

**BAZI RUTENYUM BİLEŞİKLERİNİN
MUTAJENİK AKTİVİTELERİNİN
AMES TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Elif ERGİN

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Şubat, 2009

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Elif Ergin'in "Bazı Rutenyum Bileşiklerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames Testi İle Araştırılması" başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalı'ndaki, Yüksek Lisans Tezi 22.01.2009 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Yard. Doç. Dr. FİLİZ ALANYALI
Üye	: Prof. Dr. AHMET ÖZATA
Üye	: Yard. Doç. Dr. SEVİL ŞENTÜRK

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

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI RUTENYUM BİLEŞİKLERİNİN MUTAJENİK AKTİVİTELERİNİN AMES TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

Elif ERGİN

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yard. Doç. Dr. Filiz ALANYALI

2009, 54 sayfa

Bu çalışmada, 6 ayrı rutenyum türevinin ve cisplatinin mutajenik etkilerinin Ames/*Salmonella* testi ile belirlenmesi ele alınmıştır. Denede *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. TA98 suşunda çerçeve kayması, TA100 suşunda nokta mutasyonu vardır. TA98 suşu için spontan koloni sayısı 20-50, TA100 suşu için ise 125-200 kolonidir. Pozitif kontrol olarak TA100 suşuna sodyum azid, TA98 suşuna 4_nitro_o_fenilendiamin uygulanmıştır. *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 bakterisi suşlarının genotip kontrolleri yapılmıştır. 6 ayrı rutenyum türevinin ve cisplatinin sitotoksik etkileri saptanarak toksik olan ve toksik olmayan dozlar belirlenmiştir. TA98 ve TA100 suşlarına uygulanan 6 ayrı rutenyum türevinin ve cisplatinin gösterdiği mutajenik etkiler doza bağlı cevap eğrisi şeklinde grafik oluşturularak gösterilmiştir. Grafiklerden elde edilen bulgulara göre TA98 ve TA100 suşları için 6 ayrı rutenyum türevinin ve cisplatinin mutajenik etkileri karşılaştırılarak sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: 6 ayrı rutenyum türevi ve cisplatin, Ames/*Salmonella* testi, *Salmonella typhimurium*, mutajenite.

ABSTRACT**Master of Science Thesis****ANALYSING THE MUTAGENIC EFFECTS OF
SOME RUTHENIUM COMPOUNDS BY AMES TEST****Elif ERGİN****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program****Supervisor: Assist. Prof. Dr. Filiz ALANYALI****2009, 54 pages**

In this study, defining the mutagenic effects of 6 ruthenium derivatives and cisplatin were approached by Ames/*Salmonella* test. In the test, TA98 and TA100 strains of *Salmonella typhimurium* were used. TA98 strain has frameshift mutation, TA100 strain has base-pair substitution. Spontane colony number for TA98 is 20-50 and for TA100 is 125-200. Sodium azid was applied as a positive control for TA100, 4_nitro_o_phenilendiamin was applied for TA98. Genotype controls of TA98 and TA100 bacterial strains of *Salmonella typhimurium* were accomplished. Toxic and nontoxic doses were determined by defining cytotoxic effects of 6 ruthenium derivatives and cisplatin. The mutagenic effects of 6 ruthenium derivatives and cisplatin, which were exposed to TA98 and TA100 strains, were shown as dose dependent respond curve by drawing graphics. According to findings from graphics, matching the mutagenic effects of 6 ruthenium derivatives and cisplatin on TA98 and TA100 strains were submitted.

Keywords: 6 ruthenium derivatives and cisplatin, Ames/*Salmonella* test, *Salmonella typhimurium*, mutagenicity.

TEŞEKKÜR

Çalışmamda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ve tezimin değerlendirilmesindeki katkılarından dolayı danışman hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Filiz ALANYALI'ya; kendisinden Ames testini öğrendiğim ve bu testin yapılıp değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Araştırma Görevlisi Öge ARTAGAN'a; test edilen kimyasal maddeleri kendisinden aldığım Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim elemanlarından Sayın Doç. Dr. Kadriye BENKLİ'ye, test suşlarını aldığım Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim elemanlarından Sayın Doç. Dr. Nuran DİRİL'e teşekkürlerimi sunarım.

Benden desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen, benim için her zaman olağanüstü bir anne baba olan Nilgün-Sinan ERGİN'e, daima yanımda olarak bana güç ve moral veren canım ablam Saliha Elvan ERGİN'e sonsuz sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Elif ERGİN

Şubat-2009

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
GRAFİKLER DİZİNİ	viii
1.GİRİŞ	1
1.1. Mutasyon.....	4
1.2. Mutasyon Çalışmaları.....	5
1.3. Mutasyon Çeşitleri.....	5
1.3.1. Kromozom Yapısının Değişmesi.....	5
1.3.2. Kromozom Sayısının Değişmesi.....	5
1.3.3. Gen Mutasyonları.....	6
1.3.3.1. Baz Değişimleri (Nokta Mutasyonları).....	7
1.3.3.2. İnsersiyon.....	7
1.3.3.3. Delesyon.....	8
1.3.3.4. Gen Mutasyonlarının Sınıflandırılması.....	8
1.3.3.5. Mutasyon Oluşum Mekanizmaları.....	11
1.4. Mutasyon Sebepleri ve Etkileri.....	16
1.5. Rutenyum Türevleri ve Cisplatin.....	17
1.5.1. Rutenyum Türevlerinin Açık ve Kapalı Formülleri.....	20
2. MATERYAL VE YÖNTEM	24
2.1. Materyal.....	24
2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	24
2.1.2. <i>Salmonella typhimurium</i> Test Suşları.....	24
2.1.3. Test Maddelerinin Dozları ve Hazırlanışı.....	24
2.1.4. Denede Kullanılan Çözelti ve Ortamların İçerikleri ve Hazırlanmaları.....	25
2.2. Yöntem.....	31

2.2.1. <i>Salmonella</i> Suşlarının Kùltürlerinin ve Master Plakların Hazırlanması.....	31
2.2.2. <i>Salmonella</i> Suşlarının Saklanması ve Stok Kùltürlerin Açılması.....	31
2.2.3. <i>Salmonella</i> Suşlarının Kontrol Testlerinin Yapılması (Bakterilerin Genotiplerinin Kontrol Edilmesi).....	32
2.2.3.1. Histidin Gereksinimi Kontrolü.....	33
2.2.3.2. Rfa Mutasyonu Kontrolü.....	34
2.2.3.3. UVrB Mutasyonu Kontrolü.....	35
2.2.3.4. R Faktör Varlığı Kontrolü.....	37
2.2.3.5. Spontan Olarak Geriye Dönüş Sıklığının Kontrolü.....	38
2.2.4. Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması.....	39
2.2.5. Ames Mutajenite Testinin Yapılışı.....	39
2.2.5.1. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	40
3. BULGULAR	41
3.1. Rutenyum Türevlerinin ve Cisplatin'in Mutajenik Aktivitelerinin Ames Testi ile Ölçülmesi.....	41
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	47
KAYNAKLAR.....	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.3.3.1. Baz Değişimleri (Nokta Mutasyonları.....	7
1.3.3.3. Nükleotit İnsersiyonu ve Delesyonu.....	8
1.3.3.5.4.1. Deaminasyon Reaksiyonu.....	14
1.3.3.5.5. Timin Dimerleri.....	16
1.5.1. Rutenyum'un Kimyasal Yapısı.....	17
1.5.2. Cisplatin'in Kimyasal Yapısı.....	18
1.5.1.1. RuL ₂ BPt'nin açık formülü.....	20
1.5.1.2. RuL ₃ BPt'nin açık formülü.....	20
1.5.1.3. RuL ₄ BPt'nin açık formülü.....	21
1.5.1.4. RuL ₅ BPt'nin açık formülü.....	22
1.5.1.5. RuL ₆ BPt'nin açık formülü.....	22
1.5.1.6. RuL ₇ BPt'nin açık formülü.....	23
2.1.a. TA98 suşunun master plaklarda üremesi.....	32
2.1.b. TA100 suşunun master plaklarda üremesi.....	32
2.2.a. TA98 suşunun HB plağında Histidin gereksinimi kontrolü.....	33
2.2.b. TA100 suşunun HB plağında Histidin gereksinimi kontrolü.....	33
2.2.c. TA98 suşunun MGA plağında Histidin gereksinimi kontrolü.....	34
2.2.d. TA100 suşunun MGA plağında Histidin gereksinimi kontrolü.....	34
2.3.a. TA98 suşunun NA plağında Rfa mutasyonu kontrolü.....	35
2.3.b. TA100 suşunun NA plağında Rfa mutasyonu kontrolü.....	35
2.4.a. UV'ye maruz bırakılmayan TA98 suşunun UVrB mutasyonu kontrolü.....	36
2.4.b. UV'ye maruz bırakılmayan TA100 suşunun UVrB mutasyonu kontrolü.....	36
2.4.c. UV'ye maruz bırakılan TA98 suşunun UVrB mutasyonu kontrolü.....	36
2.4.d. UV'ye maruz bırakılan TA100 suşunun UVrB mutasyonu kontrolü.....	37
2.5.a. TA98 suşunun HBA plağında R faktör varlığı kontrolü.....	37
2.5.b. TA100 suşunun HBA plağında R faktör varlığı kontrolü.....	38
2.6.a. TA98 suşunun MGA plağında spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü.....	38
2.6.b. TA100 suşunun MGA plağında spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü.....	39

KISALTMALAR DİZİNİ

VBM	: Vogel Bonner Medium E (50X)
MgSO ₄ .7H ₂ O	: Magnezyum sülfat
K ₂ HPO ₄	: Dipotasyum sülfat
MGA	: Minimal Glikoz Agar
HB çözeltisi	: Histidin-Biyotin çözeltisi
HBA plakları	: Histidin-Biyotin-Ampisilin plakları
SAZ	: Sodyum azid
NPD	: 4_nitro_o_fenilendiamin
DMSO	: Dimetil sülfoksit
HB	: Histidin-Biyotin
NA	: Nutrient agar
NB	: Nutrient Broth
phen	: 1,10-fenantrolin
dp	: 1,10-fenantrolin-5,6-dion
ip	: imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolin
pip	: 2-fenilimidazo[4,5-f][1,10]fenantrolin
dap	: diaminofenantren
dan	: diamino naftalen
aq	: aminokinolin
bipp	: bis-1,3-di(imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolin) propan

GRAFİKLER DİZİNİ

RuL ₂ BPt'nin TA98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	42
RuL ₂ BPt'nin TA100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	42
RuL ₃ BPt'nin TA98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	42
RuL ₃ BPt'nin TA100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	43
RuL ₄ BPt'nin TA98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	43
RuL ₄ BPt'nin TA100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	43
RuL ₅ BPt'nin TA98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	44
RuL ₅ BPt'nin TA100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	44
RuL ₆ BPt'nin TA98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	44
RuL ₆ BPt'nin TA100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	45
RuL ₇ BPt'nin TA98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	45
RuL ₇ BPt'nin TA100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	45
Cisplatin'in TA98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	46
Cisplatin'in TA100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.....	46

1.GİRİŞ

Kanserojen ve mutajen maddelerin önemli özelliklerinden biri, çok düşük konsantrasyonlarda bile etkili olabilmeleridir. Mevcut kimyasal yöntemlerle dokularda bulunan bu tür maddelerin kimyasal yapılarının analitik şekilde tespiti mümkün değildir. Kimyasal yöntemlerle bu maddelerin tespit edilmesi mümkün olmadığı için, biyolojik yöntem ve indikatör canlıların dokularında kanserojen ve mutajen madde taraması esasına dayanan yöntemler önem kazanmıştır [1].

Çevremizde bulunan ve biyolojik etkileri henüz bilinmeyen milyonlarca sentetik ve doğal maddenin, karsinojenik potansiyel açısından test edilmesi sağlık açısından gereklidir. Kimyasal maddelerin karsinojenik etkilerini ortaya çıkarmak için en akılcı yaklaşım laboratuvar hayvanlarında tümör indüksiyonudur. Ancak laboratuvar hayvanları ile yapılan karsinojenite deneyleri hem çok pahalı hem de çok zaman almaktadır. Bu nedenle, canlı hayvan deneyleri yerine kimyasal maddelerin kanserojenik potansiyellerini ölçebilmek için son yıllarda birçok in vitro bakteriyel test sistemi geliştirilmiştir. Bakteriyel testler bakterilerin basit üreme ortamlarında hızlı üreyebilmeleri, çabuk ve kolay uygulanabilir olmaları nedeni ile tercih edilmektedir. Kısa zaman içinde sonuçlanan bu testlerle, kimyasal maddelerin belirli genetik özelliklerde oluşturduğu sonuçlara yol açıp açmadıkları ölçülmekte ve elde edilen sonuçlarla maddelerin karsinojenik potansiyelleri arasında ilişkiler kurulmaktadır [1].

Karsinojenlerin taranmasında mutajenitenin esas alınmasının sebebi genetik kodun, genetik sistemin evrensel oluşu ve mutajenite ile karsinojenite arasındaki korelasyonun yüksek oluşudur [1].

Kısa zamanlı testlerden olan *Salmonella* testi, etkinliği, ucuz olması ve hızlı uygulanabilirliği nedeniyle yaygın olarak kullanılan ve iyi şekilde karakterize edilmiş bir testtir. Dr. Bruce Ames ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan bu testin karsinojenik ve mutajenik maddeleri tespit etme konusundaki hassasiyeti oldukça yüksektir [1].

Kötü huylu tümörler arasında, üst solunum yolları skuamöz hücre kanserleri dünya çapında 6. sıradadır ve ülkeler arasında erkeklerde ilk sırayı Hindistan almaktadır. Ortalama ölüm oranı her yıl için yaklaşık 2000 civarındadır. Başlıca oral bölge kanserleri davranışla bağlantılı bireysel sağlığın sonucu olarak ve karsinojenlere maruz kalınmasıyla dikkat çekmektedir. Genç hastalarda genetik değişkenliğe oral skuamöz hücre kanseri oluşumunun neden olabileceği

düşünülmüştür. Üst solunum yollarındaki karsinojenlerin olası etiolojik kofaktörleri olan oral etkilerin önemi farklı olarak değerlendirilir. Bu bakış açısına karşılık, günümüz araştırmaları tümör markırlarının yardımı ile kanser hastalarını ayrı ayrı tedavi etmeyi amaçlamaktadır. Bir başka deyişle, üst solunum yollarındaki karsinojenleri içeren bireysel risk görünümleri gelecekte biyomarkırların yardımı ile ortadan kaldırılabilir [2].

Ames testi genotoksisite kontrolü için sağlam bir prosedürdür. *Salmonella typhimurium*'un histidin eksikliği olan TA98 ve TA100 mutant türlerinin atasal tipe karşılık, histidin sentezleme yetenekleri yoktur ve histidinsiz ortamlarda üreyemezler. Genotoksik maddelerin etkileri altında, hücreler histidin oksotrofundan histidin prototrofuna değişirler. Günümüz in vivo deneyleri Ames testinin klinik uygulaması ve bir genotoksik potansiyel anlamında tükürük değeri ile diş yapısı arasındaki olası ilişkinin araştırılmasını amaçlaması ile ortaklaşa yürütülmektedir. Bireysel oral hijyenik alışkanlıkları neyin geliştirdiğinin araştırılması planlanmaktadır ve hastaların prostetik durumlarının olduğu kadar kariyolojik ve periyodontal durumlarının alkol ve içki tüketimine bağlı olmasının yanında tükürük kalitesi üzerine etkisi vardır [2].

