 1.5. Trimethoprim

19. yy'dan beri terapotik olarak ilk kullanılan antibiyotik sülfanomidlerdir. 1930'un ortasında keşfedilmiş ve *Streptococ* enfeksiyonlara karşı başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Dougherty ve Projan, 2003).

Trimethoprim de sülfanomidlere bağlı olan, 2,4-diamino primidin ailesinin bir üyesi olan, birçok bakteri türü için antibakteriyal özelliğe sahip bir bileşiktir. Bu bileşik, dihidrofolik asitin tetra hidrofolik asite dönüşümünü katalize eden dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek bir folik asit antagonisti olarak işlev görür. Bu durum sayesinde de DNA biyosentezini etkilemiş olur. Dihidrofolat redüktaz enzimi hem bakteri hem de memeli hücrelerinde bulunmasına rağmen, bakterideki enzimler trimethoprim'e 50.000 kez daha duyarlıdır (Karakoç, 1994). Epidemiyolojik, laboratuvar ve klinik çalışmalar folik asitin karsinogenezinde önemli bir rolü olduğunu göstermiştir (Abou-Eisha 2006).

Trimethoprim yaklaşık 60 yıldır bakteriyal enfeksiyonların sağaltımında kullanılan önemli bir kemoterapötik olma özelliğini korumaktadır (Akbaş ve Budak, 1998 ).

Trimethoprimle ilgili olarak yapılan çeşitli çalışmalar vardır. Bunlardan bir tanesinde de, ayrı ayrı klastojenik etkili olan trimethoprim, sigara ve radyasyon gibi üç etkenin, birlikte radyoloji teknisyenleri üzerindeki etkisi incelenmiş; kromozomal düzensizliği (CA) nasıl etkileyeceği araştırılmıştır. Trimethoprim dozu artışına bağlı olarak kromozomal düzensizliklerin de arttığı, dozun sabit uygulama süresinin uzatılmasının genotoksik cevabı etkilemediği sonucuna varılmıştır (Akbaş ve Budak, 1998).

## 2. MATERYAL VE METOD

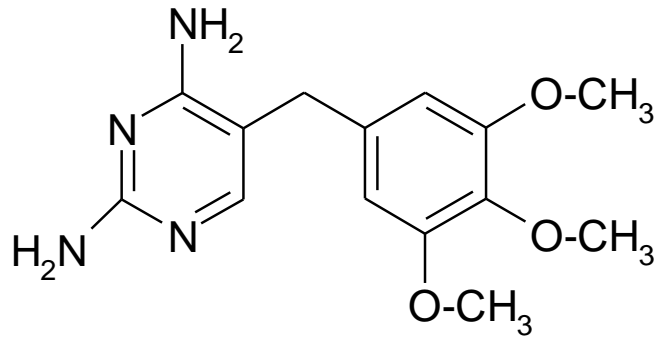
### 2.1. Materyal

#### 2.1.1. Test maddeleri

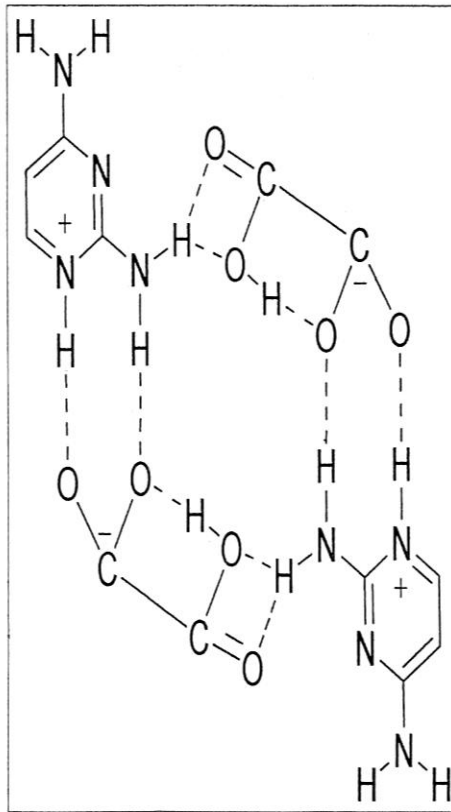
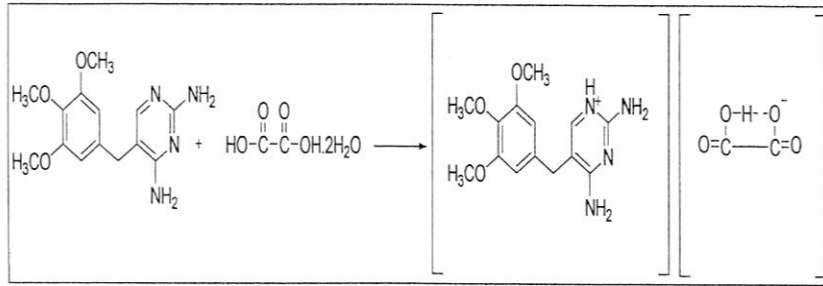
Bu çalışmada genotoksik etkileri araştırılan bazı trimethoprim türevleri; Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Anabilim Dalı öğretim görevlilerinden Yrd. Doç. Dr. Nesrin Beynek tarafından sağlanmıştır. Bu test maddelerinden, 1 numaralı test maddesi: Trimethoprim (TMP) [2,4-Diamino -5-(3',4',5'-trimethoxybenzyl) pyrimidine], 2 numaralı test maddesi: Trimethoprim + Oksalik asit di hidrat, 3 numaralı test maddesi: Trimethoprim + Maleik asit, 4 numaralı test maddesi: Trimethoprim + cis-1-2-sikloheksandikarboksilik asit, 5 numaralı test maddesi: Trimethoprim + Demir (III) Klorür hekza hidrat, 6 numaralı test maddesi: Trimethoprim + Demir (III) Klorür hekza hidrat + Benzil olarak kodlanmıştır.

#### 2.1.2. Test maddelerinin genel kimyasal formülleri

Deneyde kullandığımız test maddelerinin adları ve açık formülleri aşağıda verilmiştir.

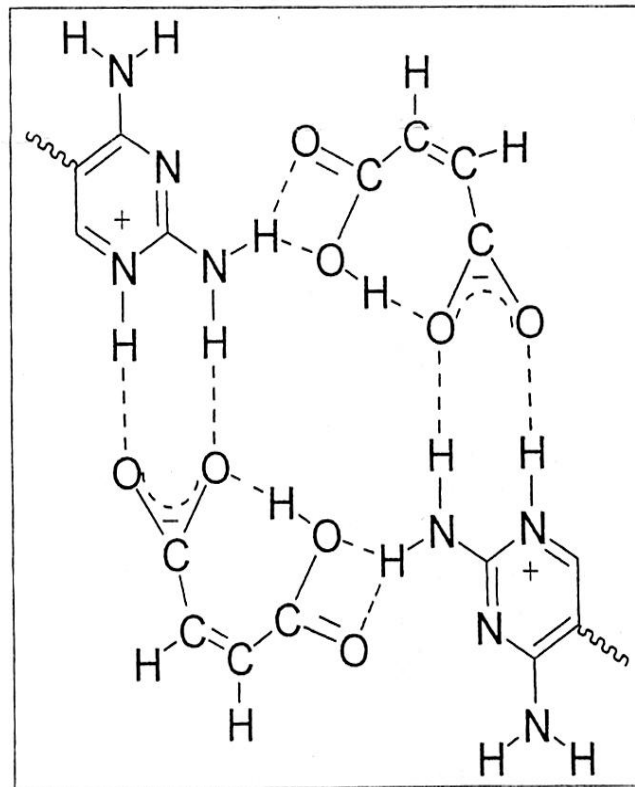
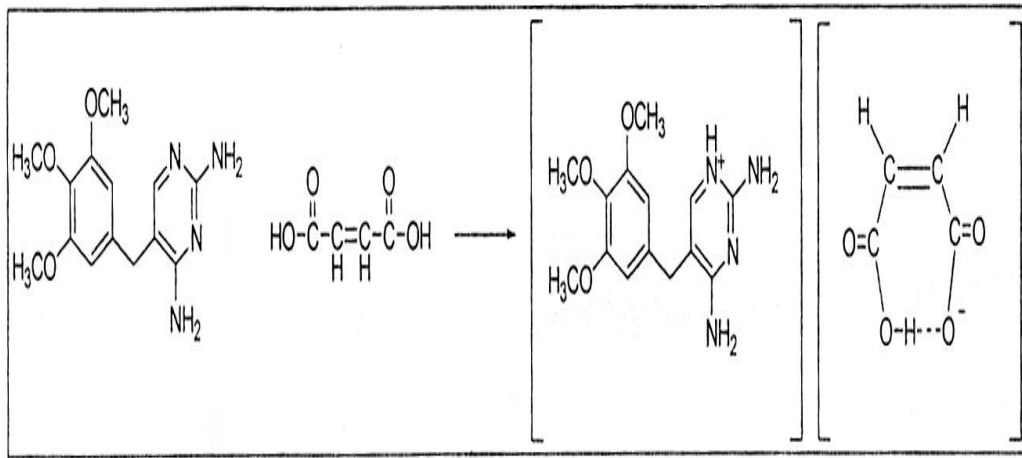


Şekil 2.1. 1 numaralı test maddesi: Trimethoprim(TMP), [2,4-Diamino -5-(3, 4',5'-trimethoxybenzyl) pyrimidine]