Bununla ilgili yapılan bir çalışmada, 52 erkek ve 48 dişi aday kullanılmıştır. Adayların ortalama yaşları 42 civarındadır. Çalışma sonuçları tablolar halinde gösterilmiştir ve toplam grup anamnez, ekzojen zararlı etkiler, bireysel oral hijyen alışkanlıkları ve diş yapısı kanserleri açısından büyük değişkenlik göstermiştir. Sonuçların Ames testi bulguları ile önemli ilişkisi istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. TA98 ve TA100 türlerinin her ikisi için indüksiyon faktör değerleri minimum 0.69 ile maksimum 2.69 arasında dağılım göstermiştir. *S.typhimurium* türlerinin hepsi için alınan karar, bahsedilen kanser türlerinin %67'sinde genotoksik aktivite göstermemesidir. 100 durumdan 7'sinde ise TA98 ve TA100 türlerinin genotoksik aktivite göstermeleridir. Örneklerin %18'i TA98 ile genotoksik aktivite gösterirken, %8'i sadece TA100 ile genotoksik aktivite göstermiştir [2].

Nikel bilinen insan karsinojenlerinden biridir. 1930'larda burun boşluğu kanserleri nikel madenlerinde çalışanlarda görülmüştür ve o zamandan beri kaynak yapanlarda, elektro-arıtmada ve diğer mesleki gruplarda nikel maruz kalan çalışanlarda akciğer ve burun kanserleri meydana gelmektedir. Ni^{2+} , $NiCl_2$ gibi nikelin çoğu ortak iyonik bileşiklerinden okside edilmiş halidir. Çözülebilir ve çözülmemeyen Ni^{2+} bileşikleri genellikle uygulamadaki tümörleri başlatan hayvan çalışmalarındaki karsinojenlerdir. Özellikle nikelin çözülebilir az bir formu vücutta uzun süre

kalmaktadır ve hızlıca temizlenebilen çözülebilir Ni^{2+} tuzlarından daha zararlıdır. Nikel toksisitesinin mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır [3].

Nikel toksik aktivitesi için çoğu olası mekanizma bulunmuştur ama tek bir örnek etkili olmamıştır. Birkaç pozitif rapora göre nikelin direk mutajenik aktivitesi için birkaç çalışma bulunmaktadır. Bunlardan kardeş kromatid değişimi indüksiyonu ve indirek genotoksik aktivite ölçümü Ames/*Salmonella* test sistemi ile incelenmiştir [3].

Kanser hastalığının hala yaygın olması ve günümüzde teknolojinin ilerlemesine karşın bu hastalığın ortadan kaldırılamaması kanserin temelini oluşturan maddelerin belirlenmesi gereğini ortaya koymuştur. Her gün artan kimyasal maddelerin mutajenik, karsinojenik etkilerinin saptanması çalışmalarına katkıda bulunmak için 6 ayrı rutenyum türevi ve cisplatinin mutajenik aktivitesinin kısa zamanlı test sistemi olan Ames/*Salmonella* testi uygulanarak araştırılması amaçlanmıştır [4].

Günümüzde, rutenyum bileşiklerinin sitotoksik ve mutajenik etkilerinin araştırılması önemli bir artış göstermiştir. Son birkaç yılda, DNA'ya nonkovalent olarak bağlanan $[Ru(phen)_3]_2$ gibi hareketli metal iyonu içeren ikili bağlanan oktahedral bileşikler ilgi alanı oluşturmuştur [5-13]. Rutenyum(II)'un üçlü bileşiklerinin DNA'ya bağlanmada ayna görünümü seçiciliği oynadığı bildirilmiştir. Literatürde 9,10-phenanthrenequinone diimine (phi) bağı içeren birkaç metal bileşik örneği bulunmaktadır [14-25]. Oktahedral bileşiklerin DNA ikili yapısının korunmasında transkripsiyonu inhibe eden quinone diimine bağlarını işleme yeteneği araştırılmıştır. A. M. Pyle ve J.K. Barton'un 1987'deki çalışmasında $[Ru(phi)_3]Cl_2$ bileşiğini sentezlemeleri rehberlik etmiştir ve metal iyonundan uzakta bulunan geniş bir hidrofobik yüzeye sahip düzlemsel bir bağ olduğu, bağ üzerindeki imin protonlarının Lewis baz çiftleri ile hidrojen bağı yapabildiği ve phi bağının potansiyel elektron akseptör yeteneğinde olması yanında metal iyon merkezine yakın zengin bir proton kaynağı sağladığı bulunmuştur. Biyolojik aktif bileşiklerin sentezindeki ilgi $[Ru(phi)_3]^{2+}$ 'un büyük öneminden ve farmokotikal ajanlar olarak kullanılmasından kaynaklanır. Rutenyum temelli rutenyum bileşiklerinin potansiyel antitümör aktivitesi olarak kullanıldığı bildirilmiştir [26]. *In vitro* çalışmalar DNA'ya rutenyum bileşiklerinin bağlanmasını doğrulamaktadır ve kültüre edilmiş hücrelerdeki sitotoksik aktivite bu aktivite ile sözü edilen DNA'ya bağlanma arasında direk bir ilişkinin olduğunu göstermektedir.

Cisplatin; kanser tedavisinde kullanılan, platin içeren bir kanser ilacıdır. Özellikle testis, mesane, yumurtalık, mide, yemek borusu ve gırtlak kanserlerinde kullanılmaktadır. Platinyum

temelli bir kemoterapi ilacıdır. Platinyum bileşikleri hücrelerde oluşurlar ve DNA'ya ters bağlanarak apoptozisi başlatırlar ya da programlı hücre ölümüne neden olurlar [27].

Cisplatin, çeşitli tümörlere karşı etkili olup halen kullanılan birçok kemoterapötik ajanlarla sinerjistik etki gösterir. Cisplatin; baş ve boyun, akciğer, uterus, yemek borusu, kolorektum, prostat, meme, pankreas, penis ve pediatrik tümörlerde tek başına veya diğer antineoplastik ajanlarla kombine halde kullanılır. Cisplatin hücre bölünmesini engelleyen ajanlara benzer biyokimyasal özelliklere sahiptir. Belirgin bir şekilde non-spesifik olarak hücre siklusunu etkiler, bu etkisi ile DNA'da çapraz bağlar oluşturarak DNA sentezine karışmış olur. DNA sentezine bu şekilde karışmak cisplatinin etki yapmasını sağlayan tek bir mekanizma olmayabilir. Buna ilave olarak, cisplatin immünolojik reaksiyon göstererek de etkili olabilir. İnsanlarda ve hayvanlarda tek bir intravenöz doz uygulanmasından sonra cisplatin karaciğerde, böbreklerde ince ve kalın bağırsakta yüksek oranda bulunur. İlacın merkezi sinir sistemine geçişi düşüktür. Plazma seviyeleri iki fazda azalır ve başlangıç yarı ömrü 20-50 dakika arasındadır. Son yarı ömrü ise 58-73 saat arasındadır. İlacın uygulanmasından sonra verilen platinin %90' ından fazlası proteine bağlanır. Cisplatin başlıca glomerüler filtrasyon ile idrarla atılır [28].

1.1. Mutasyon

Mutasyonlar; canlının genetik bilgisinde meydana gelen ve kuşaktan kuşağa aktarılan kalıtsal değişimlerdir.

Bireyin, kalıtsal özelliklerinin ortaya çıkmasını sağlayan genetik şifre, X ışını, radyasyon, ultraviyole, bazı ilaç ve kimyasallar, ani sıcaklık değişimleri vb nedenlerle bozulabilir. Bu durumda DNA'nın sentezlediği protein veya enzim bozulur. Böylece canlının proteinden dolayı yapısı, enzimlerinden dolayı da metabolizması değişebilir. Bir gen mutasyona uğradıktan sonra kararlı hale gelir ve tekrar eski haline dönmek için herhangi bir eğilim göstermez [29,30].

Mutasyonlar, kalıtsal materyalin normal kombinasyonunu değiştirmeyen, kalıtsal yapıda meydana gelen bütün değişikliklerdir. Mutasyon terimi genel olarak, kromozom yapısının değişmesini, kromozom sayısının değişmesini ve genlerdeki değişiklikleri kapsar [30].

1.2. Mutasyon Çalışmaları

Mutasyonlar genetik çalışmaların temelini oluştururlar. Mutasyonun en önemli sonuçlarından biri, bir sonraki kuşağa farklı genetik özellikler aktarılmasına neden olmasıdır. Bu ise, farklı fiziksel özelliklere sahip bireylerin meydana gelmesidir. Bu değişimler sonucu ortaya çıkan fenotipik çeşitlilik, genetikçilerin değişikliğe uğramış olan özelliği kontrol eden genleri çalışmalarına olanak sağlar. Genetik araştırmalarda mutasyonlar, nesilden nesile geçişlerde takip edilebilen, "markır"lar olarak kullanılırlar. Tarihte mutasyonların sunduğu fenotipik çeşitlilik olmasaydı, örneğin Mendel'in araştırmalarını yaptığı bezelye bitkisinin fenotipi tek olsaydı, bu deneyler hiçbir zaman sonuç bulamayacaktı [29].

Bazı canlıların kısa olan hayatlarından yararlanılarak, kolayca tanınabilecek ve çalışılacak mutasyonlar bu canlılarda elde edilirler. Mutasyon ve mutagenesis çalışmalarında özellikle virüsler, bakteriler, mantarlar, meyve sinekleri, bazı bitkiler ve fareler kullanılmaktadır. Bu canlılar, genetik hakkında bilgilerin elde edilmesinde çok yararlı olmuşlardır [29].

1.3. Mutasyon Çeşitleri

1.3.1. Kromozom Yapısının Değişmesi

Mayoz bölünmenin ilk evrelerinde crossing-overle kromozomlardan kopan parçalar yer değiştirip tekrar kromozomlara bağlanabilirler. Crossing-over, homolog kromatitler arasındaki alışılmış parça değişimidir; ancak genlerin rekombinasyonlarına neden olur; fakat kromozomlarda yapı değişikliklerine neden olmaz. Bazen kromatitler, crossing-over olmadan parça değişimine, yitirilmesine ya da kazanılmasına neden olur [30].

1.3.2. Kromozom Sayısının Değişmesi

Kromozomlar mitoz ve mayoz bölünme sırasında bazen düzenli olarak ayrılmazlar. Sonuçta kromozom sayısı bakımından farklı hücreler meydana gelir ve kalıtsal açıdan bazı sorunlar oluşturur. Birçok bitki doğadaki diploit kökenli diğer bitkilerden türemiştir. Aynı gen lokusunda meydana gelecek öldürücü bir mutasyon, bu şekilde, diğer normal genleri taşıyan poliploit kromozomlar tarafından korunabilir. Başlangıçta öldürücü ya da engelleyici görünen bu genler

bir zaman sonra canlının ayakta kalmasını sağlamak bakımından önemli bir duruma geçebilir. Bu tip bitkiler belli bir süre sonra kısır olarak kalırlar ve çelikleme ya da yumru ile çoğaltılırlar. Hayvanlar, vücutlarının belli bir parçasından üretilemedikleri için, triploidi ve tetraploidi bunlarda bir önem arzetmez. İnsanlardaki kromozom sayısı değişimleri; Down sendromu, Edward sendromu, Patau sendromu, Cri du Chat sendromu, kronik miyelojenik lösemi gibi hastalıklara neden olur ve bu insanlarda değiştirilemeyen sorunlara neden olarak kalırlar [29].

1.3.3. Gen Mutasyonları

Kromozomların yapısında ya da sayısında herhangi bir değişiklik olmadan, doğal ya da deneysel olarak meydana gelen ve mikroskopta görülmeyen mutasyonlardır. Mutasyonu meydana getiren araçlara "mutajenik faktör" denir. Mutasyona uğramış bir gen nadir olarak eski haline dönebilir [29].

Gen, depolanmış kimyasal bilgiyi temsil eden nükleotit çiftlerinin lineer(doğrusal) dizisi olarak değerlendirilir. Genetik şifredeki üç'lü nükleotit dizilerinin her biri ilgili proteindeki tek bir amino asiti belirler. Bu dizileri veya şifrelenen bilgiyi bozan herhangi bir değişiklik "mutasyon" olarak nitelendirilir [29].

Gen mutasyonları, hücredeki kalıtsal bilgiyi taşıyan, çift nükleotid zincirinden oluşan, DNA (deoksiribonükleik asit) molekülündeki gen denilen ve belirli bir özelliği kodlayan bölümündeki değişiklikten kaynaklanır. En az karmaşık olan değişiklik bir nükleotitin yer değiştirmesidir. Bunlar daha çok "baz yer değiştirmesi" ya da "nokta mutasyonları" olarak düşünülür [29].

Mutasyonlar, bir DNA zincirindeki bazın (A, T, G, C) başka bir bazla yer değiştirmesi sonucunda ortaya çıkabileceği gibi, zincire bir ya da daha çok bazın eklenmesi veya zincirdeki bazların eksilmesi sonucunda da ortaya çıkabilir [30].

1.3.3.1. Baz değişimleri (nokta mutasyonları)

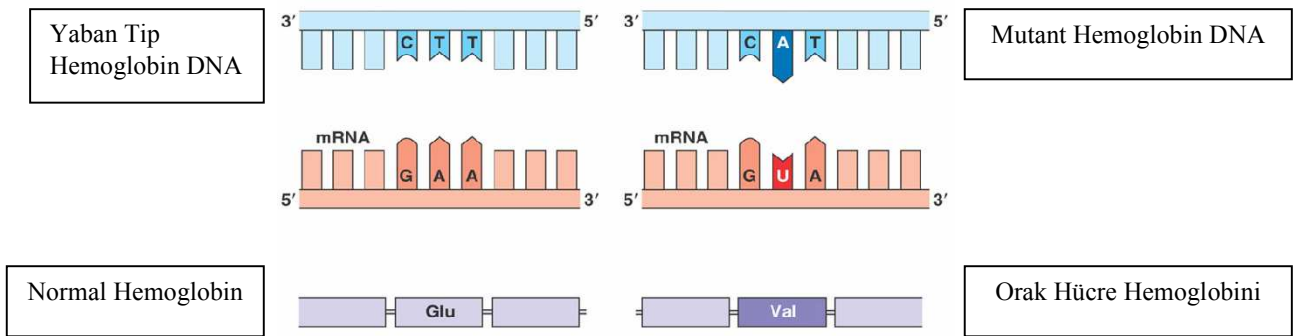
Transisyon(Geçiş): Pirimidin-pirimidin ya da pürin-pürin yer değişikliğidir.

Transversiyon(Değişim): Pürin-pirimidin yer değişikliğidir.

a-Silent (Sessiz) mutasyon:Ör: TTA(lösin)→ TTG(lösin) (Transisyonel sessiz mutasyon)

b- Missense (Kayıp) Mutasyon:GCA(Alanin)→ GAA(Glutamik asit) (Transversiyonel kayıp mutasyon)

c-Nonsense (anlamsız) Mutasyon:TTA(Alanin) →TGA(Stop) (Transversiyonel nonsense mutasyon)



Şekil 1.3.3.1. Baz değişimleri (nokta mutasyonları)

(http://www.genbilim.com/images/stories/350px-nokta_mutasyon.jpg, Ocak, 2009)[31]

1.3.3.2. İnsersiyon

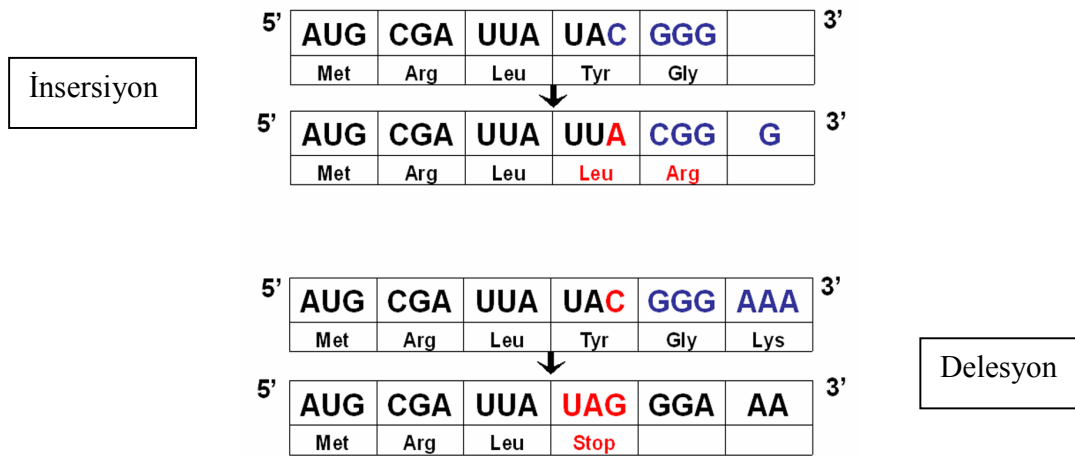
Herhangi bir kromozomun farklı bölgelerine başka bir kromozoma ait bant ya da subbant düzeyinde bir kısmının katılmasıdır [30].

1.3.3.3. Delesyon

Birden fazla kromozomda meydana gelebilir. Kromozomdan bir ya da birden fazla gen bölgesinin kaybına denir. Kromozomda en az iki kırılma bölgesinin olması gerekir [30].

İnsersiyon ve delesyon çerçeve kayması mutasyonu (frameshift mutation) oluştururlar [30].

Çerçeve Kayması Mutasyon (Frameshift Mutation)



Şekil 1.3.3.3. Nükleotit insersiyonu ve delesyonu.

(<http://homepage.usask.ca/~vim458/advirol/SPCV/evolution/2.jpg>, Ocak, 2009)[32]

1.3.3.4. Gen Mutasyonlarının Sınıflandırılması

A. Kendiliğinden Oluşan (Spontan) Mutasyonlar

Belirli bir dış etki olmaksızın normal hücresel etkinlikler ya da ortamla gelişmiş etkileşimlerin sonucunda ortaya çıkan mutasyonlardır.

Kendiliğinden oluşan mutasyon sonucu hücre metabolizmasında oluşan yapıcı ara ürünlerin (peroksidaz gibi) birikimi ve DNA replikasyonu sırasındaki yanlış eşleşmeler

(tautomerik değişim) meydana gelir. Kendiliğinden en sık meydana gelen ve en önemli olan hidrolitik zarar bazlardaki özellikle sitozindeki amin grubunun yok edilmesi yani deaminasyonudur [33].

B. Yapay (Uyarılmış) Mutasyonlar

Mutasyon adı verilen kimyasal ya da fiziksel etkenlerle meydana gelen mutasyonlardır. Mutajenlerin kullanılması mutasyon meydana gelme olasılığını çok artırır. Mutajenler genellikle genler üzerinde fark gözetmeden etkili olurlar. Mutajenler fiziksel ve kimyasal mutajenler olarak iki sınıfa ayrılır [33].

1. **Fiziksel Mutajenler:** Sıcaklık, manyetik ve elektriksel alan, UV, proton, nötron ışınları gibi etkenlerdir. Genellikle baz çifti değişimlerine yol açarlar. X ve γ ışınları gibi iyonlaştırıcı ışınlar kuvvetli fiziksel mutajenlerdir. Çoğunlukla büyük mutasyonlar bazen de nokta mutasyonlar meydana getirirler. DNA'da onarımı çok zor olan çift iplik kırıkları oluştururlar. DNA omurgasındaki deoksiribozları etkilerler. Deoksiribozla etkileşime girecek reaktif oksijen türlerinin üretimine yol açarlar [33].

Hücreler replikasyon yapmak için yapısı bozulmamış kromozomlara gereksinim duydukları için iyonlaştırıcı ışınlamalar kanser tedavisinde hızla çoğalan hücreleri öldürmek için kullanılırlar [33].

Daha az enerjili olmasına karşın UV de kuvvetli bir mutajendir. UV'nin bazlar üzerindeki etkisi; bazlardaki tautomerik değişmeler için gerekli enerjiyi vermek ve elektron hareketi için uyarma yaparak mutasyon oluşumuna yol açmak, primidin dimerlerinin oluşumuna neden olarak DNA'da geçici ya da kalıcı değişmelere yol açmaktır [33].

2. **Kimyasal Mutajenler:** Kalıcı değişimlere yol açarlar. Çeşitli tipleri vardır.

a. Bazların Yapısını Değiştiren Kimyasal Maddeler

Bazı kimyasal maddeler hücrenin yaşam çevriminin herhangi bir evresinde DNA'yı doğrudan etkileyerek bazların kimyasal yapısını değiştirebilirler. Yeni oluşan bazların replikasyon sırasındaki kalıp özelliklerinin değişimine yani yanlış eşleşmeye neden olurlar.

Sonucun mutasyon şeklinde ortaya çıkması için replikasyon gereklidir. Değişikliğe uğramış bazlar bazen hiç eşleşme yapmazlar ya da mutajen etkisiyle omurgadan ayrılırlar [33].

b. Çerçeve Kaymasına Yol Açan Mutajenler

En çok bilinenleri aromatik moleküller olan akridin boyalarıdır (örneğin flavin). Bu mutajenler DNA'daki pürin ya da primidin bazlarına bağlanabilen birkaç halka yapısı içerirler ve bazların birbirine bağlanarak kümeler oluşturmalarına neden olurlar. Böylece DNA replikasyonu sırasında kalıpta ya da uzayan DNA zincirinde dışarı doğru ilmek oluşumu, çerçeve kayması mutasyonlarına yol açarak delesyon (eksilme) ya da adisyon (eklenme) meydana gelir [33].

2.1. Kimyasal Mutajenlerin Saptanması

Doğal olarak meydana gelen, yeni saptanan veya sentezlenen kimyasal maddelerin kontrollerinin yapılması ve mutajen oldukları saptandıklarında korunma yollarının araştırılmasıdır [33].

İnsanları mutajenlerin etkisinde kalmaktan korumanın önemi; genetik değişmelerin gelecek kuşaklar için büyük olasılıkla zararlı olması, somatik hücrelerde meydana gelen ve dölle geçmeyen mutasyonların da birey için zararlı olmasıdır [33].

Somatik hücrelerde kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açan mutasyonlar sonucu kanser oluşumu meydana gelir.

Mutajenlerin çoğu karsinojeniktir. Bir bileşiğin karsinojenik olup olmadığının belirlenmesinin kısa ve basit bir yolu bakteriler için mutajenik olup olmadığının saptanmasıdır. Ames testi; temeli geri mutasyon sıklığını saptamaya yarayan çok duyarlı bir testtir. Örneğin histidin amino asidi gereksinimine yol açan bir mutasyonun yabani tipe geri dönüş sıklığı çok sayıda hücre topluluğu içinde hesaplanabilir. Böyle testlerle potansiyel ya da gerçek karsinojen oldukları belirlenmiş önemli bazı mutajenler; sigara dumanı, etilen diklorid gibi bazı endüstriyel kimyasal maddeler ve birçok çevre kirleticisidir [33].

C. Gametik ve Somatik Mutasyonlar

Gametik mutasyonlar gametik hücrelerde meydana gelen mutasyonlardır. Böylece kalıtsal hale gelerek yeni bireyleri doğrudan etkilerler.

Somatik mutasyonlar ise somatik hücrelerde meydana gelir. Organizmanın kendisini ilgilendirmekte olup, bu olay organizma ortadan kalkınca etkisi biter. Yeni nesillere aktarılmaz [34].

D. Çerçeve Kayması (Frameshift) Mutasyonları

Genin ürününü belirleyen sınırlar (okuma çerçevesi) içinde kodonların kayması ve bunun sonucunda da genin ürününe ait bilginin değişmesidir. Bir baz çiftinin aradan çıkması (delesyon) sonucu genin bir bazlık çiftlik parçasının kaybolması ile o noktadan itibaren tüm kodonların değişmesine neden olabileceği gibi yeni bir baz çiftinin yapıya girmesi (adisyon) sonucu gene tek bir baz çifti eklenmesi ile o noktadan itibaren tüm kodonların değişmesine de neden olabilir [30].

Mutasyonun meydana geldiği noktadan itibaren gendeki tüm okuma çerçevesinin değişmesi genin ürünü olan polipeptitte çok sayıda amino asit dizisinin değişmesine ve genellikle protein molekülünün yapı ve işlevinin tamamen değişmesine neden olur [33].

E. Baz Çifti Değişimleri (Base-Pair Substitution)

Bir genin içindeki bir ya da çok daha ender olarak birkaç baz çiftinin yerini başka bir baz çiftinin almasıdır. Değişen bazın replikasyon sırasında değişik bir bazla eşleşmesi yanlış eşleşmeye neden olur [33].

1.3.3.5. Mutasyon Oluşum Mekanizmaları

Tautomerik Değişimler

DNA'daki bazlar, atom pozisyonları ve atomlar arası bağlardaki değişiklikleri nedeniyle farklı izomerlerden biri olarak ortaya çıkabilir (tautomer). DNA'daki azotlu bir bazın tek bir protonun kayması ile farklılık gösteren, yapısal izomerler olarak adlandırılan alternatif kimyasal formları halinde bulunabilirler [30].

Bu değişimler molekülün bağ özelliğinin değiştireceğinden, tautomerik kaymalar baz çifti değişimlerine veya mutasyonlara yol açar [30].

Bazlar normalde amino ve keto formları arasındaki hidrojen bağlanmalarla eşleşirler. Ancak ender olarak protonların kayması ya da iyonizasyonlar nedeniyle (tautomerik kayma) imino ve enol formları da oluşabilir [30].

Baz Analogları

Moleküler yapıları pürin ve primidinlere çok benzeyen hücreye normal bazlarla birlikte alınabilen dNTP haline dönüştürölüp replikasyon sırasında DNA'nın yapısına giren kimyasal maddelerdir. Sadece replikasyon sırasında etkili olurlar. Bunlar mutajenik kimyasallardır. Replikasyonda sentezlenen DNA zinciri yapısına normal bazların yerine girerler. Bunun sonucunda daha sonraki replikasyonda yanlış baz eşleşmeleri ve baz çifti değişimleri meydana gelir. Hem pürin hem de primidinlerin yerini alabildikleri için neden oldukları mutasyon çift yönlüdür [30].

Urasil'in türevi olan "5-bromourasil (5-BU)", keto formunda yapıya katılırsa timin analogu olarak davranır. Enol formunda DNA yapısına katılırsa sitozin analogu olarak guanin ile bağ yapar [30].

Diğer mutajenik baz analogu 2-amino pürin (2-AP), adenin analogu, T ile eşleşmeye yatkınlığına ek olarak sitozin ile de A=T' den G=C' ye transisyonlara yol açar [30].

2-AP gibi transisyon mutasyonlarını uyarmadaki özgülük nedeniyle baz analogları, yabancı nükleotid dizilerine geri dönüşümü (reversiyon) uyarmada da kullanılabilirler. Bu değişiklik "tersinir (reverse) mutasyon" olarak adlandırılır. Bu süreç, çok düşük sıklıkla olmakla beraber spontan olarak da meydana gelebilir [30].

Alkilleyici Ajanlar

İkinci Dünya Savaşı'nda keşfedilen kükürt içeren **hardal gazları**, kimyasal savaş araştırmalarında tanımlanan ilk kimyasal gruplardan biridir. Diğerleri; Etilmetan sülfonat(EMS),

Etiletan sülfonat(EES), Akridin boyalar(Akridin orange, proflovin) gibi alkilleyici ajanlardır. Nükleotitlerdeki amino ve keto gruplarına CH₃- veya CH₃-CH₂- gibi bir alkil grubu eklerler [30].

Etilmetan sülfonat (EMS); Guanin'in 6 nolu, Timin'in 4 nolu pozisyonundaki keto gruplarını alkiler [30].

Baz analoglarında olduğu gibi, baz eşleşme yatkınlıkları değiştirilmiştir ve sonuçta transisyon mutasyonları oluşur. 6-etilguanin, adenin analogu gibi davranır ve timinle eşleşir [30].

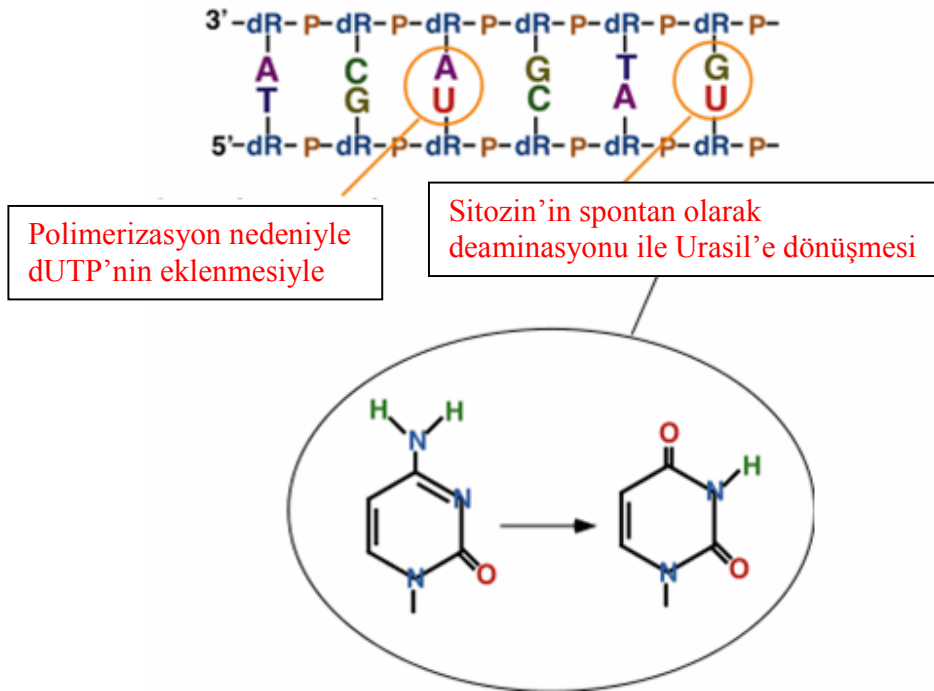
Akridin boyları adını alan kimyasal mutajenler de çerçeve kayması mutasyonlarına neden olur. Proflavin ve akridin sarısı gibi akridin boyları, DNA'nın pürin ve pirimidinleri arasına sıkışarak interkalasyon yapımlarıyla bilinirler. DNA sarmalında genişlemeler oluşturarak delesyon ve insersiyonlara neden olurlar [30].

Apürinik Bölgeler ve Diğer Lezyonlar

Çift-sarmal DNA molekülündeki azotlu bazlardan birinin spontan olarak kaybedilmesiyle ortaya çıkarlar [30].

Pürin halkasının 9-N'ünü d-ribozun 1'-C'una bağlayan glikozidik bağın kırılmasıyla oluşan bu bölgelere "apürinik bölgeler (AP bölgeler)" denir. AP bölgede bir azotlu bazın yokluğu transkripsiyon ve translasyonda genetik kodu değiştirir. Eğer replikasyon gerçekleşecekse durmasına sebep olur [30].