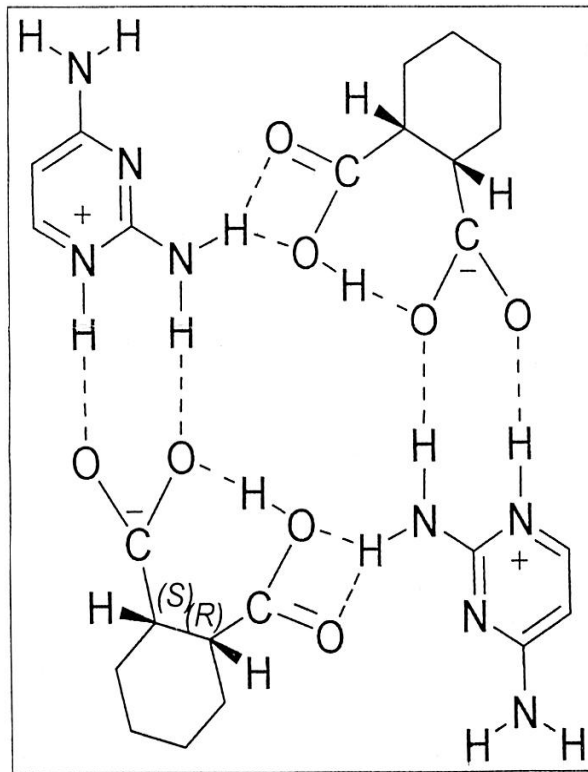
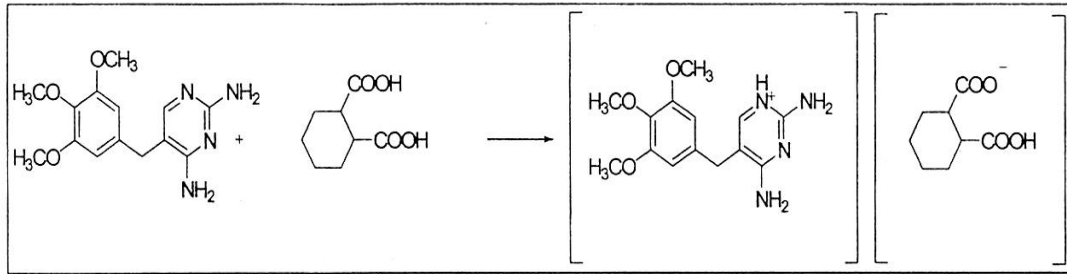


Şekil 2. 2. 2 numaralı test maddesi: Trimethoprim + Oksalik asit di hidrat

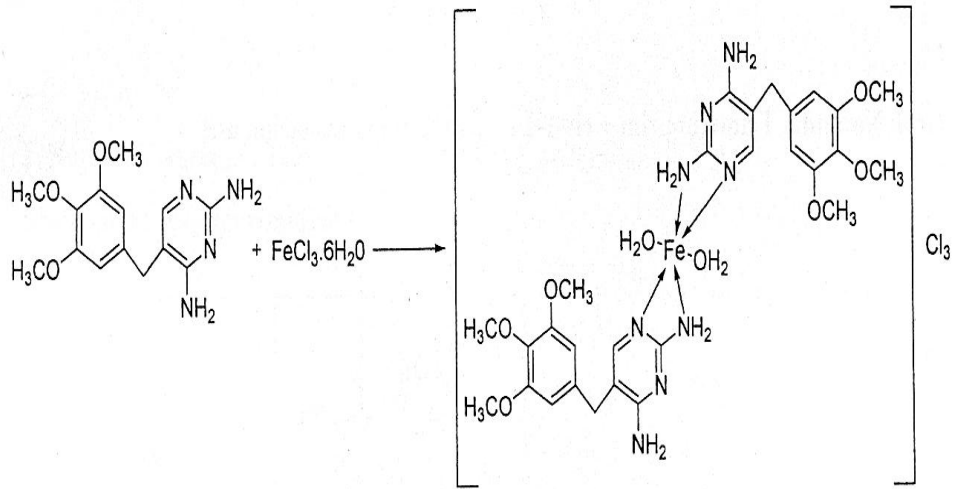




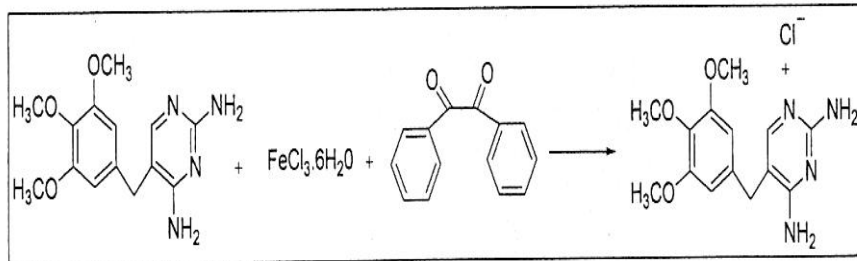
Şekil 2. 3. 3 numaralı test maddesi, Trimethoprim + Maleik asit



Şekil 2. 4. 4 numaralı test maddesi, Trimethoprim + cis-1-2-sikloheksandikarboksilik asit



Şekil 2. 5. 5 numaralı test maddesi, Trimethoprim + Demir (III) Klorür hekza hidrat



Şekil 2.6. 6 numaralı test maddesi, Trimethoprim + Demir (III) Klorür hekza hidrat + Benzil

### 2.1.3. Test maddelerinin dozları ve hazırlanışı

Çalışmada kullanılan test maddelerinin suda çözülüp çözülmediği denenmiş, suda çözülebildikleri görüldüğü için çözücü olarak steril distile su kullanılmıştır. Doz belirlemesi için ilk doz olarak 50µg/ml' lik ilk deneme yapılmıştır. Bu dozun üstündeki dozlarda 1000 binüklead (bn) hücre elde edilemediği için deney dozu olarak bu dozun kullanılmasına karar verilmiştir. Her maddeden 0,0054 gr hassas terazi ile tartılmış 2000µl steril distile suda çözülmüştür. İkinci doz hazırlanırken ilk doz yarı yarıya steril distile su ile seyreltilmiştir. Sonuçta 50 µg/ml ve 25 µg/ml olmak üzere iki doz elde edilmiştir. Bu işlemler steril şartlar altında hücre kültür kabiniinde yapılmıştır. Deney sırasında içinde besi yeri ve kan bulunan tüplere her bir dozdan 50 µl ilave edilmiştir.

### 2.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler

Kromozom Medyum B (Biochrom'dan), Mitomycin C (0.3 µg/ml, Sigma'dan), Cyt-B (6 µg/ml), Giemsa (Fluka'dan), KCL (%0,4'lük), Fiksatif (1:3 metanol: glasiyel asetik asit).

## 2.2. Metod

Bu çalışmada *in vitro* insan periferel kan lenfosit kültüründe, CBMN ( Sitokinezi bloke edilmiş mikronükleus ) tekniği kullanılmıştır.

### 2.2.1. Lenfosit kültürü

Sigara içmeyen, ilaç kullanmayan, 20 -30 yaşları arasında sağlıklı iki erkek bireyden steril koşullar altında alınan kan, 2,5 ml Kromozom Medyum-B bulunan tüplere, 6 'şar damla (0.2 ml) olacak şekilde ilave edilmiş ve % 5 lik CO<sub>2</sub>

inkübatöründe 37 °C de, toplam 72 saat inkübasyona alınmıştır. Bu inkübasyon süreci boyunca test maddelerinin hücrelere uygulanması sırasında herhangi bir kontaminasyona imkan vermemek için bu işlemler hücre kültürü laboratuvarında steril kabinde yapılmıştır.

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

İnsan periferik lenfositlerine, belirli dozlarda hazırlanmış trimethoprim türevleri 24 ve 48 saatlik süreçlerde uygulanmıştır. 24 saatlik uygulama için, kan ekimi yapıldıktan sonra kültür süresinin 48. saatinde, 48 saatlik uygulama için kültür süresinin başlangıcından itibaren 24 saat sonra 2,5 ml Kromozom Medyum B içeren kültür ortamına test maddelerinin hazırlanmış olan dozları eklenmiştir. Maddelerin tüplere eklenmesinin ardından, tüpler tekrar inkübatöre konularak, toplam kültür süresi olan 72 saat bitimine kadar 37 °C 'lik CO<sub>2</sub> li inkübatörde bekletilmiştir. Kültür süresinin başlangıcından sonraki 44. saatte her tüpe sitokinezi engelleyici bir madde olan cyt-B (6µg/ml) ilave edilmiş ve tüpler hafifçe sallanarak karışmaları sağlanmıştır.

### **2.2.3. Lenfositlerin izolasyonu**

72 saatlik kültür süresinin bitiminde, tüpler 1200 rpm' de 15 dakika santrifüj edilmiş, santrifüjden çıktıktan sonra tüplerdeki süpernatant kısımlar atılmıştır. Tüplerin dibinde kalan ve hücrelerin olduğu 0,7 -1 ml' lik sıvı iyice karıştırılarak hücrelerin homojen olarak dağılması sağlanmıştır. Bu işlemin ardından deney günü 2 saat önceden hazırlanmış olan ve 37 °C sıcaklıktaki hipotonik solüsyon (% 0,4 KCL) damla damla ilave edildikten sonra tüpler oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Süre bitiminde 1200 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Tüpün dibindeki 0,7 -1 ml'lik kısım pastör pipetiyle homojenize edildikten sonra, tüpler fiksasyon işlemi için hazır hale gelmiştir. Deneyden birkaç saat önce hazırlanarak buzdolabında bekletilen soğutulmuş metanol glasiyel asetik asit karışımı olan fiksatif damla

damla ve karıştırılarak her tüpe 6 ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Fiksatifin eklenmesi süresi de içinde olacak şekilde toplam 20 dakika tüpler oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 1200 rpm'de tekrar santrifüj uygulamasına geçilmiştir. Santrifüj bitiminin ardından tüplerdeki süpernatant atıldıktan ve çökelti homojenize edildikten sonra tüplere aynı şekilde fiksatif ilavesi yapılmıştır. Bu fiksasyon işlemi 3 defa tekrarlanmıştır. Son fiksasyon işleminin ardından tüpteki sıvının berraklaştığı ve lenfosit hücrelerinin dipte beyaz bir şekilde toplandığı görülmüştür. Üstteki süpernatant kısım dipte 0,5 -0,7 ml sıvı kalacak şekilde atılmış, dipteki hücrelerin olduğu sıvı karıştırılarak preparat yapma işlemine hazır hale getirilmiştir.

#### **2.2.4. Preparatların hazırlanması**

Tüpün dibinde toplanan hücreler pastör pipetiyle homojen olacak şekilde karıştırılmıştır. Pastör pipetine 4 -5 damla olacak şekilde hücre süspansiyonu çekilmiştir. Pastör pipeti, önceden hazırlanmış özel bir düzeneğe tutturularak deney gününden önce temizlenip, saf su içinde buzdolabında saklanan lamaların üzerine belirli bir yükseklikten, farklı alanlara birer damla düşecek şekilde hücre süspansiyonu damlatılmış, hücrelerin lam üzerine dağılması sağlanmıştır. Damlatma işleminin ardından preparatlar oda sıcaklığında kurumaları için 24 saat bekletilmiştir.

#### **2.2.5. Preparatların boyanması**

Lamlar, hazırlanmış olan %5'lik Giemsa boyasında 12 dakika bekletilerek boyanmıştır. Boyama süresi biter bitmez distile sudan geçirilmiş ve dik olacak şekilde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiş, mikroskopik incelemeler yapılmış ve olympus marka mikroskoba bağlı fotoğraf makinasıyla 40X' lik objektifle fotoğraf çekimi yapılmıştır.