"Deaminasyon"da ise Adenin ve Sitozin'deki bir amino grubu keto grubuna dönüştürülmektedir [30].



Şekil 1.3.3.5.4.1. Deaminasyon reaksiyonu

(www.dicle.edu.tr/~vtolan/album.htm, Ocak, 2009)[35]

Bazın yapısının değişmesi :

Geçici tautomerik değişim: Replikasyon sırasında DNA molekülünün ipliklerden birindeki bazlarda geçici bir tautomerik değişiklik meydana gelmesi (pürin ve pirimidin halkalarındaki 1. ve 6. pozisyonundaki H atomlarının yeni ve stabil olmayan pozisyona geçmesi), bu bazların replikasyondaki eşleşme özelliklerinin değişmesi ve replikasyon sırasında yanlış eşleşmeler sonucu mutasyon meydana gelir [33].

Kalıcı Değişmeler:

1. Bazın kimyasal yapısının değişmesi durumunda hücrenin yaşam çevriminin herhangi bir evresinde bazın kimyasal yapısında kalıcı değişmeler, bunun sonucunda da replikasyon sırasında yanlış eşleşmeler meydana gelir.

2. Bir bazın yerine başka bir bazın alınması durumunda replikasyon sırasında meydana gelen değişim sonucu sonraki replikasyonlarda yanlış eşleşme görülür.

Bazların yapısındaki devamlı değişmeler bazı dış etkenler (mutajenler) tarafından meydana getirilebilir. Bunlar ya bazın kimyasal yapısını değiştirir ya da replikasyon sırasında bir bazın yerine girerler [30].

Bir baz çiftinin değişmesi genin ürünü olan proteindeki amino asitlerden sadece birinin değişmesidir ve genelde kolaylıkla gözlenebilecek değişimlere yol açmaz. Baz çifti değişimiyle oluşan yeni kodon aynı anlamlı olduğunda buna “sessiz mutasyon” denir. Yanlış anlamlı kodon tek bir amino asit değişimi bir proteinin ikincil ve üçüncül yapısında genelde çok etkili değildir ve çoğu kez sessiz mutasyon olarak adlandırılır. Anlamsız kodonda (bitim kodonunda) mutasyonun meydana geldiği noktadan itibaren protein sentezi durur. Etkisini fenotipte çıkarma olasılığı oldukça yüksektir [30].

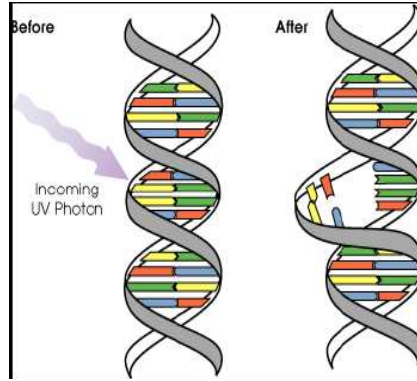
Baz çifti değişimleriyle meydana gelmiş mutasyonlar genellikle *sızıntılı tiptedir* ve mutant genin normal işlevi bir ölçüde kalıntı olarak devam eder [30].

Ultraviyole Radyasyonu ve Timin Dimerleri

Pürin ve pirimidinler U.V radyasyonunu yaklaşık 260 nm dalga boyunda maksimum olarak absorbe ederler [30].

UV etkisi özellikle iki timin bazı arasında oluştuğu pirimidinler üzerinedir. Dimerler DNA konformasyonunu bozar ve normal replikasyonu durdurur [30].

Timin dimerleri nedeniyle; DNA iplikçikleri katlanır, transkripsiyon ve ekspresyon yapılamaz [30].



Şekil 1.3.3.5.5. Timin Dimerleri.

(http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2f/DNA_UV_mutation.gif, Ocak, 2009)[36]

1.4. Mutasyon Sebepleri ve Etkileri

Mutasyonun gözlenebilen bir etki olmadan ortaya çıkması çok az gözlenen bir olgudur. Daha çok çevreden gelen kimyasal ya da fiziksel etkiler nedeniyle olur. Bir dış etkinin mutasyona yol açabilmesi (mutajen olması) için hücre içine girip etkinliğini gösterebilmesi gerekir. Örneğin Güneş'in morötesi ışınları, girim gücü düşük olduğu için yalnızca deri hücrelerinde somatik mutasyona yol açabilirken, girim gücü yüksek olan X ışınları ya da atom bombası ışınmaları, tohumal mutasyona yani nesilden nesile aktarılabilen mutasyona yol açabilen çok güçlü etkenlerdir. Bu tür mutasyonların bir çok örneği yakın zamanda Çernobil patlaması sonucunda çevredeki bir çok canlı türünde gözlenmiştir. Günümüzde bile bu patlama sonrası etrafa saçılan radyoaktif maddelerin neden olduğu somatik mutasyonların görünür sonuçları vardır. Halen Rusya ve Karadeniz Bölgesi'ndeki kanser oranları çok yüksektir. Mutasyonun diğer bir sonucu da hücre bölünmesindeki kontrol mekanizmasını ortadan kaldırabilmesidir. Bunun bilinen en tehlikeli sonucu ise hücrenin kontrolsüz bölünmesi yani kanserdir [29].

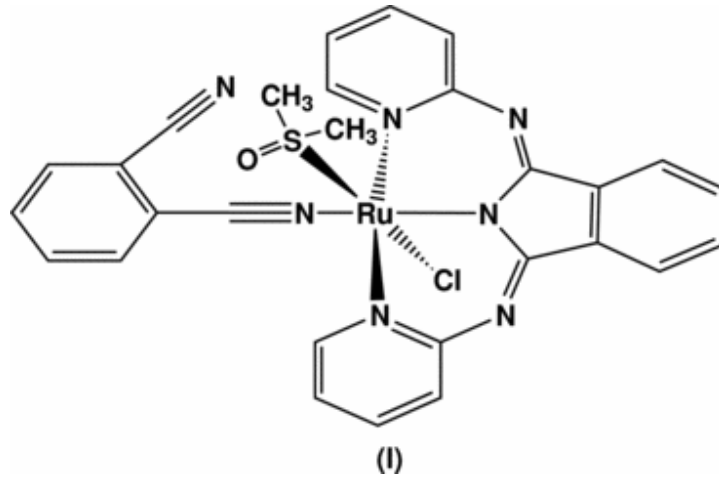
1.5. Rutenyum Türevleri ve Cisplatin

Rutenyum metali ilk olarak 1844 yılında Karl Klaus tarafından keşfedilip izole edilmiştir. Rutenyum doğada nadir bulunan elementlerdir. Belli mineralleri olmayıp platin metali ile beraber bulunur [37].

Rutenyum beyaz renkli sert bir metaldir. Sertliği iridyumun sertliği derecesindedir. Atom numarası 44, atom ağırlığı 101.07, erime noktası 2500°C, kaynama noktası 4900°C ve yoğunluğu 12.2 g/cm³tür [37].

Rutenyum korozyona karşı çok dayanıklıdır. Ancak 800°C’de ısıtıldığında yükseltgenerek RuO₂ ve RuO₄ bileşiklerini verir. Asitlere dayanıklılık gösterirse de altın suyunda çözünür. KNO₃⁺KOH ile eritme işlemine tâbi tutulduğunda potasyum rutenat (K₂RuO₄) bileşiğini vererek çözünür. Halojenler ve sodyum peroksit veya diğer bazik oksit karışımlarıyla bileşik verir. En bilinen ve yaygın olan bileşiği rutenyum triklorür (RuCl₃)dür [38].

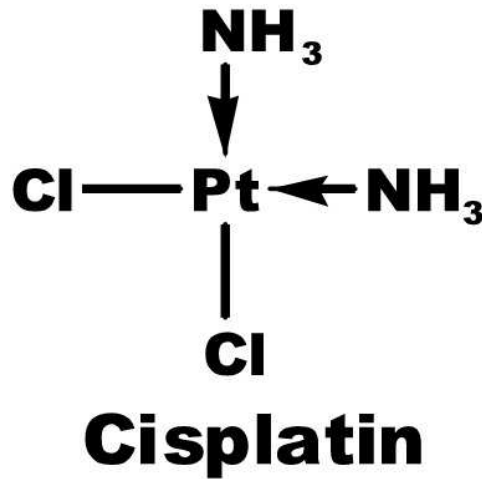
Rutenyum iridyum, osmiyum, palladyum, platin ve rodyum gibi elementlerle alaşım yapar ve bu metallerin sertliğini artırır. Kezâ titanla da alaşım verir ve bu metalin korozyona dayanıklılığını artırır. Çeşitli mücevherlerin ve aşınmaya dayanıklı elektrik kontaklarının yapımında da rutenyumla sertleştirilmiş platin ve palladyum alaşımlarından faydalanılır [39].



Şekil 1.5.1. Rutenyum'un kimyasal yapısı.

(<http://journals.iucr.org/e/issues/2005/01/00/cv6427/cv6427scheme1.gif>, Ocak, 2009)[40]

Cisplatin çeşitli insan kanserlerinin klinik tedavisinde antineoplastik ajan olarak geniş çapta kullanılmaktadır. Günümüzde, deneysel olarak sitotoksisitede ve nefrotoksisitede yer alan cisplatin-DNA ilişkisi ile üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) olduğu bildirilmiştir [41]. Süper oksit anyon, hidroksil radikal ve hidrojen peroksit içeren çoğu reaktif oksijen metabolitleri farklı doku ve organlara zarar verebilirler ama özellikle cisplatinle kullanımıyla bağlantılı tübüler rahatsızlıklarda ve akut böbrek yetmezliğinde glomerüler dokuya daha çok zarar verirler (Klahr 1997). Bundan dolayı, etkili bir antioksidant savunma bu patolojik işlemlerin tedavi ve önlenmesi için yararlı olabilir [42]. Cisplatin ve doğal diyet ürünleri ilişkisi tümör hücreleri üzerinde ilaç aktivite aksaklığı olmaksızın kanser tedavileri süresince yararlı etkiler yaratmıştır. Bundan dolayı bu ürünlerin, antitümör ajanlar ile tetiklenen nefrotoksisiteye karşı koruyabildikleri bulunmuştur [43].



Şekil 1.5.2. Cisplatin'in kimyasal yapısı.

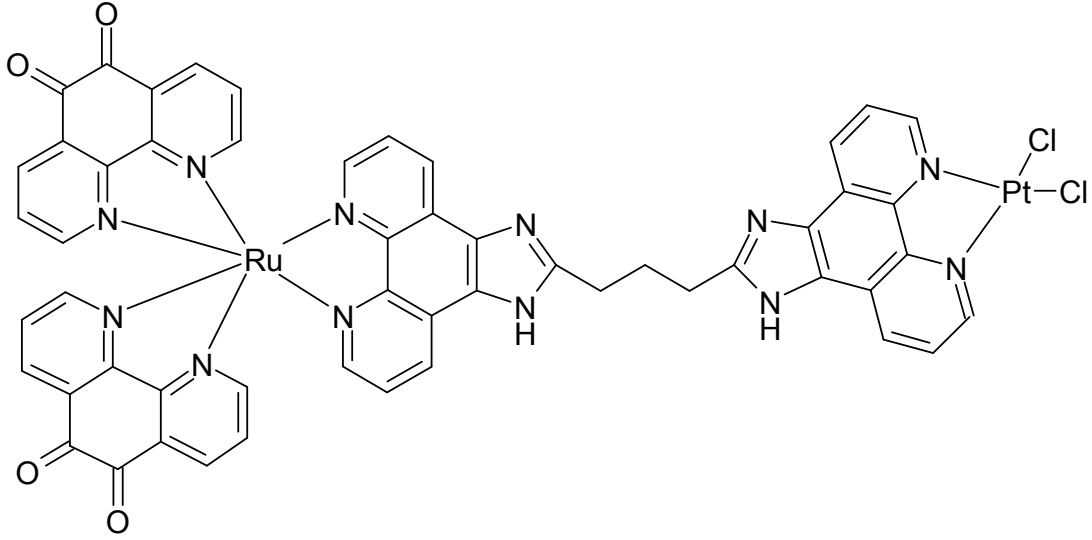
(<http://www.webalice.it/alberto.frangini/cisplatin.jpg>, Ocak, 2009)[44]

Cisplatin farmakokinetiklerin farklı renal disfonksiyon dereceleri olan hastalarda iyi dökümanları bulunmasına rağmen, aneferik hastalar için cisplatinin ulaşılabilir uygunluğuna dair bilgi bulunmamaktadır. Aneferik hastalar bazen cisplatin terapisine ihtiyaç duyabilmelerinden dolayı bu hasta popülasyonlarındaki cisplatin yönetimi için terapötik yayınların tanımlanması önemlidir [45].

Platinyum grubu elementlerinin katalizör olarak özellikle otomobil egzoz detoksifikasyonunda gelişen endüstride kullanımı tedavi ve çevresel kirlenmede artışa neden

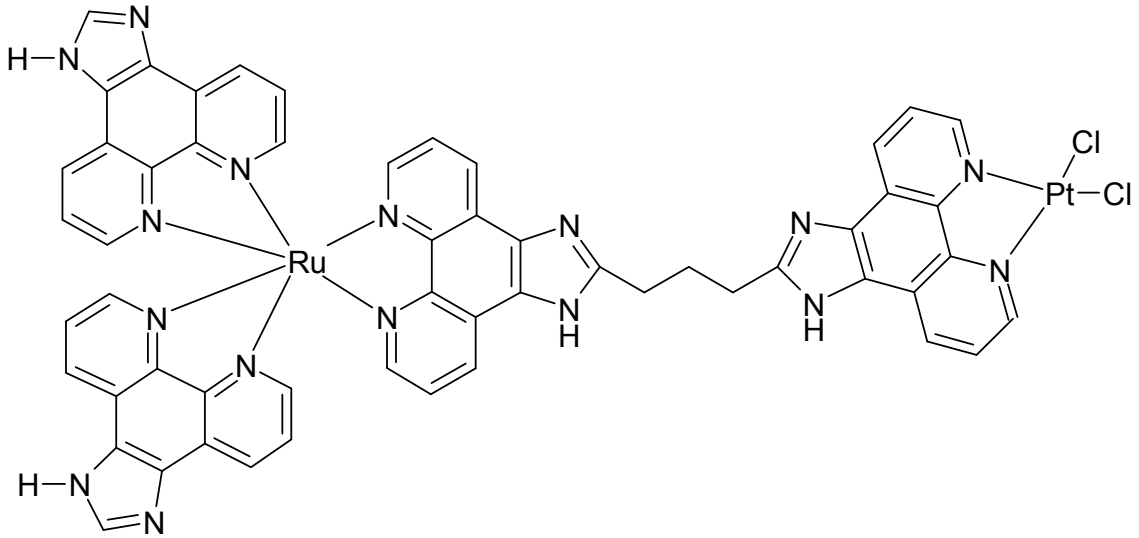
olmaktadır. Platinyum, paladyum ve rodyumun koordinasyon bileşiklerinin endüstriyel olarak kullanıldığı sitotoksik ve mutajenik özellikler *Salmonella typhimurium* test sisteminde ve iki hücre hattında saptanmış olarak nötral kırmızı sitotoksisite yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Platinyum bileşiklerinin sitotoksik etkileri ED₅₀ olarak ölçülür, 0.2 mM test konsantrasyonlarında meydana gelir. Rodyum tuzlarının ED₅₀=6 mM'da 30 kat daha az toksik oluşu kanıtlanmasına rağmen, analog paladyum tuzları 0.6mM ED₅₀ ile 3 kat daha az toksik olarak test edilmiştir. Belirli bir metalin farklı bileşiklerinin toksisite seviyeleri birbirlerinden önemli derecede farklılık göstermemiştir, bu da metali toksik etkiler için sorumlu yaptığını göstermektedir. Ames testinde spontan mutasyon oranları 4 test suşunun platinyum bileşiklerine maruz bırakıldığı zaman faktörler 3'ten 20'ye yükselmiştir. Analog rodyum bileşikleri kararlı bir şekilde daha az mutajeniktir ve paladyum hiçbir mutajenik potansiyel meydana getirmemiştir. 4 test suşunun hepsi farklı mutasyonlar içerir, rodyum ve platinyumun mutajenik potansiyeli DNA hasarına neden olan farklı mekanizmalar üzerine dayanarak meydana gelir. Bu in vitro deneylerden yola çıkarak, rodyumun suda çözülebilir bileşik tuzlarının platinyum bileşiklerinden daha az toksik ve daha az mutajenik potansiyele sahip olduğu sonucuna varılabilir. Paladyum için herhangi bir mutajenik özellik yoktur. Bu görüşten yola çıkarak, öncelikli baskın olarak paladyum içeren dönüştürücü bir katalizör dağılımının egzoz detoksifikasyon tekniğinden kaynaklı potansiyel hastalık risklerini minimuma indirebileceği olasıdır [45].

1.5.1. Rutenyum Türevlerinin Açık ve Kapalı Formülleri



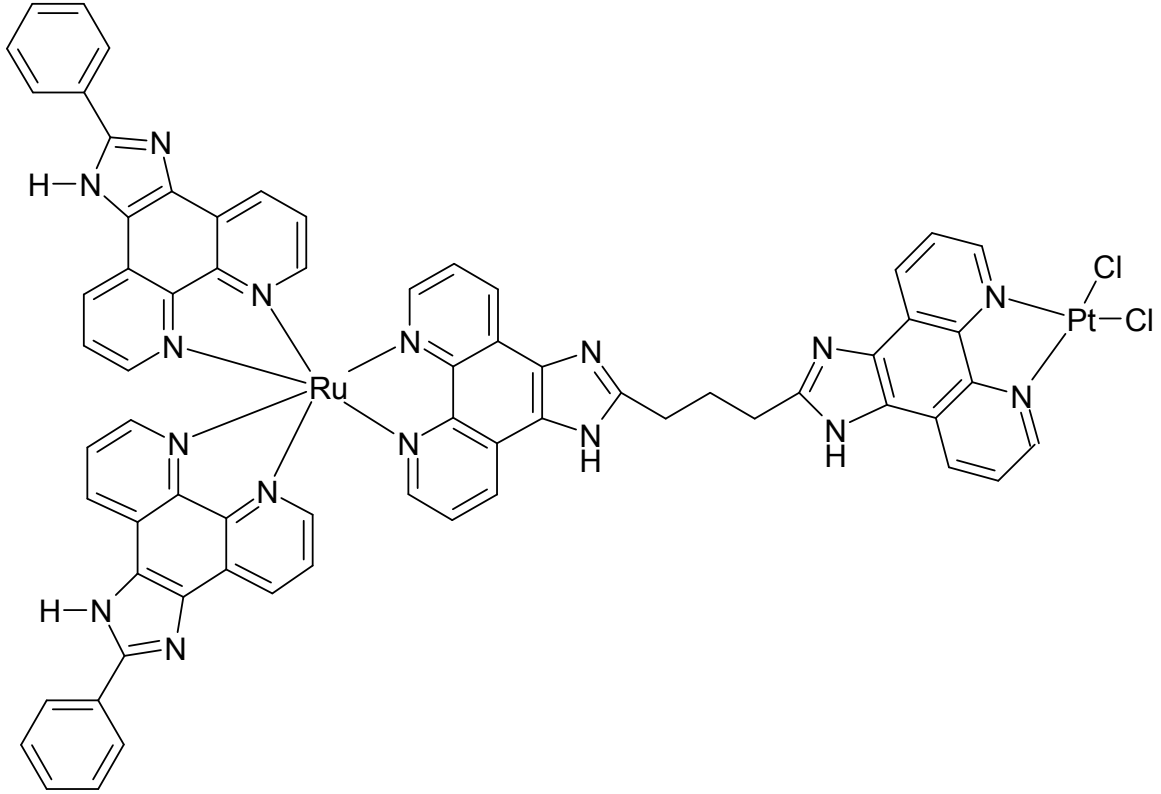
Şekil 1.5.1.1. Ru₂BPT'nin açık formülü.

Kapalı formülü: [Ru(dp)₂(bipp)]PtCl₂



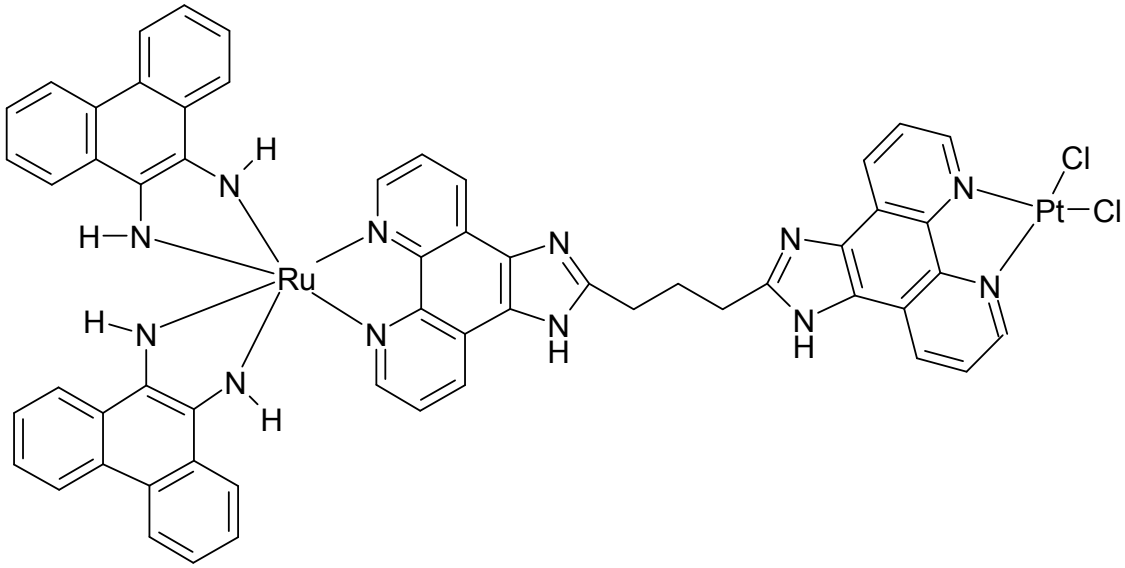
Şekil 1.5.1.2. Ru₃BPT'nin açık formülü.

Kapalı formülü: [Ru(ip)₂(bipp)]PtCl₂



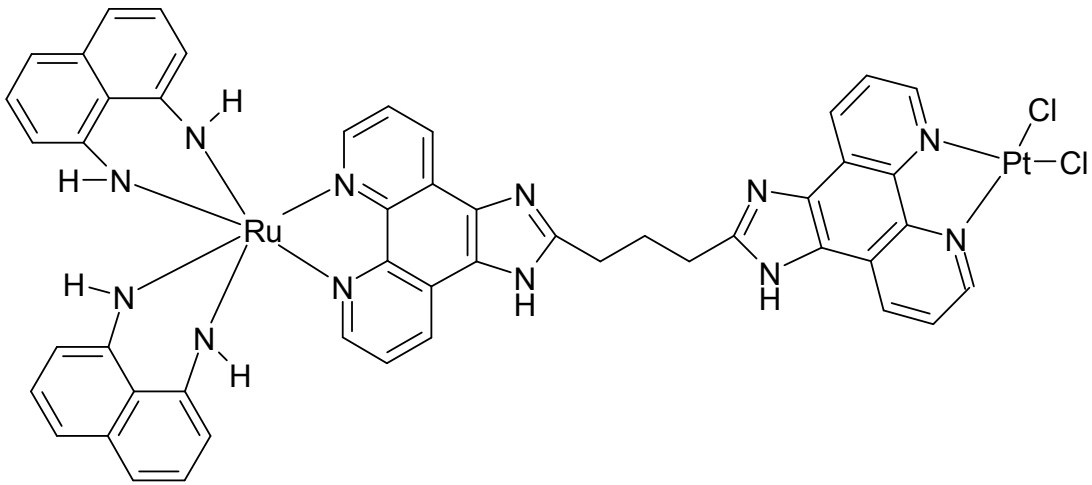
Şekil 1.5.1.3. RuL₄Bpt'nin açık formülü.

Kapalı formülü: [Ru(pip)₂(bipp)]PtCl₂



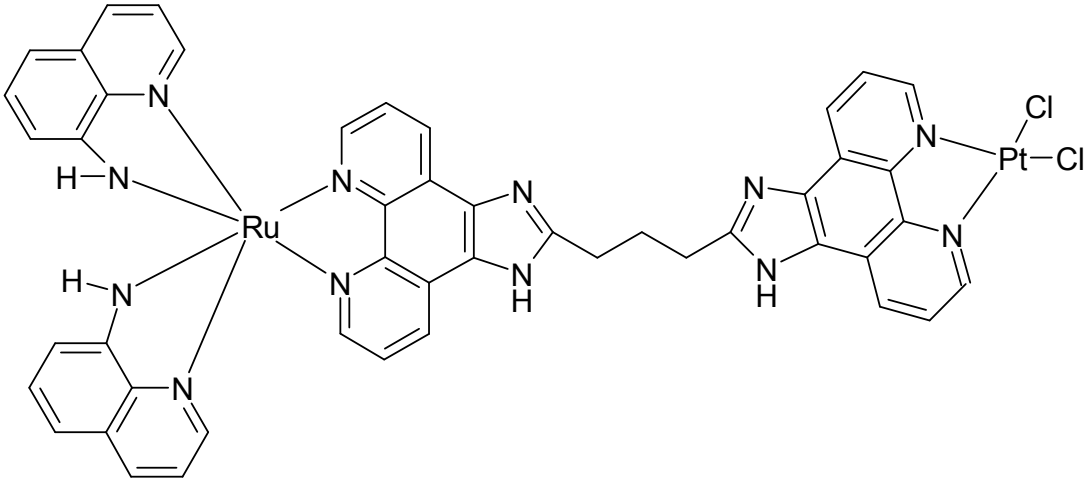
Şekil 1.5.1.4. RuL₅Bpt'nin açık formülü.

Kapalı formülü: [Ru(dap)₂(bipp)]PtCl₂



Şekil 1.5.1.5. RuL₆Bpt'nin açık formülü.

Kapalı formülü: [Ru(dan)₂(bipp)]PtCl₂



Şekil 1.5.1.6. RuL₇Bpt'nin açık formülü.

Kapalı formülü: [Ru(aq)₂(bipp)]PtCl₂

2.MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

4_nitro_o_fenilendiamin, sitrik asit monohidrat, K_2HPO_4 , NaOH, Bacto Agar, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, L-Histidin.HCl, D-Biyotin, Ampisilin trihidrat, sodyum azid, Nutrient Broth, KCl, $NaH_2PO_4 \cdot 4H_2O$.

2.1.2. *Salmonella typhimurium* test suşları

Deneyde Ames ve arkadaşları tarafından *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan in vitro mutasyonlarla geliştirilen TA98 ve TA100 suşları kullanılmış olup, bu suşlar Hacettepe Üniversitesi'nden temin edilmiştir.

Salmonella typhimurium'un TA98 suşu çerçeve kayması mutasyonu, TA100 suşu ise nokta mutasyonu özelliği taşımaktadır. Çerçeve kayması diğer bir ismiyle frameshift mutasyonları bir genin protein kodlayan kısmında ya da birkaç baz çiftinin girmesi ya da çıkması ile oluşan mutasyon çeşididir. Baz çifti değişmesiyle görülen mutasyonlar ise bir gendeki bir baz çiftinin diğer bir baz çiftine değişmesidir.

2.1.3. Test maddelerinin dozları ve hazırlanışı

Bu çalışmada 6 ayrı rutenyum türevinin ve cisplatinin mutajenik etkileri Ames/*Salmonella* test sistemi ile araştırılmıştır.

Bu maddeler dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülerek oda sıcaklığında saklanmışlardır. Uygulanacak dozları belirlemek için 5 µg/plak, 10 µg/plak, 25 µg/plak, 50 µg/plak ve 100 µg/plak konsantrasyonları hazırlanıp bakteriler üzerinde denenmiş ve 100 µg/plak konsantrasyonunun mutajenik etki yaptığı görülmüştür.

2.1.4. Deneyde Kullanılan Çözelti ve Ortamların İçerikleri ve Hazırlanmaları

Ames/Salmonella Testinde Kullanılan Çözeltiler

Vogel Bonner Medium E (50X) Tuz Çözeltisi

Kullanımı: Minimal Glikoz Agar plaklarının hazırlanmasında kullanılır.

Distile su (45 °C)	167.5 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.5 gr
Sitrik asit monohidrat	25 gr
K ₂ HPO ₄	125 gr
NaH ₂ NH ₄ (PO ₄ .4H ₂ O)	43.75 gr

Maddeler yukarıda yazıldıkları sıra ile sıcak suyun içine eklenir. Bir madde iyice çözünmeden diğerinin eklenmemesi gerekir. Daha sonra hacim 1 lt'ye tamamlanır. 1 lt'lik 2 kaba bölünerek 121 °C'de 20 dk süre ile otoklava konularak steril hale getirilir. Oda sıcaklığında saklanır.

0.5 mM Histidin/Biyotin Çözeltisi

Kullanımı: Mutasyon deneyinde kullanılır.

D-Biyotin	30.9 mg
L-Histidin	240 mg
Distile su	250 ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülür. Daha sonra histidin ilave edilerek karışım 121°C'de 20 dk otoklavlanarak steril hale getirilir. Histidin/Biyotin hazırlandıktan sonra +4 °C'de saklanır.

(%0.8/0.02 NaOH) Ampisilin Cözeltisi

Kullanımı: Ampisiline dirençlilik kontrolü ve HBA plaklarının hazırlanmasında kullanılır.

Ampisilin trihidrat	0.8 gr
0.02 M Sodyum hidroksit	100 ml

Ampisilin trihidrat, 0.02 M NaOH içinde çözülür ve 0.22 µm çaplı filtreden geçirilerek steril edilir. +4 °C'de saklanır.

0.02 M NaOH 100 ml distile suda 0.08 gr NaOH çözülerek hazırlanır.

(%0.1) Kristal Viyole Cözeltisi

Kullanımı: Suşların kristal viyoleye duyarlılıklarını dolayısıyla Rfa mutasyonu taşıyıp taşımadıklarını kontrol etmek için kullanılır.

Kristal viyole	0.1 gr
Distile su	100 ml

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

(%0.13) Biyotin Cözeltisi

Kullanımı: Genotip kontrolü ve HBA plaklarının hazırlanmasında kullanılır.

D-Biyotin	0.00065 gr
Distile su	50 ml

D-Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülür ve 121°C'de 20 dk otoklavda steril edilir. +4 °C'de saklanır.

(%0.5) Histidin Cözeltisi

Kullanımı: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanmasında kullanılır.

L-Histidin.HCl	2 gr
Distile su	400 ml

Histidin ile distile su karıştırılarak otoklav edilir.

(%20) Glikoz Cözeltisi

Kullanımı: MGA ve HBA plaklarının hazırlanmasında kullanılır.

Glikoz	20 gr
Distile su	100 ml

Glikoz distile su içinde çözülerek otoklav edilir. 0-4°C’de saklanır.