### 2.3. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda her iki donörün lenfosit kültüründe meydana gelen iki çekirdekli 1000'er hücredeki mikronükleuslar sayılmış; çözücü kontrol ile diğer maddelerin kontrole göre olan etkinliği Dunnett-t testi kullanılarak analiz edilmiştir.

### 2.4. CPI' nin (Hücre Proliferasyon İndeksi) Saptanması

Test maddelerinin hücre proliferasyon indeksi (CPI) üzerindeki sitotoksik etkisini incelemek amacıyla her bir madde ve doz için preparatlarda herhangi bir yerden başlanarak 1000 hücre içindeki tek çekirdekli, iki çekirdekli ve çoklu çekirdekli hücreler sayılmış ve CPI değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Ayrıca kontrol ve deney grubu CPI değerleri ANOVA programında karşılaştırılarak, istatistiksel anlamlılığı da test edilmiştir.

$$CPI = \frac{B+2P}{M+B+P}$$

B= iki çekirdekli hücre

M= tek çekirdekli hücre

P= üç veya daha çok çekirdekli hücre

M+B+P=Toplam 1000 hücre

### 3. BULGULAR

Çalışmamızda ilaç ve sigara kullanmayan sağlıklı iki kişiden alınan kan örnekleri üzerinde test maddelerimizin genotoksik etkisini incelemek için CBMN tekniği kullanılmıştır. Uygun kültür koşulları altında, 24 ve 48 saatlik sürelerde test maddelerinin farklı iki dozu uygulanarak; kan lenfositleri üzerinde bu maddelerin genotoksik etkisi tespit edilmeye çalışılmıştır. Test maddeleri 50 µg/ml birinci doz ve 25 µg/ml ikinci doz olmak üzere 24. ve 48. saatlerde uygulanmış, pozitif mutajen olarak MMC (mitomisin-c), negatif kontrol olarak steril distile su kullanılmıştır. Deney sonucu elde edilen preparatlardaki 1000 binüklead (iki çekirdekli) hücre içindeki MN sayısı hesaplanmıştır.

Standart istatistiksel veriler Dunnett- t çoklu karşılaştırma testi ile analiz edilmiştir. Her iki donörle yapılan deneyler sonucu her bir doz ve madde için 1000 bn (iki çekirdekli) hücredeki MN frekansı, çözücü kontrolle karşılaştırılarak 24 ve 48 saatlik sürelerdeki MN anlamlılık değerleri standart sapmalara bağlı olarak çizelgeler halinde oluşturulmuştur.

CPI' nın (hücre proliferasyon indeksi) istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucu elde edilen verilerin ANOVA' ya göre anlamsız sonuçta olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara bağlı olarak test maddelerinin hücre proliferasyonu üzerinde sitotoksik etkili olmadığı görülmüştür.



**Çizelge 3. 1.** Trimethoprim'in CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN frekansı ve CPI sonuçları

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	Mn sayısı SS±	CPI
24 saat	Çözücü	50µl	1000	7.5 ± 0.70	0.70
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	11.5± 0,70*	0.41
	Trimethoprim	50 µg/ml	1000	13.0 ± 1.41*	0.37
		25 µg/ml	1000	11.5 ± 2.12	0.44
48 saat	Çözücü	50µl	1000	8.0 ± 0.00	0.68
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	15.5± 0.70**	0.36
	Trimethoprim	50 µg/ml	1000	19.0± 1.41***	0.34
		25 µg/ml	1000	14.5± 0.70**	0.35

Mmc: Mitomisin-c, ± SS: Standart sapma değerleri

\*, \*\*, \*\*\*P≤ 0.05, 0.01, 0.001(Dunnett-t test)

1 numaralı maddemiz olan trimethoprim' in 24 ve 48 saatlik kültür süreleri sonucu meydana getirdiği mikronükleus frekansları istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Dunnet testine göre, çözücü kontrol ile MMC ve Trimethoprim dozlarında meydana gelen MN frekans değerleri karşılaştırıldığında, pozitif mutajen-çözücü kontrol arasındaki sonuçlarındaki anlamlılığın, maddenin 24 saatlik 1. dozunda da görüldüğü belirlenmiştir ( $p \leq 0,05$ ). Sürenin uzamasına bağlı olarak ise MN frekansındaki artış daha yüksek anlamlılıkta çıkmıştır ( $p \leq 0.001$ ). Bu durum maddenin etki süresinin genotoksik etkiyi arttırdığının işaretidir diyebiliriz.

**Çizelge 3. 2.** Trimethoprim + Oksalik asit di hidrat' ın CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN frekansı ve CPI sonuçları

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	Mn sayısı SS±	CPI
24 saat	Çözücü	50µl	1000	9.0± 0.00	0.87
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	11.5± -0.70**	0.31
	Trimethoprim + Oksalik asit di hidrat	50 µg/ml	1000	11.5± 0.70**	0.31
		25 µg/ml	1000	9.0± 0.00	0.35
48 saat	Çözücü	50µl	1000	9.0± 0.00	0.61
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	11.5± 0.70*	0.12
	Trimethoprim + Oksalik asit di hidrat	50 µg/ml	1000	11.5± 0.70*	0.13
		25 µg/ml	1000	9.0± 0.00	0.16

Mmc: Mitomisin-c, ± SS: Standart sapma değerleri

\*, \*\*, \*\*\* P≤ 0.05, 0.01, 0.001 (Dunnett-t test)

Yapısında Trimethoprim ve oksalik asit di hidrat bulunan maddenin kontrol grubu ile karşılaştırmalı 24 ve 48 saatlik sonuçlarına bakıldığında, 1.dozda 24 saatte MMC ile aynı düzeyde  $p \leq 0.01$ ' e göre anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. 48 saatte de  $p \leq 0.05$ ' e göre anlamlılık olduğu görülmektedir. Trimethoprim'in tek başına MN frekansı artışında daha yüksek anlamlılık meydana getirdiği söylenebilir.

**Çizelge 3. 3.** Trimethoprim + Maleik asit' in CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN frekansı ve CPI sonuçları

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	Mn sayısı SS±	CPI
24 saat	Çözücü	50µl	1000	9.0± 0.00	0.87
	Pozitif kontrol(MMC)	0,3µg/ml	1000	11.5± 0.70*	0.31
	Trimethoprim + Maleik asit	50 µg/ml	1000	11.5± 0.70*	0.42
		25 µg/ml	1000	9.5± 2.12*	0.50
48 saat	Çözücü	50µl	1000	8.5± 0.70	0.61
	Pozitif kontrol(MMC)	0,3µg/ml	1000	15.5± 0.70****	0.12
	Trimethoprim + Maleik asit	50 µg/ml	1000	20.5± 0.70****	0.13
		25 µg/ml	1000	18.5± 0.70****	0.17

Mmc: Mitomisin-c, ± SS: Standart sapma değerleri

\*, \*\*, \*\*\*\* P≤ 0.05, 0.01, 0.001(Dunnett-t test)

Trimethoprim + Maleik asit'in 24 ve 48 satlik sonuçları karşılaştırıldığında süreye bağlı olarak her iki dozda da 48 saatte istatistiksel olarak daha yüksek bir anlamlılık ortaya çıkmıştır. Her ne kadar hücre proliferasyonunda bir azalma olduğunu görsek de; diğer tüm maddelerde de olduğu gibi CPI sonuçları istatistiksel olarak anlamsız düzeyde bulunmuştur.

**Çizelge 3. 4.** Trimethoprim + cis-1-2-sikloheksandikarboksilik asit' in CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN frekansı ve CPI sonuçları

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	Mn sayısı SS±	CPI
24 saat	Çözücü	50µl	1000	8.5± 0.70	0.89
	Pozitif kontrol(MMC)	0,3µg/ml	1000	11.5± 0.70*	0.43
	Trimethoprim + cis-1-2-sikloheksandikarboksilik asit	50 µg/ml	1000	17.0±1.41**	0.38
		25 µg/ml	1000	13± 1.41*	0.46
48 saat	Çözücü	50µl	1000	8.5± 0.70	0.76
	Pozitif kontrol(MMC)	0,3µg/ml	1000	15.5± 0.70**	0.38
	Trimethoprim + cis -1-2-sikloheksandikarboksilik asit	50 µg/ml	1000	23.5 ± 2.12***	0.34
		25 µg/ml	1000	15.5± 0.70**	0.34

Mmc: Mitomisin-c, ± SS: Standart sapma değerleri

\*, \*\*, \*\*\* P≤ 0.05, 0.01, 0.001(Dunnett-t test)

Trimethoprim + cis-1-2-sikloheksandikarboksilik asitte, özellikle maddenin ilk dozunda p≤0.001'e göre 48 saatte pozitif mutajenden daha yüksek anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.

**Çizelge 3. 5.** Trimethoprim + Demir (III) Klorür hekza hidrat' ın CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN frekansı ve CPI sonuçları

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	Mn sayısı SS±	CPI
24 saat	Çözücü	50µl	1000	7.5± 0.70	0.19
	Pozitif kontrol(MMC)	0,3µg/ml	1000	11.5± 0.70*	0.10
	Trimethoprim + Demir (III) Klorür hekza hidrat	50 µg/ml	1000	14.5± 0.70**	0.07
		25 µg/ml	1000	11.0± 1.41*	0.10
48 saat	Çözücü	50µl	1000	8.0 ± 0.00	0.16
	Pozitif kontrol(MMC)	0,3µg/ml	1000	16.0± 0.00***	0.07
	Trimethoprim + Demir (III) Klorür hekza hidrat	50 µg/ml	1000	20.0± 0.00***	0.06
		25 µg/ml	1000	16.0± 1.41***	0.07

MMC: Mitomisin-C, ± SS: Standart sapma değerleri

\*, \*\*, \*\*\* P≤ 0.05, 0.01, 0.001 (Dunnett-t test)

Trimethoprimin yapısına demir (III) klorür hekza hidrat'ın eklenmesiyle elde edilen maddenin, doza ve süreye bağlı olarak özellikle 48 saatlik lenfosit kültür sonuçlarına bakıldığında MN frekansında yüksek anlamlılık görülmüştür. Bu durumun metal tuzlarının ortama verdikleri iyon dengesinden kaynaklandığı düşünülebilir.

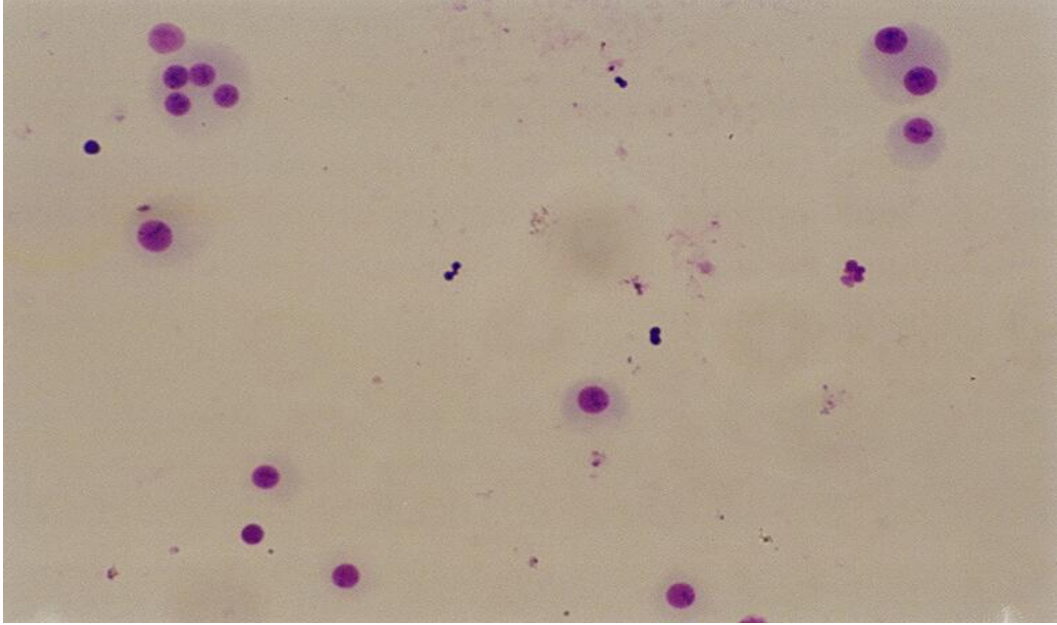
**Çizelge 3. 6.** Trimethoprim + Demir (III) Klorür hekza hidrat + Benzil' in CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN frekansı ve CPI sonuçları

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	Mn sayısı SS±	CPI
24 saat	Çözücü	50µl	1000	9.0± 0.00	0.87
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	11.5± 0.70*	0.31
	Trimethoprim + Demir (III) Klorür hekza hidrat + Benzil	50 µg/ml	1000	13.5± 0.70**	0.26
		25 µg/ml	1000	11.0± 1.41**	0.31
48 saat	Çözücü	50µl	1000	8.5± 0.70	0.61
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	15.5± 0.70***	0.12
	Trimethoprim + Demir (III) Klorür hekza hidrat + Benzil	50 µg/ml	1000	22.5± 0.70***	0.12
		25 µg/ml	1000	20.5± 0.70***	0.14

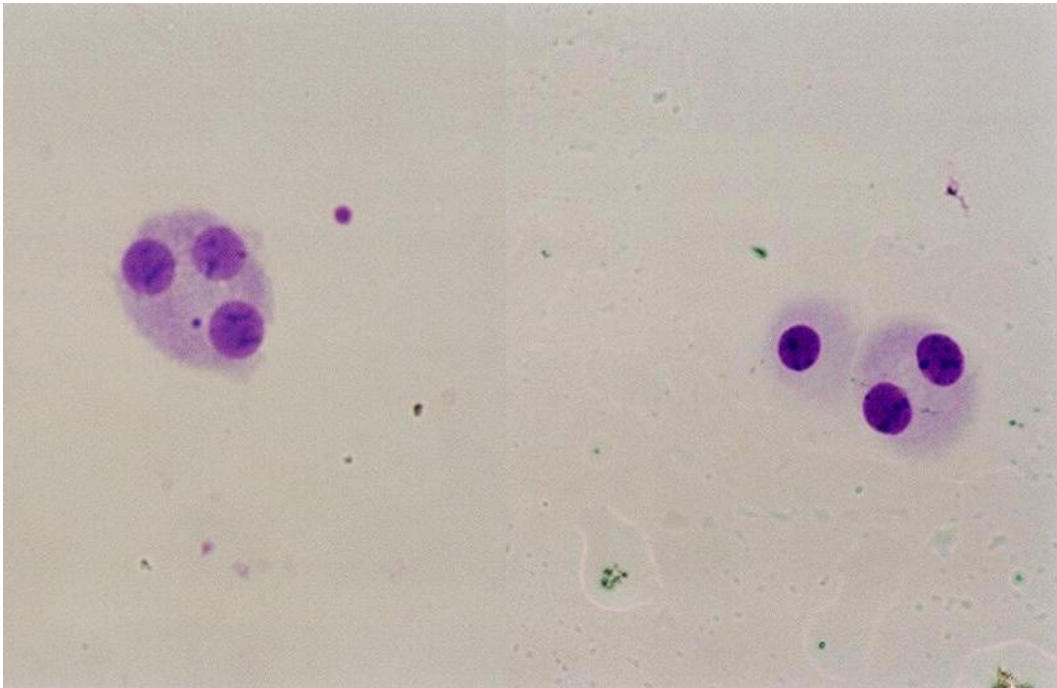
MMC: Mitomisin-C, ± SS: Standart sapma değerleri

\*, \*\*, \*\*\* P≤ 0.05, 0.01, 0.001 (Dunnett-t test)

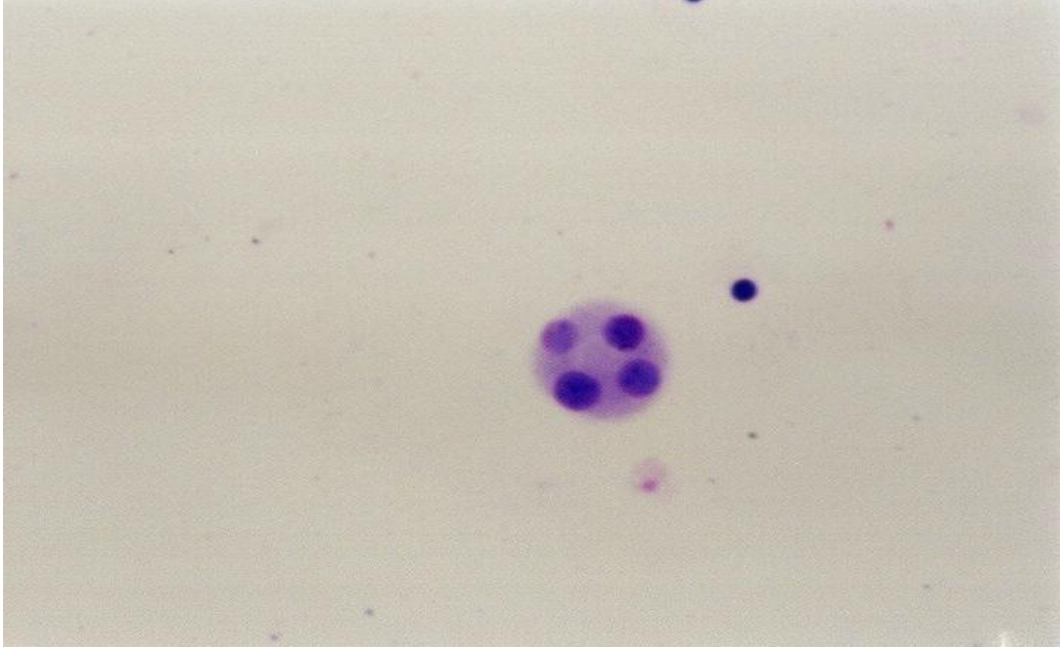
Trimethoprime ek olarak benzil ve Demir (III) Klorür hekza hidrat içeren 6 numaralı test maddesinin MN frekansı oluşturma durumu değerlendirildiğinde yine süreye bağlı olarak ve yapısındaki bileşiklerin de etkisiyle, 48 saatteki istatistiki anlamlılığın 24 saattekenden çok daha yüksek düzeyde olduğu görülmektedir.



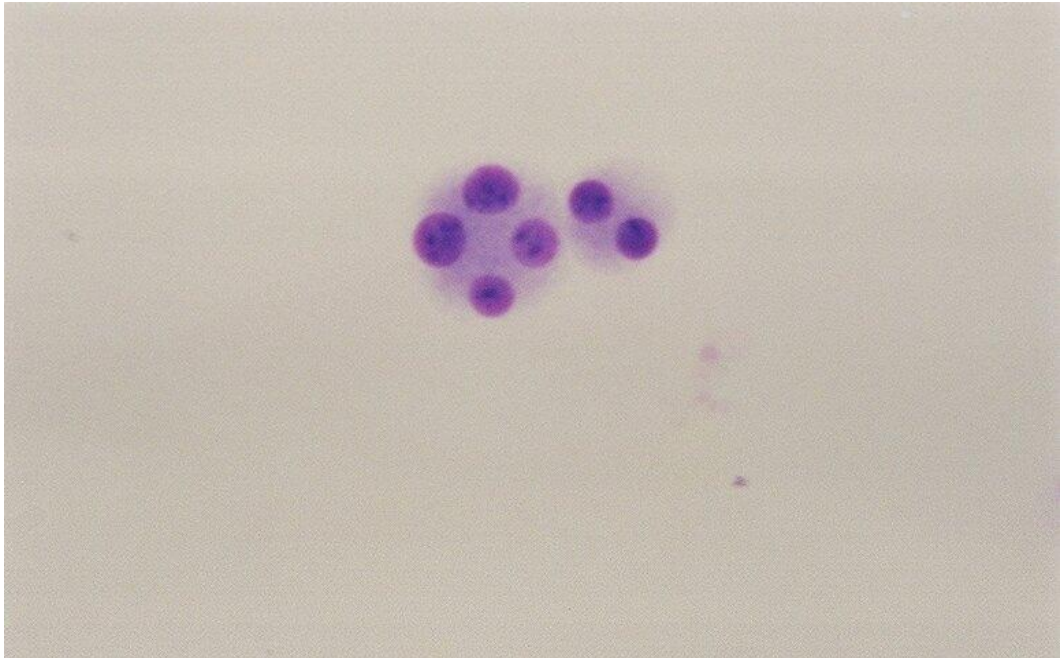
**Şekil 3. 1.** Tek, iki ve dört çekirdekli hücreler