Top Agar

Kullanımı: Mutasyon deneyinde kullanılır.

Agar	1.5 gr
NaCl	1.25 gr
Distile su	250 ml

Maddeler su içinde çözülerek, 121 °C’de 20 dk otoklavlanarak steril edilir.

Histidin/Biyotin plakları (HB agar)

Kullanımı: Histidin gereksinim deneyinde kullanılır.

Agar	3 gr
Distile su	180 ml
50X VBM	4 ml
%20 Glikoz	20 ml
Histidin.HCl	2 ml
Biyotin çözeltisi	1.2 ml

Agar ve su karıştırıldıktan sonra otoklav edilir. 45°C'ye kadar soğutulup %20 glikoz, 50X VB tuzları ve histidin çözeltisi eklenir. Son olarak biyotin çözeltisi eklenir. Karışım steril petrilere dökülür.

Histidin/Biyotin/Ampisilin plakları (HBA agar)

Kullanımı: Ampisiline dirençlilik testi ve "Master Plate" hazırlanmasında kullanılır.

Agar	3 gr
Distile su	182 ml
50X VB Tuz	4 ml
%20 Glikoz	20 ml
Histidin.HCl.H ₂ O	2 ml
0.5 mM Biyotin	1.2 ml
(%0.8/0.2 NaOH) Ampisilin	0.6 ml

Agar ve su otoklavlanır. 45°C'ye soğutulup %20 glikoz, 50X VB tuzları ve histidin bu solüsyona eklenir. Sıcaklık biraz daha azalınca biyotin ve ampisilin eklenerek petrilere dökülür. Bu plaklarda bakteriler +4 °C'de 2 ay süreyle saklanır.

Minimal Glikoz Agar Plakları (MGA)

Kullanımı: Spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü; pozitif kontrol, solvent kontrol ve mutasyon deneylerinde kullanılır.

Agar	7.5 gr
Distile su	415 ml
50X VB tuz	10 ml
%20 Glikoz	50 ml

Agar ve su karıştırılıp çözülür ve otoklavlanır. 45 °C'ye soğutulup %20 glikoz ve 50X VB tuzları yavaş yavaş karıştırılarak eklenir, petrilere 30'ar ml dökülür.

Nutrient Agar Plakları (NA)

Kullanımı: Gecelik kültürün ml'sindeki bakteri sayısını bulma ve genotip kontrolünde kullanılır.

Oxoid Nutrient Broth	2.6 gr
Agar	1.6 gr
Distile su	100 ml

Agar, broth ve su karıştırılıp otoklavlanır ve petrilere 30'ar ml dökülür.

Nutrient Broth Sıvı Kùltür Ortamı (NB)

Kullanımı: Gecelik kùltürün hazırlanmasında kullanılır.

Oxoid Nutrient Broth	5 gr
Distile su	200 ml

Broth ve su karıştırılıp otoklavlanır. Daha sonra ampisilin eklenir. +4 °C'de muhafaza edilir.

Sodyum Azid (SAZ)

Kullanımı: Pozitif kontrollerde TA100 suşu için kullanılır.

5 µg/petri olmak üzere DMSO içinde çözümlenerek hazırlanır. 0-4°C'de saklanabilir.

4-nitro-o-Fenilendiamin (NPD)

Kullanımı: Pozitif kontrollerde TA98 suşu için kullanılır.

2.5 mg/petri olmak üzere DMSO'da çözümlenerek kullanılır. Oda sıcaklığında saklanır.

2.2. Yöntem

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi'nden elde edilen test bakterilerinin stok kültürlerinin hazırlanması ve bakterilerin genetik özelliklerinin kontrol edilmesi ile Ames/*Salmonella* testi Maron ve Ames'in yöntemine uygun olarak yapılmıştır.

Deneyde her doz her suş için 3 plak halinde denenmiştir. Ayrıca pozitif kontrol, solvent kontrol ve spontan kontroller deneye paralel olarak denenmiştir.

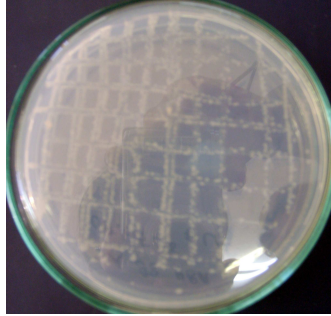
2.2.1. *Salmonella* suşlarının kültürlerinin ve master plakların hazırlanması

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

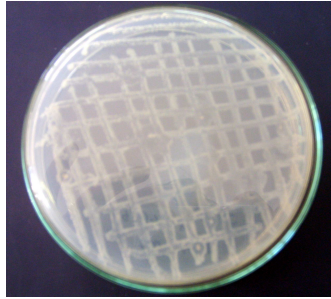
2.2.2. *Salmonella* suşlarının saklanması ve stok kültürlerin açılması

Test suşlarının uzun süre canlılıklarını ve mutant özelliklerini koruyabilmeleri için stoklanmaları gerekir. Bunun için HBA agarda üremiş olan *Salmonella* suşlarından iyi izole olmuş, normal büyüklükteki bir koloni öze ile alınıp 2 ml Nutrient Broth (NB) içeren tüplerde süspansiyon edilerek 37°C'de bir gece inkübe edilir. Bu sürenin sonunda steril eppendorf tüpüne 950 µl sıvı bakteri kültürü, 700 µl otoklavlanmış skim milk ve 50 µl DMSO ilave edilip -20°C'de donması sağlandıktan sonra -80°C'de saklanır.

Kültürlerin açılması gerektiğinde, stok bakteri kültürü oda sıcaklığında eritilip bir öze dolusu alınarak Histidin/Biyotin (HB) agar plaklarına paralel ekim yapılır. 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra HB plaklarında üreyen bakterilerden iyi izole olmuş bir koloni öze ile alınıp Histidin/Biyotin/Ampisilin (HBA) agar plaklarına paralel ekim yapılır. HBA plakları 37°C'de 48 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonrası master plaklar +4°C'de iki ay süre ile saklanabilir ve gerektiğinde gecelik kültür hazırlamak için kullanılabilir.



Şekil 2.1.a. TA98 suşunun master plaklarda üremesi.



Şekil 2.1.b. TA100 suşunun master plaklarda üremesi.

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

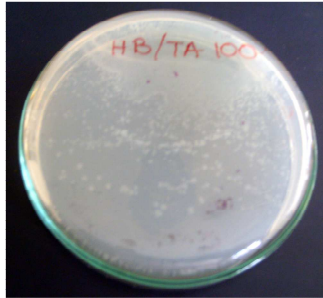
Mutasyon testlerinde test maddesinin mutant suşu atasal tipe döndürme gücü yani test suşlarının orijinal mutasyonlara sahip olup olmadığı ölçüldüğü için suşun genotip bakımından mutant karakterlere sahip olup olmadığının kontrol edilmesi testin güvenilirliği açısından gereklidir. Bu nedenle, bakterilerin genotipleri çeşitli testlerle kontrol edilir.

2.2.3.1. Histidin Gereksinimi Kontrolü

Bakterilerin Minimal Glikoz Agar (MGA) üzerine ekilmeleri sonucu his⁻ bakterileri his⁺ bakterilerinden ayırt edilir. Bu amaçla bakteriler Nutrient Broth'da (NB) 1 gece üretilir. MGA ve Histidin Biyotin (HB) plaklarına çizgi ekim yapılır. 37°C'de 48-72 saat inkübe edilir. HB plaklarında üreme gözlenirken, MGA plaklarında üreme gözlenmez. Böylece kullandığımız bakterilerin his⁻ mutasyonu taşıdığı anlaşılır (Şekil 2.2.a., Şekil 2.2.b., Şekil 2.2.c., Şekil 2.2.d.).



Şekil 2.2.a. TA98 suşunun HB plağında Histidin gereksinimi kontrolü.



Şekil 2.2.b. TA100 suşunun HB plağında Histidin gereksinimi kontrolü.



Şekil 2.2.c. TA98 suşunun MGA plağında Histidin gereksinimi kontrolü.



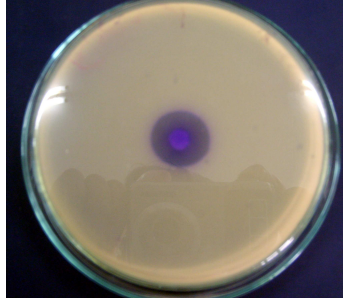
Şekil 2.2.d. TA100 suşunun MGA plağında Histidin gereksinimi kontrolü.

2.2.3.2. Rfa Mutasyonu Kontrolü

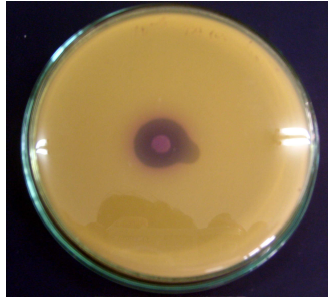
Bu mutasyon bakteri hücre zarının lipopolisakkarit yapısında, hücre zarının geçirgenliğini arttırmak için oluşturulmuştur. Varlığı kristal viyole duyarlılık testi ile tespit edilir.

Bu test için; bakteriler NB'da bir gece üretilir. 0.1 ml sıvı kültür 45°C'lik su banyosunda ısıtılmış 2 ml top agar üzerine ilave edilir. Nutrient Agar (NA) plaklarına dökülür. Plaklara 8 işareti yaptırılır. 10 dk donması beklenir. Plağın ortasına 0.5 cm çaplı steril filtre kağıdı disk yerleştirilir. Diskin ortasına %0.1'lik kristal viyole damlatılır. Kağıdın boyayı emmesi beklenir. Plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edilir.

İnkübasyon sonunda disk çevresinde 9 cm'lik üreme olmayan kısım gözlenir. Bu zonda, boya maddesi bakterilerin içine kolayca girip etkilediği için bakterilerin üremesi engellenir ve bakterilerin Rfa mutasyonu taşıdıkları anlaşılır (Şekil 2.3.a., Şekil 2.3.b.).



Şekil 2.3.a. TA98 suşunun NA plağında Rfa mutasyonu kontrolü.



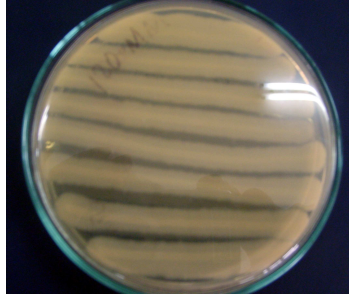
Şekil 2.3.b. TA100 suşunun NA plağında Rfa mutasyonu kontrolü.

2.2.3.3. UvrB Mutasyonu Kontrolü

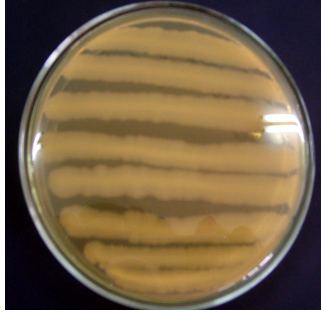
Bu mutasyon ile bakterilerde; UV ışığının neden olduğu replikasyon hatalarının düzeltilmesi için gerekli olan DNA onarım mekanizması engellenmiştir ve bu mutasyon varlığı UV ışınlarına duyarlılık testi ile tespit edilir.

Bu test için; bakteriler NB'da bir gece üretilir. NA plaklarının tamamına paralel ekim yapılır. Plağın yarısı çizgileri kesecek şekilde plastik bir tabaka ile kapatılır. 15 watt gücünde bir UV lambası ile 33 cm yüksekten 8 sn süre ile ışınlanır. Işınlanmadan sonra petri kapakları kapatılır. 37°C'de 24 saat inkübe edilir.

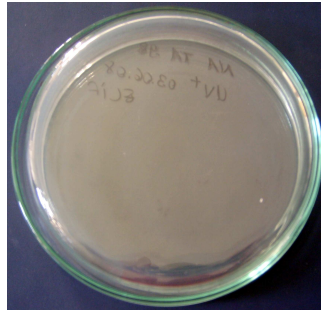
Kullanılan UV ışığı dozu, UvrB mutasyonu taşıyan bakterileri öldürecek dozdadır. Çünkü DNA kesme tamir etme mekanizması engellenmiştir. Bundan dolayı UV'ye maruz bırakılmış kısımda üreme olmazken, plastik kapakla kapatılan kısımda normal bir üreme gözlenir. Bu da bize kullanılacak bakterilerin UvrB mutasyonu taşıdığını gösterir (Şekil 2.4.a., Şekil 2.4.b., Şekil 2.4.c., Şekil 2.4.d.).



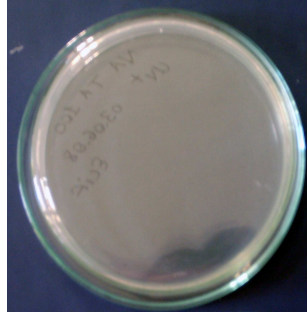
Şekil 2.4.a. UV'ye maruz bırakılmayan TA98 suşunun NA plağında UVrB mutasyonu kontrolü.



Şekil 2.4.b. UV'ye maruz bırakılmayan TA100 suşunun NA plağında UVrB mutasyonu kontrolü.



Şekil 2.4.c. UV'ye maruz bırakılan TA98 suşunun NA plağında UVrB mutasyonu kontrolü.



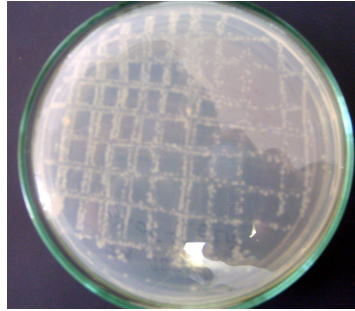
Şekil 2.4.d. UV'ye maruz bırakılan TA100 suşunun NA plağında UVrB mutasyonu kontrolü.

2.2.3.4. R Faktör Varlığı Kontrolü

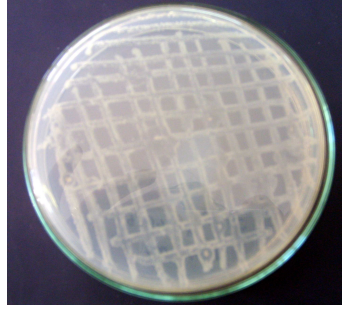
Test bakterilerinin içerdiği R faktör taşıyan pKM101 plazmidlerinin kaybolup kaybolmadıkları, ampisiline dirençliliğinin ölçülmesi ile tespit edilir.

Bu amaçla bakteriler NB'da 1 gece üretilir. Ampisilin içeren HBA (Histidin-Biyotin-Ampisilin) plaklarına çizgi ekim yapılır. 37°C'de 24 saat inkübe edilir.

Plazmid içeren mutant bakterilerin ampisilinli ortamda büyüdüğü gözlenir. Bakteriler R faktör plazmidini içermektedir (Şekil 2.5.a., Şekil 2.5.b.).



Şekil 2.5.a. TA98 suşunun HBA plağında R faktör varlığı kontrolü.

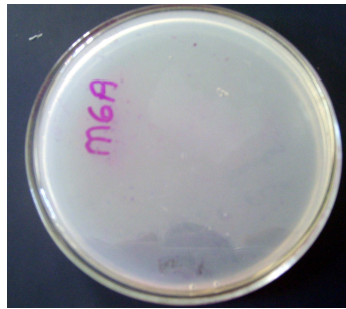


Şekil 2.5.b. TA100 suşunun HBA plağında R faktör varlığı kontrolü.