**Şekil 3. 2.** Üç çekirdekli hücre, tek çekirdekli ve iki çekirdekli hücreler

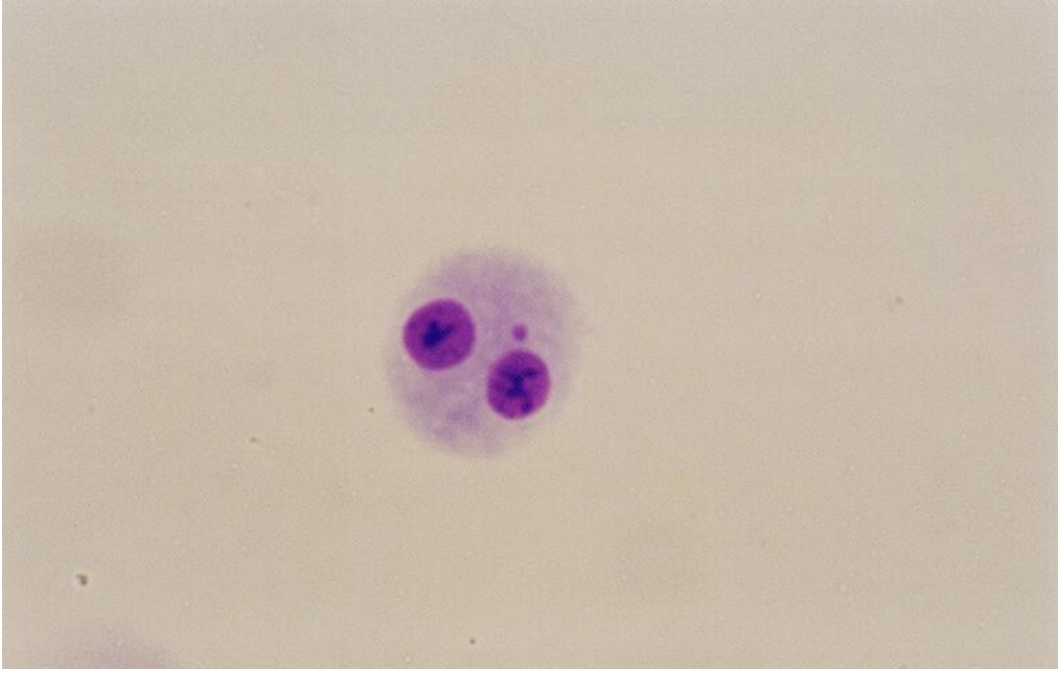


**Şekil 3. 3.** Dört çekirdekli hücre

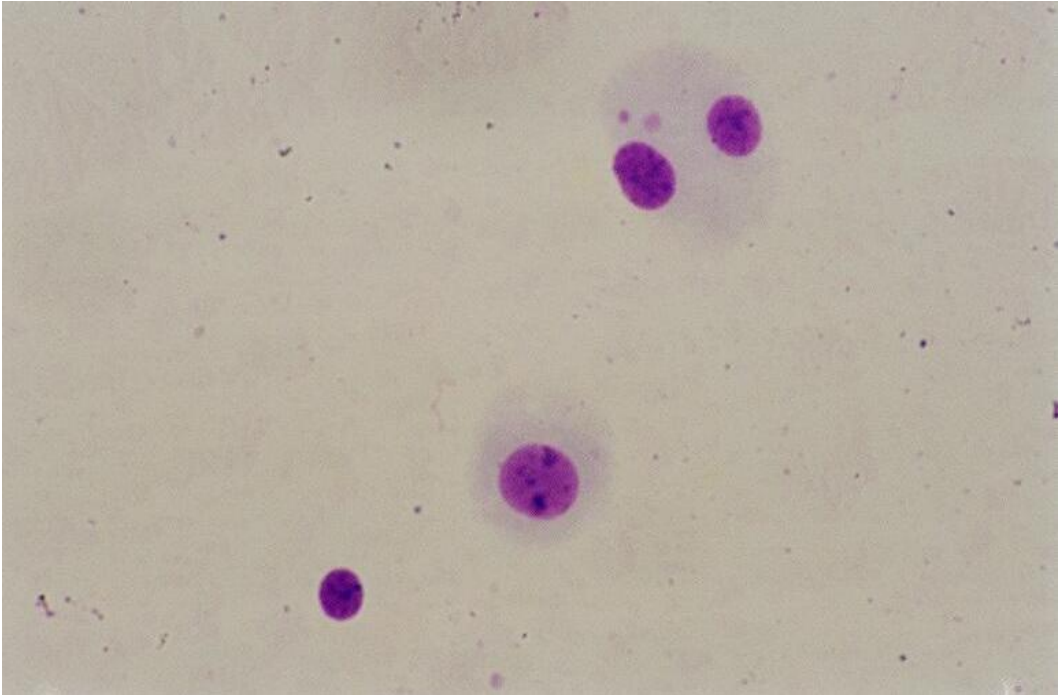


**Şekil 3. 4.** İki ve dört çekirdekli hücreler

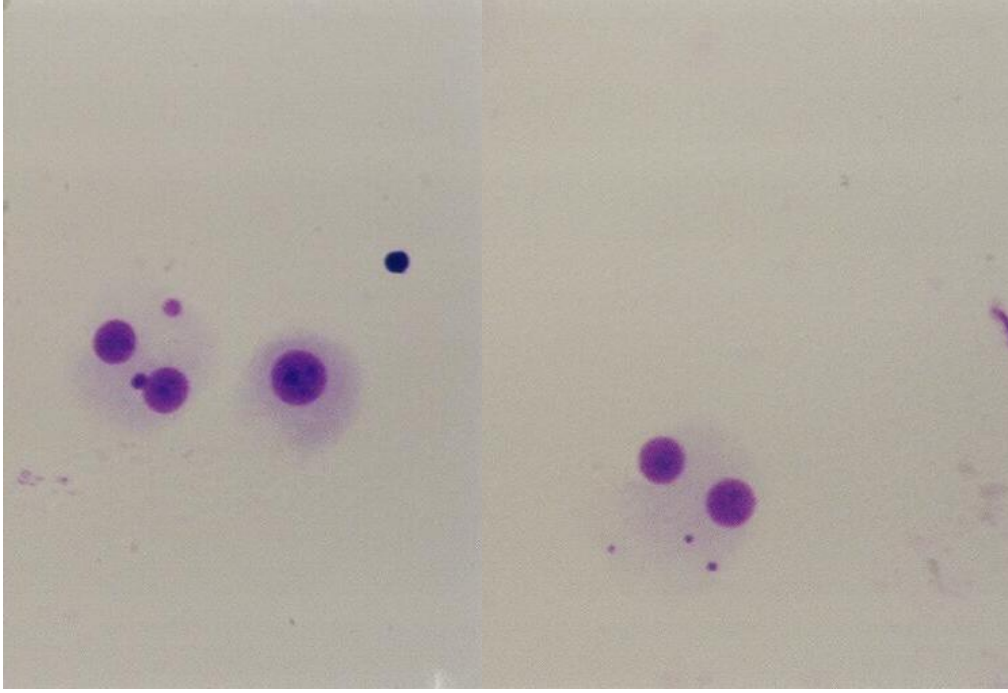




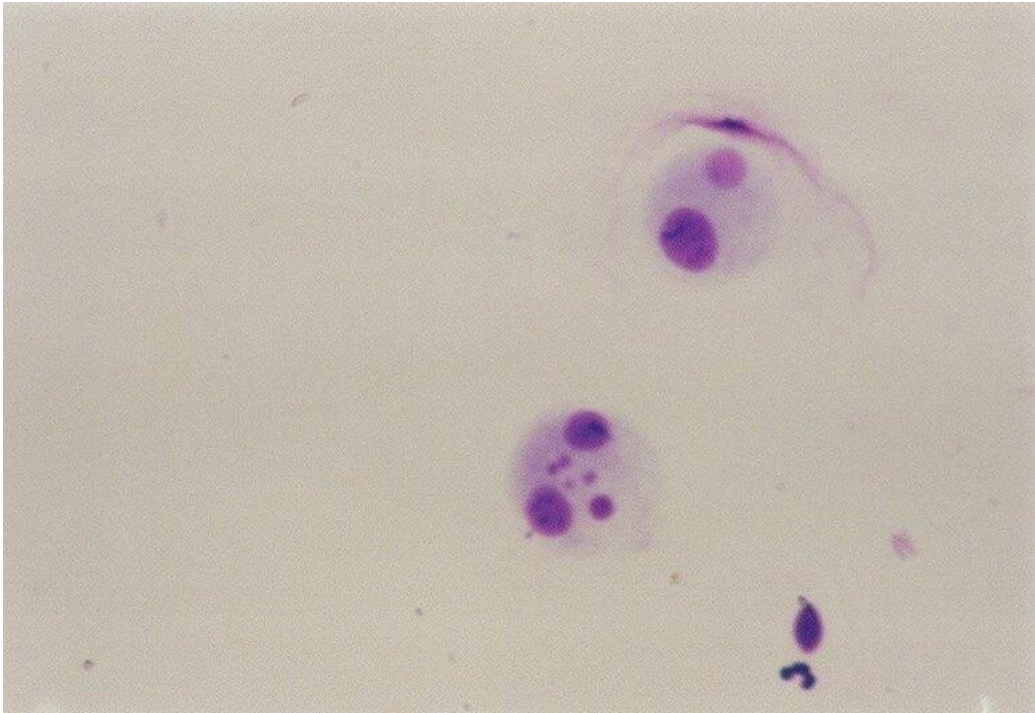
**Şekil 3. 5.** Bir mikronükleuslu binüklead (iki çekirdekli hücre) hücre



**Şekil 3. 6.** İki mikronükleuslu binüklead hücre



**Şekil 3.7.** İki ve üç mikronükleuslu hücreler



**Şekil 3.8.** Beş mikronükleuslu bintiklead hücre

#### 4. TARTIŞMA SONUÇ

İnsanlar bilerek ya da bilmeyerek yüzlerce kimyasal maddeye, ilaca, ksenobiyotiğe, çevresel veya besin maddeleri yoluyla maruz kalmakta (Akay, 2004), bu maruziyet de insanlarda sağlık sorunlarının artmasına yol açmaktadır.