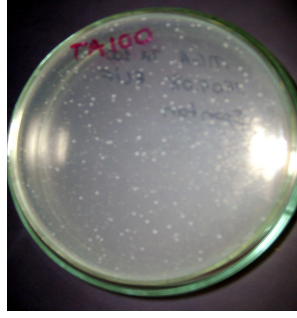
2.2.3.5. Spontan Olarak Geriye Dönüş Sıklığının Kontrolü

Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his^- durumdan his^+ e dönüşmesi belirli sınırlar içinde mümkündür. TA98 ve TA100 suşlarının genetik yapılarının kontrolüne ek olarak bu suşların MGA'da belirli sınırlar içinde uyarılmadan dönüşmesi kontrol edilir.

Bu test için; 37°C'de NB'da bir gecelik kültür üretilir. 0.1 ml gecelik kültür 45 °C'deki su banyosundaki top agar üzerine ilave edilir. 0.2 ml 0.5 M Histidin-Biyotin solüsyonu eklenir. Test tüpü yavaşça çalkalanarak MGA plaklarına yayılır. 37°C'de 48 saat inkübe edilir. Revertant koloniler sayılır (Şekil 2.6.a., Şekil 2.6.b.).



Şekil 2.6.a. TA98 suşunun MGA plağında spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü.



Şekil 2.6.b. TA100 suşunun MGA plağında spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü.

2.2.4. Test maddelerinin sitotoksik etkilerinin saptanması

Kullanılan test maddelerinin test bakterileri için öldürücü dozunun saptanması amacıyla top agara 0.1 ml bakteri kültürü ve 0.1 ml test maddelerinin değişik konsantrasyonları eklenir. Tüpteki karışım Nutrient Agar plaklarına dökülür ve 37°C’de 24 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda plaktaki koloniler sayılır. Kimyasal madde eklenmeyen kontrol plakları ile karşılaştırılarak toksik ve toksik olmayan dozlar belirlenir.

Buna göre test maddelerinin 100 µg/plak dozu toksik olarak belirlenmiştir ve deneyin 5 µg/plak, 10 µg/plak, 25 µg/plak, 50 µg/plak ve 100 µg/plak doz seviyeleri ile yapılmasına karar verilmiştir.

2.2.5. Ames mutajenite testinin yapılışı

Deneyin amacı, daha önceden büyümesi için histidin amino asidine gereksinim duyan oksotrofik (histidin sentezleyemeyen) suşların, kullandığımız test maddeleri ile tekrar histidin sentezleyebilir yani prototrofik hale dönüşmesi temeline dayanır. Deneyler her bir suşa 3 plak tekrarı ile yapılır.

Her deney suşu karakteristik spontan mutant özellik taşımaktadır. TA98 için spontan koloni sayısı 20-50, TA100 için 125-200 kolonidir.

Ames/*Salmonella* deneyinde mutajenitenin belirlenmesi steril koşullar altında minimal glikoz agar plaklarına 0.1 ml örnek, 0.2 ml histidin/biyotin içeren 2 ml top agar ve 0.1 ml taze *Salmonella* gecelik kültürün eklenmesiyle 48 saatlik inkübasyon sonucu karakteristik final

populasyonun gözlenmesiyle gerçekleşir. Tüpler yaklaşık 2 saniye düşük hızda vortex ile karıştırılır ve direk minimal glikoz agar plaklarına dökülür. Plakların her birinden her bir suş için 3 tekrar yapılır. Plaklar ters çevrilir ve 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılır. Test maddeleri DMSO içinde çözülür. DMSO solvent kontrol için de kullanılır. Pozitif kontrol kimyasalları TA98 için 4_nitro_o_fenilendiamin, TA100 için sodyum azid'dir. 48 saatlik inkübasyon sonucunda histidin bağımlı bakteriler doza bağlı artış gösterirler. Sonuçlar Zeiger ve arkadaşlarının tanımlamalarına göre değerlendirilir.

2.2.5.1. Sonuçların Değerlendirilmesi

Bu çalışmada 6 ayrı rutenyum türevinin ve cisplatinin mutajenik aktivitesi *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 mutant suşları ile araştırıldı. Her doz 3 paralel plak ile aynı zamanda test edildi. Her deneye paralel olarak spontan revertant kontrol, solvent kontrol (DMSO kontrolü) ve pozitif kontroller yapıldı.

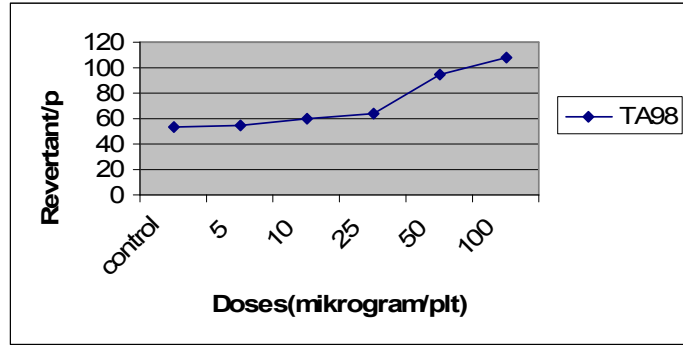
İstatistiksel analiz aşamasında tek yönlü varyans analizi kullanılarak, çoklu karşılaştırma testlerinden Dunnett testi ile sonuçlar değerlendirildi. Uygulamalar SPSS paket programında gerçekleştirildi.

3.BULGULAR

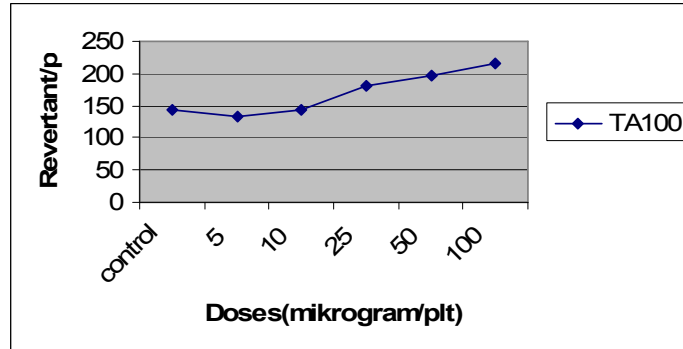
3.1. Rutenyum Türevlerinin ve Cisplatin'in Mutajenik Aktivitelerinin Ames Testi ile Ölçülmesi

Materyal ve yöntem bölümünde açıklandığı gibi rutenyumun 6 türevinin ve cisplatinin mutajenik aktivitesi söz konusu test maddelerinin 5 ayrı dozu ile test edildi. Her doz için 3 ayrı plağa ekim yapıldığından değerler bunların ortalaması olarak verildi.

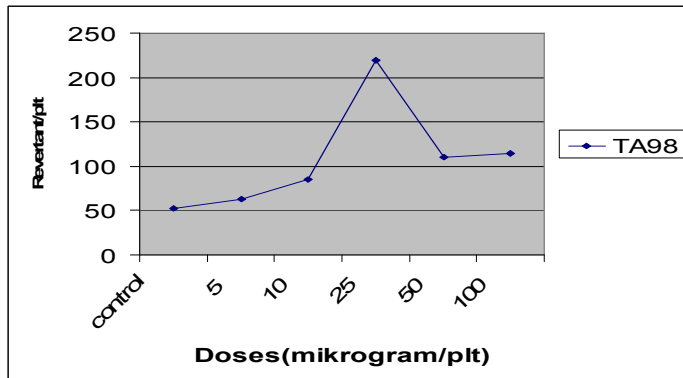
Test bakterilerimizin (*Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşları) kimyasal test maddeleri ile verdiği doz cevap eğrileri grafiklerde yer almaktadır.



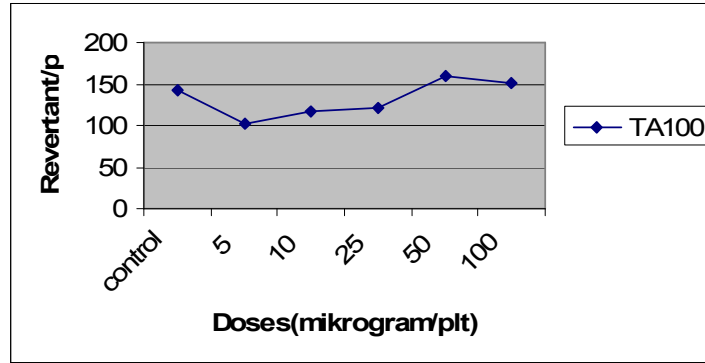
Grafik 1. RuL₂BPT'nin TA98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



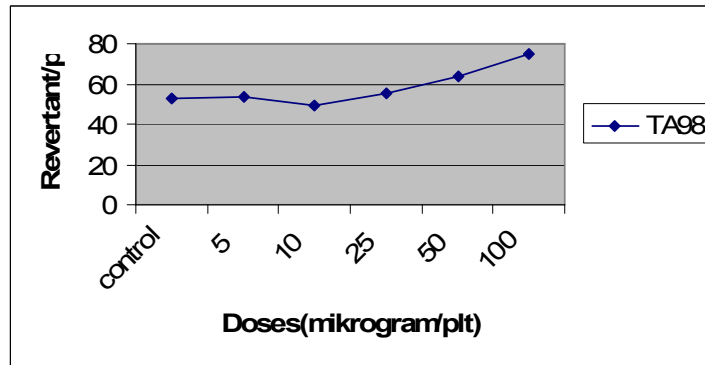
Grafik 2. RuL₂BPT'nin TA100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



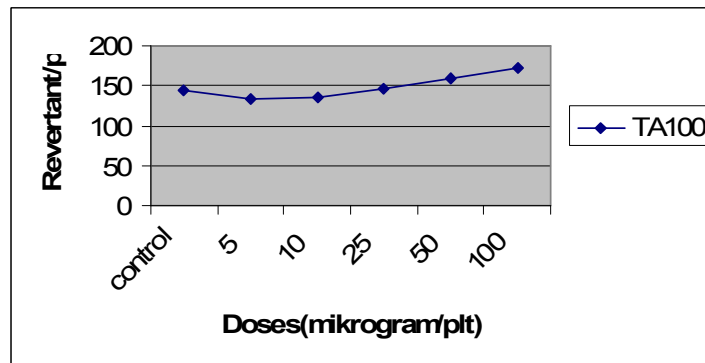
Grafik 3. RuL₃BPT'nin TA98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



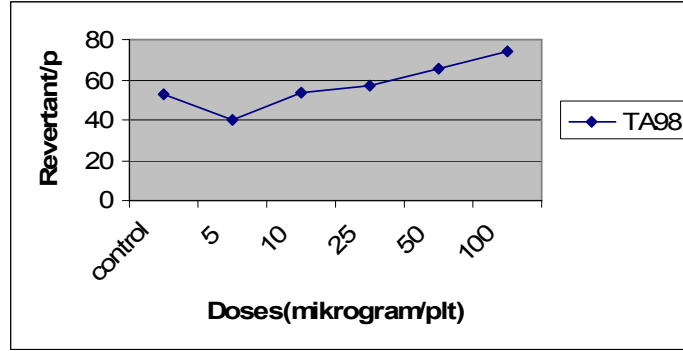
Grafik 4. RuL₃Bpt'nin TA100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



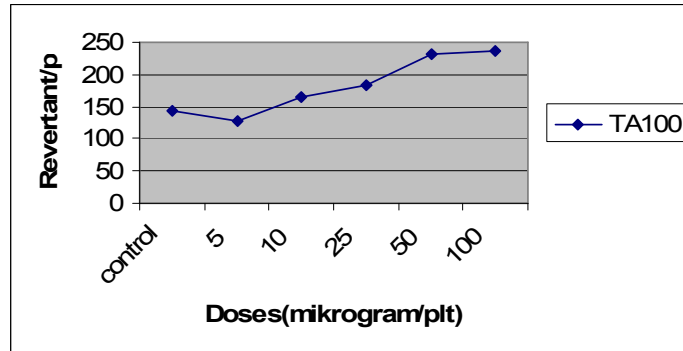
Grafik 5. RuL₄Bpt'nin TA98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



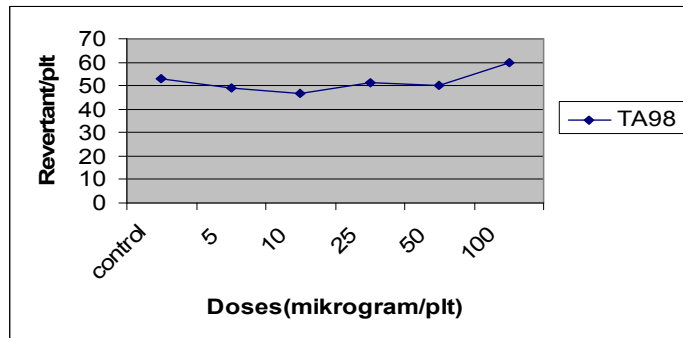
Grafik 6. RuL₄Bpt'nin TA100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



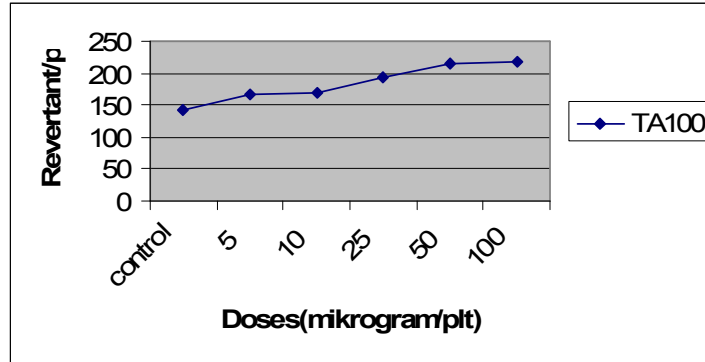
Grafik 7. RuL₅Bpt'nin TA98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



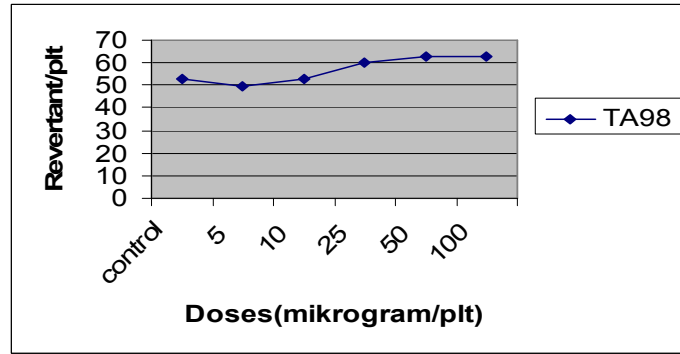
Grafik 8. RuL₅Bpt'nin TA100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



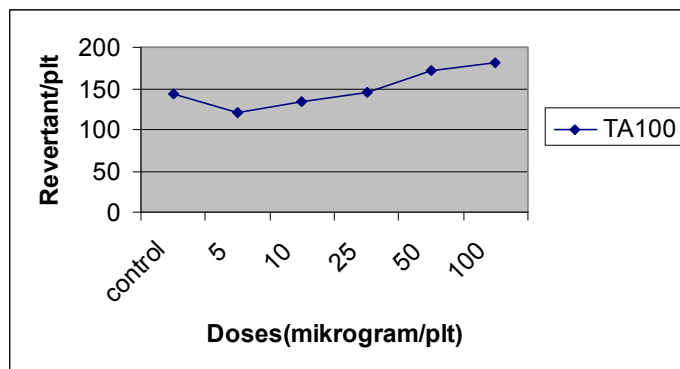
Grafik 9. RuL₆Bpt'nin TA98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



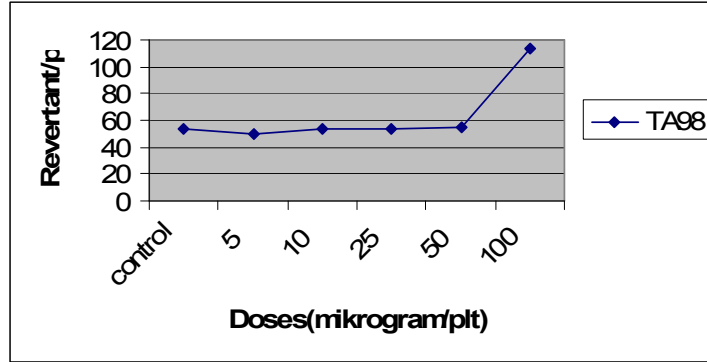
Grafik 10. RuL₆BPt'nin TA100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



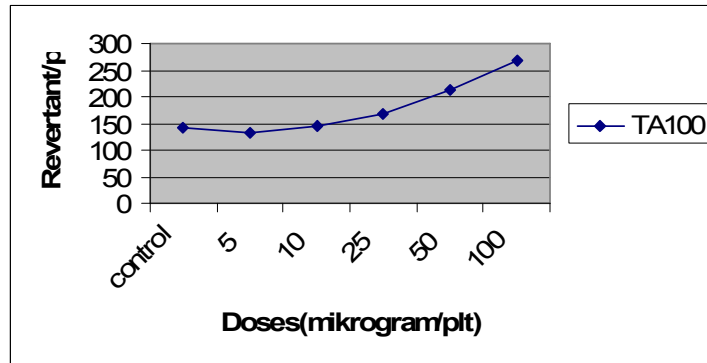
Grafik 11. RuL₇BPt'nin TA98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



Grafik 12. RuL₇BPt'nin TA100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



Grafik 13. Cisplatin'in TA98 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.