İlaçlar, kozmetik maddeler vb. maddelerin kullanıma sunulmadan önce deneysel olarak toksisitelerinin araştırılması, genetik hasara sebep olup olmayacaklarının belirlenmesi gerekmektedir (Dökmeci, 1994). Özellikle ilaç sektöründe bu çalışmalar insan sağlığı açısından önemli bir yere sahip olduğu için bu alanda ilaçlarla ilgili birçok çalışma olduğu, bu çalışmalar arasında da CBMN tekniğinin avantajlı olmasından dolayı geniş kullanım alanı bulunduğu görülmektedir.

Çalışmamız sonucu elde ettiğimiz verilere dayanarak trimethoprim ve türevlerinin genotoksik etkileri araştırılmaya çalışılmıştır. Maddelerin çözücü kontrolle karşılaştırıldığında 24 saatlik süre sonunda bile  $p \leq 0.05$  ve  $p \leq 0.01$  değerleri içinde bir anlamlılığa sahip oldukları görülmektedir. Bu durum kısa bir sürede de maddelerin dozlarının etkili olduğunu ve MN frekansındaki artışın da bunun biyomarkırı olduğunu açıklamaktadır.

48 saatlik süre sonucu elde ettiğimiz değerleri çözücü kontrolle karşılaştırmalı olarak Dunnet T çoklu karşılaştırma testine göre değerlendirdiğimizde, Trimethoprim + Oksalik asit di hidrat haricinde tüm maddelerin ilk dozları olan  $50 \mu\text{g/ml}$ 'lik dozda  $p \leq 0.001$  düzeyinde yüksek bir anlamlılık olduğu görülmektedir. Bu da uygulanan doza ve süreye bağlı olarak test maddelerinin genotoksik etkili oladıklarına işaret etmektedir denilebilir.

Genotoksik etkisini incelediğimiz maddeler yeni sentezlenmiş maddeler olduğu için, yaptığımız literatür taraması sonucu bunlarla ilgili bir genotoksisite çalışmasına rastlanılmamıştır. Ama trimethoprim ile ilgili bazı genotoksisite çalışmaları bulunmaktadır.

Trimethoprimle yapılan bir çalışmada, trimethoprimin farklı konsantrasyonlarıyla muamele edilen insan lenfosit hücrelerinde MN ve SCE frekansında önemli bir artış olduğu Abou-Eisha ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir (Abou-Eisha ve ark., 1999). Bu durum, bu ilacın primary DNA hasarını

indüklediğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda da kontrol grubuyla ve pozitif mutajenle karşılaştırıldığında dozlarımıza ve etki süresine bağlı olarak trimethoprimin MN sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artışın olduğu ve Abou-Eisha ve arkadaşlarının çalışmasıyla da bu sonuçların desteklendiği anlaşılmaktadır.

Abou-Eisha (2006) , trimethoprim'un insan lenfositlerinde DNA'daki hasara yol açıp açmadığını CBMN, Comet, FISH testleriyle incelemiştir. Sonuç olarak, bu antimikrobiyal ilacın doza bağlı olarak önemli bir klastojenik potansiyeli olduğu anlaşılmıştır. DNA da ki hasar da Comet testiyle kırık seviyesindeki artışla belirlenmiştir. MN frekansındaki artış özellikle yüksek dozlar olan 25 ve 100 µg/ml de görülürken, bizim uyguladığımız 25 ve 50 µg/ml'lik dozlarda da benzer bir MN frekans artışının olması Abou-Eisha'nın çalışmasıyla da benzerlik taşımaktadır. Yalnız bizim çalışmamızda trimethoprim türevli test bileşiklerimizin bu dozlarda MN artışına yol açması, trimethoprime bağlanan bu bileşiklerin trimethoprimin etkisini azaltıcı yönde bir etki göstermediğini; aksine trimethoprimle beraber genotoksik etkili olduklarını da düşündürmektedir. Özellikle Trimethoprim + cis -1 -2-sikloheksandikarboksilik asit, Trimethoprim + Demir (III) Klorür hekza hidrat, Trimethoprim + Demir (III) Klorür hekza hidrat + Benzil' de istatistiksel olarak belirgin oranda bir anlamlılık çıkması bu maddelerin yapısındaki bileşiklerin trimethoprimin genotoksik etkisinin yanında etki gösterdiğine işaret etmektedir. Bu durum MN frekansındaki artışla da desteklenmektedir.

Metallerin de, mutajenlerin kompleks bir sınıfı olduğu bilinmektedir. Metallerin DNA'ya etkisi farklı yollarla olmaktadır. Bu bileşikler DNA'da iplik kırıkları, DNA parçacıkları oluşumuna yol açmakta ve sonuçta genetik materyale etki etmektedirler (Decordier ve Kirsch-Volders, 2006). Metal iyonları, süperoksit anyonları ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile biyolojik sistemlerde hidroksil serbest radikali ve metal-oksijen kompleksleri gibi çok reaktif türleri üretmek için reaksiyona girmekte ve sonuçta oksidatif DNA hasarı oluşturmaktadırlar. Kimyasal karsinogenlerde, metallerin aracılık ettiği oksidatif DNA hasarı önemli rol oynamaktadır (Mercan, 2004).

Metal iyonlarının genotoksik etkilerinin belirlenmesinde MN testinin güvenilir olarak yaygın bir biçimde birçok çalışmada kullanıldığı bilinmektedir. Doza bağlı olarak kandaki metal iyon seviyesindeki artışın genotoksik etkisinde mn frekansının bir biyomarkırı olduğu dikkat çekmektedir. (Vaglenov ve ark., 2001). Çalışmamızda kullandığımız test maddelerinin bazılarının yapısında bulunan metal iyonlarının varlığı (Trimethoprim + Demir (III) Klorür hekza hidrat, Trimethoprim + Demir (III) Klorür hekza hidrat + Benzil) ve bu test maddelerinin MN sayısında pozitif mutajene yakın sonuçlar vermesinin genotoksik etkinin bir işareti olduğunu düşünmekteyiz.

Yapılan bir çalışmada kadmiyum ve kromiyum gibi metallerin tuzuna maruz kalan insan lenfositlerinde tempolün sito ve genotoksik etkisini ölçmek amaçlanmıştır. Metallerin indüklediği apoptozis ve nekroze karşı tempolün koruyucu özellik gösterdiği, metal konsantrasyonu arttıkça tempolün apoptozisi arttırdığı görülmüştür. Sonuç olarak tempolün metallerin arttırdığı MN frekansını azalttığı anlaşılmıştır (Lewinska ve ark., 2008). Bizim çalışmamızda ise, trimethoprime yapısında demir iyonu, klorür iyonu bulunan maddelerin etkisini azaltıcı yönde etki göstermediği görülmektedir.

Bir Demir chelator (tuzu) 'ü olan dfx (desfreioksamin) in genotoksik etkili olup olmadığı CBMN ve Comet testleriyle ölçülmüş ve sonuç olarak bu iki testte de genotoksik etkili olduğu anlaşılmıştır ( Kim ve ark., 2007). Maddelerimizden demir klorürü yapısında bulunduranların CBMN testi sonuçlarına göre diğer maddelere oranla etkisinin daha yüksek olması bu demir tuzlarının trimethoprime ek olarak genotoksik etkisini ortama verdikleri  $Cl^{-1} Fe^{+2}$  iyonları sayesinde oluşturdukları, yapılmış olan önceki çalışmalara da dayanarak söylenebilir. Örneğin yapılan bir çalışmada, kurşun asetat ve kurşun klorid' in V-79 karaciğer fibroblast hücrelerinde MN sayısında doza bağlı olarak artışa yol açtığı görülmüştür (Bonacker ve ark., 2005). Bu da bizim çalışmamızdaki bazı metal tuzlarının MN sayısı artışındaki oranların farklı olmasıyla açıklanabilir. Kısacası MN sayılarındaki fark tuzların ortama verecekleri iyonların birbirlerinin etkilerini azaltmasından da kaynaklanabilir diyebiliriz.

İnsan periferel lenfositlerinde, antimalerial bir ilaç olan fansidarın genotoksik etkisi araştırılmıştır. Bu ilacın doza bağlı SCE, MN frekansında artışa

sebepler olduğu, DNA'da geniş oranda hasara yol açtığı, klastojenik ve anojenik etkili olduğu belirlenmiş, özellikle hamile kadınlarda kullanılmaması gerekliliği sonucuna varılmıştır (Abou-Eisha ve Afifi, 2004). Yalnız fansidarda 100 ve 200µg/ml lik dozlarda görülen hücre proliferasyonundaki azalış, bizim çalışmamızdaki 50µg/ml ve 25µg/ml dozlarda görülmemiştir. Bu durum kullandığımız dozların lenfosit kültüründe sitotoksik etkili olmasından kaynaklanmaktadır.

Antibakteriyel bir ilaç olan metradinazolun insan lenfositlerinde mutajenite ve sitotoksitesisi, mitotik indeks (MI), replikasyon indeksi (RI) ve SCE ile değerlendirilmiş ve bu ilacın genotoksik ve sitotoksik etkili olduğu kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak rapor edilmiştir (Çelik ve Ateş, 2006). Bizim çalışmamızda ise bu antibakteriyel ilacın tersine CPI (hücre proliferasyon indeksi)' da istatistiksel bir fark gözlenmemiştir. Bu durumda test maddelerimizin lenfosit kültürü üzerinde hücre bölünmesi üzerine inhibisyon etkisinden söz edememekteyiz.

Maddelerimizden birisine bağlanmış olan benzilin de besin katkı maddesi olarak veya ilaç, kozmetik, farmakolojik sektörler gibi alanlarda kullanıldığı bilinmektedir (Demir ve ark., 2008).

Bazı benzil türevleriyle ilgili yapılan bir çalışmada, bu maddelerin genotoksitesisi incelenmiş ve yüksek dozlarda genotoksik etkili oldukları görülmüştür. Önceki çalışmalarla ilgili literatür taraması sonucu, benzil türevi olan benzaldehidin Mutamouse ve SCE testinde pozitif sonuçlar verdiği görülmüştür (Demir ve ark., 2008). Test maddelerimiz içinde yapısında benzil'i içeren Trimethoprim + Demir (III) Klorür hekza hidrat + Benzil'in MN sayısında diğerlerine oranla daha etkili olmasının yapısındaki benzil'in de genotoksik etki göstermiş olabileceğinin bir işareti olduğunu düşündürmektedir.

Yapılan bir çalışmada besin katkı maddesi olan askorbik asit, potasyum sorbat ve demir tuzunun mutajenitesi ve DNA hasar oranı Ames ve Rec testleriyle ölçülmüş ve bu üç bileşiğin ayrı ayrı inaktifken, askorbik asit ve demir tuzunun bir arada olma durumunun potasyum sorbatı okside ettiği ve oluşan ürünün mutajenik aktivite ve DNA hasarına yol açtığı görülmüştür (Kitano ve ark., 2002).

Bu çalışma ile bizim çalışmamızı karşılaştırdığımızda farklı bileşiklerin bir arada iken aktif olma durumlarının daha etkili olduğunu söylenebilir.

Sonuç olarak, trimethoprim türevli maddelerimizin insan kan lenfosit kültüründe mikronükleus sayısını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırarak genotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. CPI sonuçları değerlendirildiğinde ise hücre proliferasyonunda anlamlı bir azalma olmadığı dikkat çekmektedir. Daha sonraki çalışmalarda, bu maddelerin genotoksisite ve sitotoksisitesinin diğer test sistemleri ile de ölçülerek, insan sağlığı açısından genotoksik hasar düzeyinin daha kapsamlı olarak belirlenmesiyle kullanımı konusunda veya yeni ilaç sentezlenmesi noktasında daha kesin yargılara varılabileceğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

- Abou-Eisha, A., Creus, A. ve Marcos, R. (1999), *Genotoxic evaluation of the antimicrobial drug, trimethoprim, in cultured human lymphocytes*, Mutation Research, Gen.Tox. Environ. Mut., **440**, 157-162.
- Abou-Eisha, A. ve Afifi, M. (2004), *Genotoxic evaluation of the antimalarial drug, fansidar, in cultured human lymphocytes*, Cell Biology and Toxicology, **20**, 303 -311.
- Abou-Eisha, A., Marcos, R. ve Creus, A. (2004), *Genotoxicity studies on the antimicrobial drug sulfamethoxazole in cultured human lymphocytes*, Mutation Research, **564**, 51-56.
- Abou-Eisha, A. (2006), *Evaluation of cytogenetic and DNA damage induced by the antibacterial drug, trimethoprim*, Toxicology in Vitro, **20**, 601-607.
- Akalın, E. (1994), *Klinik uygulamalarda antibiyotikler ve diğer antimikrobiyal ilaçlar*, Güneş kitabevi Ltd. Şti., Ankara.
- Akay, C. (2004), *Biyomarkörlerin Toksikolojide Kullanımı*, Gülhane Tıp Dergisi, **46**, **1**, 73 -83.
- Akbaş, E. ve Budak, T. (1998), *Sigara İçen Radyoloji Teknisyenlerinde Trimethoprimin Kromozomal Düzensizlikler Üzerine Etkileri*, Tr. J. of Biology, **22**, 99 -109.
- Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E.G., Tice, R., Waters, M. D. ve Aitio, A. (2000), *IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans*, Mutation Research, **463**, 111-172.
- Altıntaş, N., Örenay, S., Asçı, M., Reyhan, E., Türk, M., Yolasığmaz, A. ve Altıntaş, N. (2005), *Karaciger Kist Hidatigi Tedavisinde Albendazol Kullanan Hastalarda Kardes Kromatid Degisimi (KKD) Çalışması*, Türkiye Parazitoloji Dergisi, **4**, 235-237.
- Aydemir, N., Çelikler, S. ve Bilaloğlu, R. (2005), *In vitro genotoxic effects of the anticancer drug gemcitabine in human lymphocytes*, Mutation Research, **582**, 35-41.



- Barile, F. A. (1994), *Introduction to in vitro cytotoxicology mechanisms and methods*, CRC Pres., USA, 150-153.
- Başaran, N. (1999), *Tıbbi Genetik ders Kitabı*, Güneş&Nobel Tıp Kitabevi.
- Başaran, A.A., (2002), “Farmakognozide tek hücre jel elektroforezi uygulamaları” 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, (Ed: K. H. C. Başer ve N. Kırimer), Ankara.
- Bolsover, S. R., Hyams, J.S., Jones, S., Shephard, E.A. ve White, H.A. (1997), *From genes to cell*, Willey-Liss, Inc., New York, USA ,119-130.
- Bonacker, D., Stoiber, T., Böhm, K. J., Prots, I., Wang, M., Unger,E., Thier,R., Bolt, H.M., ve Degen, G. H. (2005), *Genotoxicity of inorganic lead salts and disturbance of microtubule Function*, Environmental and Molecular Mutagenesis , **45**, 346-353.
- Bonassi, S., Ugolini,D., Kirsch-Volders, M., Strömberg, U., Vermeulen,R. ve Tucker, J. D. (2005), *Human Population Studies With Cytogenetic Biomarkers: Review of the Literature and Future Prospectives*, Environmental and Molecular Mutagenesis, **45**, 258-270 .
- Boyacıoğlu, M. (2004), *İzmir körfezi sedimentlerinde direkt mutajenlerin belirlenmesi*, Ege üniv. Su Ürünleri Dergisi, **21**,(1 -2), 23 -27.
- Brown, T. A. (1992), *Genetics a molecular approach*, Chapman&Hall, London, 191 -213.
- Canımoğlu, S. ve Rencüzoğulları, E. (2006), *The Cytogenetic effects of food sweetener maltitol in human peripheral lymphocytes, drug and chemical toxicology*, **29**, 269–278.
- Clements, J. (2000), *The Mouse Lymphoma Assay*, Mutation Research, **455**, 97–110.
- Çelik, A. ve Akbaş, E. (2005), *Evaluation of sister chromatid exchange and chromosomal aberration frequencies in peripheral blood lymphocytes of gasoline station attendants*, Ecotoxicology and Environmental Safety, **60**, 106–112.
- Çelik, A. ve Ateş, N. A. (2006), *The frequency of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocyte treated with metronidazole in vitro*, Drug and Chemical toxicology, **29**, 85 -94.

- Collins, A. R., Dobson, V. L., Dusinska, M., Kennedy, G. ve Stetina, R. (1997), *The comet assay: what can it really tell us?*, Mutation Research, **375**, 183–193.
- Collins, A. R., Dusinska, M. ve Horska, A. (2001), *Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay*, **48**, 611-614.
- Decordier, I. ve Kirsch-Volders, M. (2006), *The in vitro micronucleus test: From past to future*, Mutation research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, **1**, 607.
- Demirel, S. ve Zamani, A. G. (2002), *Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları*, Genel Tıp Derg. **12** (3), 123 -127.
- Derafshani, F. (1997), *Teröpotik Dozda Parasetamol' ün olası Genotoksik Etkisinin Bukkal Epitelyum Hücrelerinde İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniv. , Sağlık Bilimleri Enst., Ankara.
- Dhawan, A., Kayani, M.A., Parry, J. M., Parry, E. ve Anderson, D. (2003), *Aneugenic and clastogenic effects of doxorubicin in human lymphocytes*, Mutagenesis, **18**, 487-490.
- Dougherty, T. J. ve Projan, S. J. (2003), *Mikrobiale genomik ve ilaç keşfi*, Marcel Dekker, Inc., USA
- Dökmeci, İ. (1994), *Akut zehirlenmelerde tanı ve tedavi*, Toksikoloji Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 1 -21.
- Dörter, G., Güçlü, İ., Dalcı, D. ve Köksal, E. M. (2003), *Mikronükleus analiz yöntemi ile uranyum ve zayıflatılmış uranyum'un biyolojik etkilerinin araştırılması*, Çekmece Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi, İstanbul 34149.
- El-Zein, R. A., Schabath, M. B., Etsel, C. J., Lopez, M. S., Franklin, J. D. ve Spitz, M. R. (2006), *Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay as a Novel Biomarker for Lung Cancer Risk*, Cancer , **66**, 12.
- Ergene, S., Çelik, A., Çavaş, T. ve Kaya, F., (2007), *Genotoksik biyomonitörleme çalışması: Göksu Delta: Mikronükleus, kromozomal aberrasyonlar ve kardeş kromatid değişimleri*, Environment International , **33**, 877–885.

- Fairbanks, D. J. ve Andersen, W. R. (1999), *Genetics the continuity of life*, ITP company, USA.
- Fenech, M. ve Morley, A. A. (1985), *Measurement of micronuclei in human lymphocytes*, *Mutation Res.*, **148**, 29-36.
- Fenech, M. ve Morley, A. A. (1986), *Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low-dose X-irradiation*, *Mutation Res.*, **161**, 193-198.
- Fenech, M. (1998), *Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis blocked lymphocytes a biomarker for DNA damage in human populations*. *Mutation Res.* **404**, 155 -165.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W. P., Zeiger, E. ve Bonassi, S. (1999), *The HUMAN MicroNucleus Project—An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans*, *Mutation Research*, **428**, 271–283.
- Fenech, M. (2000), *The in vitro micro nucleus technique*, *Mutation Research*, **455**, 81–95.
- Fenech, M. (2002), *Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology*. *Toxicology* **181 -182**, 411 -416.
- Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. ve Zeiger, E. (2003), *HUMN Project:detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis- block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures*, *Mutation Research*, **534**, 65-75.
- Fenech, M., Bonassi, S., Turner, J., Lando, C., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Bigatti, M.P. Bolognesi, C., Cao, J., De Luca, G., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hadjidekova, V.V., Hrelia, P., Jaworska, A., Joksic, G., Krishnaja, A. P., Lee, T-K., Martelli, A., Mc Kay, M. J, Migliore, L., Mirkova, E., Müller, W-U., Odagiri, Y., Orsiere, T., Scarfi, M. R., Silva, M. J., Sofuni, T., Suralles, J., Trenta, G., Vorobtsova, I., Vral, A., Zijno. A. (2003), *Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human*

- lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. Mut. Res.*, **534**, 45-64.
- Friedberg, E. C., Waliler, G.C.ve Siede, W. (1995), *Dna repair and mutagenesis*, ASM Pres., Washington.
- Ferguson, L. R. ve Denny, W. A. (2007), *Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators*, *Mutat. Res.*, **623** , 14–23.
- Gad, S. C. (2000) , *In vitro Toxicology*, Second Edition, Taylor&Francis, New york-London, 94 -128.
- Göze, İ., Göze, F. ve Çolak, A., (2000), *Dietilbestrol uygulanan farelerde kromozomal aberasyonlar ve genital histopatolojilerinin incelenmesi*, *Türk Patoloji Dergisi* , **16** , 5-9.
- Griffiths, 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.
- Guengerich, F. P. (2006), *Cytochrome P450s and Other Enzymes in Drug Metabolism and Toxicity*, *The AAPS Journal*, **8**, 101-111.
- Guzman, A., de Henestrosa, A. R. F., Marin, A. P., Ho, A., Borroto, J. I. G., Carasa, I. ve Pritchard, L. (2007), *Evaluation of the genotoxic potential of the natural neurotoxin Tetrodotoxin (TTX) in a battery of in vitro and in vivo genotoxicity assays*,. *Mutation Research*, **634**, 14–24.
- Güley, M. ve Vural, N., *Toksikoloji*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları 48, Ankara Üniversitesi, (1978).
- Güven, K. (1999), *Biyokimyasal ve moleküler toksikoloji*, Dicle Üniversitesi Basımevi, Diyarbakır.
- Henderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bourner, C. ve Windebank, S. ( 1998), *The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins*, *Mutagenesis*, **13** ,89-94.
- Hoshi, M., Morimura, K., Wanibuchi, H., Wei, M., Okochi, E., Ushijima, T., Takaoka, K. ve Fukushima, S. (2004), *No-observed Effect Levels for Carcinogenicity and for in vivo Mutagenicity of a Genotoxic Carcinogen*, *Toxicological Sciences*, **81**, 273–279 .

- Iamarcovai, G., Bonassi, S., Botta, A., Baan, R. A. ve Orsi'ere, T. (2008), *Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature*, Mut. Res., **658**, 215-233.
- Iamarcovai, G., Botta, A. ve Orsi'ere, T. (2006), *Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy*, Toxicology Letters, **166**, 1-10.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L. ve Parella, A. (2005), *Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms*, Science of the Total Environment, **346**, 87-98.
- Jacobson-Kram, D. ve Keller, K.A. (2001), *Toxicology testing handbook principles, applications and data interpretation*, Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Karabay, N. U. ve Oğuz, M. G., (2005), *Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos*, Genet. Mol. Res., **4**, 653-662.
- Karakoç, A. (1994), *Piyasada bulunan co-trimoksazol tabletlerinin in vitro değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans tezi, M.Ü. Eczacılık Fakültesi, İstanbul.
- Kaya, F. F. ve Topaktaş, M. (2007), *Genotoxic effects of potassium bromate on human peripheral lymphocytes in vitro*, Mutation Research, **26**, 48-52.
- Kent, C. (1998), *Basic of Toxicology*, John Wiley & Sons, Inc., USA, 229-286.
- Kirkland, D. J. (1990), *Basic mutagenicity tests ukems recommended procedures*, Cambridge university Pres., New York, USA.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Ardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A. (2003), *Report from the in vitro micronucleus assay working group*, Mutation Research, **540**, 153-163.
- Kim, B. M., Choi, J. Y., Kim, Y. J., Woo, H. D. ve Chung, H. W. (2007), *Desferrioxamine (DFX) has genotoxic effects on cultured human lymphocytes and induces the p53-mediated damage response*, Toxicology, **229**, 226-235.

- Kino, K. ve Sugiyama, H. (2001), *Possible cause of G·C→C·G transversion mutation by guanine oxidation product, imidazolone*, Chemistry & Biology, **8**, 369 -378.
- Kitano, K., Fukukawab, T., Ohtsujib, Y., Masuda, T. ve Yamaguchi, H. (2002), *Mutagenicity and DNA-damaging activity caused by decomposed products of potassium sorbate reacting with ascorbic acid in the presence of Fe salt*, Food and Chemical Toxicology, **40**, 1589–1594.
- Korkmaz, M. ve Çolak, A. (2000), *N-Nitrosopirolidin (NPYR)'in Farelerde Sitogenetik Etkileri*, Turk J. Biol., **24**, 1-12 .
- Kulaksız, G. ve Sancar, A. (2007), *Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kanser Türk Biyokimya Dergisi*, **3**, 104 -111.
- Krunic, A., Haveric, S. ve Ibrulj, S. (2005), *Micronuclei frequencies in peripheral blood lymphocytes of individuals exposed to depleted uranium* , Arh Hig Rada Toksikol , **56**, 227-232.
- Lewinska, A., Wnuk, M., Slota, E. ve Bartosz, G. (2008), *The nitroxide antioxidant Tempol affects metal-induced cyto- and genotoxicity in human lymphocytes in vitro*, Mutation Research, **649**, 7–14.
- Lu, F. C. ve Kacew, S. (2002), *Lu's Basic Toxicology*, Taylor&Francis.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Descordier, I. ve Kirsch-Volders, M. (2006), *Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring*, Biochimie, **88** , 1515–1531.
- Maffei, F., Carbone, F., Angelini, S., Forti, G.C., Norppa, H. ve Hrellia, P. (2008), *Micronuclei frequency induced by bleomycin in human peripheral lymphocytes: Correlating blhx polymorphism with mutagen sensitivity*, Mutation Research, **639**, 20–26.
- Mercan, U. (2004), *Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi*, Yüzüncü Yıl Üniv. Veteriner Fakültesi Dergisi, **15**, 91-96.
- Miglani, G. S. ( 2000), *Basic Genetics*, Narosa Publishing House, India, 341-382.
- Moller, P. (2005), *Genotoxicity of Environmental Agents Assessed by The Alkaline Comet Assay* Basic & clinical pharmacology & toxicology, **96**, 1-42.

- Munro, I. C., Williams, G.M., Heymann, H.O. ve Kroes, R. (2006), *Tooth whitening products and the risk of oral cancer*, Food and Chemical Toxicology , **44** , 301–315,
- Neri, M., Fucic, A., Knudsen, L. E., Lando, C. Merlo, F. ve Bonassi, S. (2003), *Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review*, Mutation Research , **544** , 243–254.
- Noel, S., Kasinathan, M. ve Rath, S. K. (2006), *Evaluation of apigenin using in vitro cytochalasin blocked micronucleus assay*, Toxicology in Vitro, **20** , 1168–1172.
- Nohmi, T., Suzuki, T. ve Masumura, K. (2000), *Recent advances in the protocols of transgenic mouse mutation assays* , Mutation Research, **455**, 191–215.
- Norppa, H. (2004), *Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms*, Toxicology Letters **149**, 309–334.
- Norppa, H., Falck, M. ve Ghita, C. (2003), *What Do Human Micronuclei Contain?*, Mutagenesis, **18**, 221–233.
- Ocak, A., Çiçek, A., Zeytinoğlu, H. ve Mercangöz, A. (2002), *Porsuk Çayı Suyunun Bazı Tarım Bitkileri Üzerindeki Ekotoksikolojik Etkileri*, ÇEV-KOR, **11**, 9-13.
- Pai, C. A. (1985), *Foundation of genetics: A science for society*, Kefford Pres, Singapur.
- Rosefort, C., Fauth, E. ve Zankl, H. (2004), *Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay*, Mutagenesis, **19**, 277-284.
- Rossi, D., Aiello, V., Mazzoni, L., Sensi, A. ve Calzolari, E. (2007), *In vitro short-term test evaluation of catecholestrogens genotoxicity*, Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology **105**, 98–105.
- Rothfuss, A., Steger-Hartman, T., Heinrich, N. ve Wichard, J. (2006), *Computational Prediction of the Chromosome-Damaging Potential of Chemicals*, Chem. Res. Toxicol., **19**, 1313-1319.
- Russel, P. J. (1998), *Genetics*, The Benjamin- Cummings publishing company, Inc., Canada, USA.

- Sambamurty, A. V. S. S. (2005), *Genetics*, Alpha Science International Ltd., Harrow, U. K.
- Sarıkaya, R. ve Solak, K. (2003), *Benzoik Asit'in Drosophila melanogaster'de Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Genotoksitesinin Araştırılması*, Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi, **23**, 19-32.
- Soriano, C., Creus, A. ve Marcos, R. (2007), *Gene-mutation induction by arsenic compounds in the mouse lymphoma assay*, Mutation Research , **634**, 40–50.
- Santos, M. F. M. A. , Ferrari, I. ve Luna, H. (2005), Chromosomal aberration analysis in workers exposed to chemical and biological hazards in research laboratories, Environmental Research, **97**, 330–334.
- Sen, S. ve Kar, D. K. (2005), *Cytology and genetics*, Alpha Science International Ltd., Harrow, U.K.
- Shama, A. S. K., Szeto, Y. T., Benzie, I. F. F. ve Tan-un, K. C. (2003), *A Preliminary Study of DNA Damage in Peripheral Lymphocytes from Lung Cancer Patients and Healthy Subjects*, Turk J. Med. Sci., 33, 149-154.
- Snyder, R. D. ve Gren, J. W. (2001), *A review, genotoxicity of marketed pharmaceuticals*, Mutat.Res., Rev. Mutat.Res., **488**, 151-169.
- Suzuki, D. T., Griffiths, A. J. F. ve Lewontin, R. C. (1981), *An introduction to genetic analysis*, W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Suzuki, D. ve Knudston, P. (1990), *Genetics the ethics of engineering life*, Stoddart Publishing Co. Limited, USA.
- Temizkan, G. O. (1994), *Genetik*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, sayı: 3805, Fen Fakültesi, **229**, İstanbul, 181 -228.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C. ve Sasaki, Y. F. (2000), *Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing*, Environmental and Molecular Mutagenesis , **35**, 206-221.



- Ulupınar, M., Okumuş, M. ve Okumuş, İ. (2002) , *Detection of Mutagenic-Carcinogenic Pollutants in Aquatic Systems Using Cytogenetic Methods in Fish*, Turk J Zool., **26**, 141-148.
- Woolley, A. (2003), *A guide to practical toxicology evaluation, prediction and risk*, Taylor&Francis, London.
- Vaglenov, A., Creus,A., Laltchev,S., Petkova, V., Pavlova, S. e Marcos,R. (2001), *Occupational Exposure to Lead and Induction of Genetic Damage*, Environ Health Perspect **109**, 295–298.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B. (2007), *Moleküler Biyoloji*, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- Yüzbaşıoğlu, D.,Ünal, F., Yılmaz, S., Aksoy, H. ve Çelik, M. (2008), *Genotoxicity testing of fluconazole in vivo and in vitro*, Mutation Research, **649**, 155–160.
- Zhang, Z., Che,W., Liang, Y., Wu, M., Li, N., Shu, Y., Liu, F., Wu, D. (2007), *Comparison of cytotoxicity and genotoxicity induced by the extracts of methanol and gasoline engine exhausts*, Toxicology in Vitro, **21** ,1058–1065.