Grafik 14. Cisplatin'in TA100 suşu ile verdiği doz cevap eğrisi.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, 6 ayrı rutenyum türevinin ve cisplatinin mutajenik aktiviteleri *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 mutant suşları kullanılarak Ames/*Salmonella* test sistemiyle araştırıldı. Deney her madde için 5µg/plak, 10 µg/plak, 25 µg/plak, 50 µg/plak ve 100 µg/plak olmak üzere beş dozda gerçekleştirildi. Sonuçlar bulgular kısmında grafikler halinde verildi. Pozitif kontrol olarak TA98 için 4_nitro_o_fenilendiamin, TA100 için sodyum azid kullanıldı.

Potansiyel antitümör aktivitesi olarak kullanılan 6 ayrı rutenyum türevinin ve kanser tedavisinde kullanılan cisplatinin aktiviteleri Ames/*Salmonella* test sistemiyle araştırılmıştır.

Kullanılan test maddelerinden RuL₂BPt'nin ve Cisplatin'in 100 µg/plak dozları TA98 ve TA100 suşları üzerinde kesin olarak mutajenik etkili bulunmuştur.

Kullanılan test maddelerinin mutajenik etkilerinin incelendiği bir çalışmada; [Ru(phi)₃]²⁺'nin 1000 mg/plak, 2500 mg/plak ve 5000 mg/plak TA98 ve TA100 suşları üzerinde mutajenik etkili bulunmuştur [46].

Kimyasallarla yapılan bir çalışmada benzin kloridin TA98 ve TA100 suşları üzerindeki mutajenik etkisi Ames/*Salmonella* test sistemi ile incelenmiştir. Test maddesi TA100 suşunda daha anlamlı sonuçlar vermiş, buna göre test maddesinin nokta mutasyonu şeklinde direkt mutajenik etkili olduğu saptanmıştır [47].

Sigara dumanının mutajenik etkisinin TA98 ve TA100 suşları üzerindeki etkisinin incelendiği diğer bir çalışmada, TA98 suşunun TA100 suşuna göre daha duyarlı olduğu bulunmuştur. Sigara dumanının her iki suş üzerinde kuvvetli mutajenik etkili olduğu ortaya konmuştur [48].

Phoxim ve azinphos metil insektisidlerinin kullanıldığı diğer bir çalışmada ise, azinphos metilin TA98 ve TA100 suşları üzerindeki mutajenik etkisi Ames/*Salmonella* test sistemi ile bulunmuştur. Buna karşılık phoxim'in bu suşlar üzerinde mutajenik etkisine rastlanmamıştır [49].

RuL₂BPt'nin TA98 suşu için 100 µg/plt dozu mutajenik etkili bulunmuştur. TA100 suşu için 100 µg/plt dozu zayıf mutajenik etkilidir.

RuL₃BPt TA100 suşu üzerinde spontan değerler arasında sonuç vermiştir. Herhangi bir mutajenik etki gözlenmemiştir. TA98 suşu üzerinde 25 µg/plt dozu mutajenik etkili bulunmuştur.

RuL₄BPt TA98 ve TA100 suşları üzerinde doza bağlı artış göstermiş, ancak herhangi bir mutajeniteye rastlanmamıştır.

RuL₅BPt'nin TA100 suşu üzerinde 5, 10 ve 25 µg/plt dozları spontan değerleri arasında olup, 50 µg/plt dozu mutajenik etkili bulunmuştur. TA98 suşu üzerinde herhangi bir mutajenik etkiye rastlanmamıştır.

RuL₆BPt'nin tüm dozları TA98 suşu üzerinde spontan değerler arasında sonuç vermiş olup, TA100 suşu üzerinde ise 100 µg/plt dozu zayıf mutajenik etkili bulunmuştur.

RuL₇BPt TA98 ve TA100 suşları üzerinde herhangi bir mutajenite göstermemiştir.

Cisplatin'in TA98 suşu üzerinde 5, 10, 25 ve 50 µg/plt dozları kontrol değerleri arasında revertant koloni sayısı vermiş olup 100 µg/plt'de maksimum revertant koloni sayısı oluşumuna neden olmuş ve 100 µg/plt dozu mutajenik etkili bulunmuştur. TA100 suşu üzerinde ise doza bağlı düzenli bir artış ortaya çıkmasına neden olmuş ancak yine 100 µg/plt dozu mutajenik etkili bulunmuştur.

Bu bulgulara göre, 6 ayrı rutenyum türevi arasından RuL₂BPt'nin, 100 µg/plt dozu ve RuL₃BPt'nin 25 µg/plt dozu TA98 suşu üzerinde mutajenik etkilidir. RuL₅BPt'nin 50 µg/plt dozu ise TA100 suşu üzerinde mutajenik etkilidir. Cisplatin'in 100 µg/plt dozu TA98 ve TA100 suşlarının her ikisi üzerinde mutajenik etkiye sahiptir.

Ames/*Salmonella* test sistemi, kimyasal maddeler dışında hava, su, toprak kirlenmesine sebep olan karmaşık maddelerin mutajenitelerini araştırmak için de kullanılmaktadır [50].

Bunların dışında insanlarda gastrik hastalıklarda gastrik sıvıların mutajenik aktivitesi Ames/*Salmonella* test sistemi ile belirlenmiştir [51,52].

KAYNAKLAR

- [1] Anonim, "Postgraduate Summer Course Notes on Molecular Biology and Genetics Engineering in Turkish" Tübitak, 1985.
- [2] Bloching, M., Reich, W., Schubert, J., Grummt, T., Sandner, A., "The influence of oral hygiene on salivary quality in the Ames Test, as a marker for genotoxic effects", ENT-Department of Saarland University, Homburg/Saar, Germany, University Hospital and Policlinic for Oral and Plastic Maxillo-Facial Surgery, Martin Luther University, Halle-Wittenberg, Halle/Saale, Germany, Federal Environmental Office, Bad Elster, Germany, Department of Otorhinolaryngology, University Hospital and Policlinic for Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Martin Luther University, Halle-Wittenberg, Magdeburger Strasse 12, 06097 Halle/Saale, Germany, **43**, 933-939, 2007.
- [3] Josephy, P., D., Weadge, J., J., Meissner, J., Ng, F., "Ames test evaluation of two commercially available zero-valent nickel compounds", **654**, 64-68, 2008.
- [4] Korkmaz, B., "Bazı 2-Substitüe Perimidin Bileşiklerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames Mutajenite Testi ile Belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2005.
- [5] Erkkila, K., E., Odom, D., T., Barton, J., K., Chem. Rev., **99**, 2777-2795, 1999.
- [6] Zhang, Q., L., Liu, J., G., Chao, H., Xue, G., Q., Ji, L., N., "DNA-binding and photocleavage studies of cobalt(III) polypyridyl complexes: $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{IP}]^{3+}$ and $[\text{Co}(\text{phen})_2\text{PIP}]^{3+}$ ", J. Inorg. Biochem., **83**, 49-55, 2001.
- [7] Sigel, A., Sigel H., "Metal Ions in Biological Systems", (Ed: Dekker, M.), New York, **33**, 177-252, 1996.
- [8] Tan, L., F., Chao, H., Li, H., Liu, Y., J., Sun, B., Wei, W., L., N., Ji, "Synthesis, characterization, DNA-binding and photocleavage studies of $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{PPIP})]^{2+}$ and $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{PPIP})]^{2+}$ ", J. Inorg. Biochem., Department of Chemistry, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, PR China, The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, PR China, State Key Laboratory of Coordination Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093, PR China, Department of Chemistry, Southern China Normal University,

- Guangzhou 510000, PR China, **99**, 513-520, 2005.
- [9] Bodige, S., MacDonnell, F., M., "Synthesis of free and ruthenium coordinated 5,6-diamino-1,10-phenanthroline", *Tetrahedron Lett.*, Department of Chemistry and Biochemistry The University of Texas at Arlington, Arlington, Texas 76019, USA, **38** (47), 8159-8160, 1997.
- [10] Xu, H., Zheng, K., C., Lin, L., J., Li, H., Gao, Y., Ji, L., N., "Effects of the substitution positions of Br group in intercalative ligand on the DNA-binding behaviors of Ru(II) polypyridyl complexes", *J. Inorg. Biochem.*, **98**, 87- 97, 2004.
- [11] Jiang, C., W., Chao, H., Li, H., Ji, L., N., "Syntheses, characterization and DNA-binding studies of ruthenium(II) terpyridine complexes: $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{PHBI})]^{2+}$ and $[\text{Ru}(\text{tpy})(\text{PHNI})]^{2+}$ ", *J. Inorg. Biochem.*, **93**, 247-255, 2003.
- [12] Satyanarayana, S., Dabrowiak, J., C., Chaires, J., B., *Biochem.*, **32**, 2573-2584, 1993.
- [13] Hiort, C., Lincoln, P., Norden, B., *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 3448-3454, 1993.
- [14] Juris, A., Barigelletti, F., Balzani, V., Belser, P., Zelewsky, A., V., *Isr. J. Chem.*, **22**, 87-90, 1982.
- [15] Belser, P., Zelewsky, A., V., Zehnder, M., *Inorg. Chem.*, **20**, 3098-3103, 1981.
- [16] Warren, L., *Inorg. Chem.*, **16**, 2814-2819, 1977.
- [17] Barton, J., K., Goldberg, J., M., Kumar, C., V., Turro, N., J., *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 2081-2088, 1986.
- [18] Pyle, A., M., Barton, J., K., *Inorganic Chemistry*, **26** (22), 3820-3823, 1987.
- [19] Wang, J., Rivas, G., Luo, D., Cai, X., Valera, F., S., Dontha, N., *Anal. Chem.*, **68** 4365-4369, 1996.
- [20] Pyle, A., M., Chiang, M., Y., Barton, J., K., *Inorg. Chem.*, **29**, 4487-4495, 1990.
- [21] Rein, F., N., Rocha, R., C., Toma, H., E., "Electrochemical and spectroelectrochemical studies of ruthenium–edta complexes with aromatic diamines and their α -diimine derivatives", *J. Electroanal. Chem.*, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Caixa Postal 26077, CEP 05513-970, Sao Paulo, SP, Brazil, **541**, 103-108, 2003.
- [22] Fu, P., K., L., Bradley, P., M., Turro, C., *Inorg. Chem.*, **42**, 878-884, 2003.
- [23] Rulba, E., Hart, J., R., Barton, J., K., *Inorg. Chem.*, **43**, 4570-4578, 2004.
- [24] Pyle, A., M., Rehmann, J., P., Meshoyrer, R., Kumar, C., V., Turro, N., J., Barton, J.,

- K., J. Am. Chem. Soc., **111**, 3051-3058, 1989.
- [25] Yasbin, R., E., Matthews, C., R., Clarke, M., J., “Mutagenic and toxic effects of ruthenium”, Department of Microbiology, Cell Biology, Biochemistry and Biophysics, The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802 USA, Department of Chemistry, The Pennsylvania State University, University Park, PA 16802 USA, Department of Chemistry, Boston College, Chestnut Hill, MA 02167 U.S.A., Chem. Biol. Interact. Sep., **31** (3), 355- 365, 1980.
- [26] Sipka, S., R., G., Vilaplana, R., A., Perez, J., M., Fuertes, M., A., Alonso, C., Alvarez, Y., Sabo, T., J., Vilchez, F., G., “Synthesis, characterization, interaction with DNA and cytotoxicity of the new potential antitumour drug *cis*-K[Ru(eddp)Cl₂]”, Department of Chemistry, University of Belgrade, P.O. Box 158, Studentskitrg 16, 11001 Belgrade, Yugoslavia, Departamento de Química Inorgánica, Laboratorio de Química Bioinorgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, 41071 Sevilla, Spain, Departamento de Química Inorgánica y Centro de Biología Molecular ‘Severo Ochoa’ (CSIC-UAM), Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain, Laboratorio de Investigación Biomédica, Universidad Autónoma de Madrid, HGUM Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain, **97**, 215-220, 2003.
- [27] Anonim, 2009.
<http://www.itusozluk.com/goster.php/cisplatin>.
- [28] Anonim, 2009.
http://www.saglikkutuphanesi.com/ilacilar/Cisplatin-teva_10_Mg_1_Flakon.htm.
- [29] Anonim, 2009.
<http://tr.wikipedia.org/wiki/Mutasyon>.
- [30] Cummings, M., R., Klug, W., S., “Genetik”, (Ed: Öner, C.), Palme Yayıncılık, 467-471, 2003.
- [31] Anonim, 2009.
http://www.genbilim.com/images/stories/350px-nokta_mutasyon.jpg.
- [32] Anonim, 2009.
<http://homepage.usask.ca/~vim458/adviro/SPCV/evolution/2.jpg>.
- [33] Anonim, 2009.

- www.istanbul.edu.tr/fen/mbg/notlar/1209440947.ppt.
- [34] Anonim, 2009.
[http://www2.aku.edu.tr/~mkonuk/Gen mutasyonu.pdf](http://www2.aku.edu.tr/~mkonuk/Gen%20mutasyonu.pdf).
- [35] Anonim, 2009.
www.dicle.edu.tr/~vtolan/album.htm.
- [36] Anonim, 2009.
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/2f/DNA_UV_mutation.gif.
- [37] Anonim, 2009.
www.kimyaevi.org/elementler/rutenyum/rutenyum.asp.
- [38] Anonim, 2009.
<http://en.wikipedia.org/wiki/Ruthenium>.
- [39] Anonim, 2009.
<http://ansiklopedi.turkcebilgi.com/Rutenyum>.
- [40] Anonim, 2009.
<http://journals.iucr.org/e/issues/2005/01/00/cv6427/cv6427scheme1.gif>.
- [41] Ateşşahin, A., Yilmaz, S., Karahan, I., Ceribasi, A. O., & Karaoglu, A., “Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats”, *Toxicology*, **212**, 116–123, 2005.
- [42] Klahr, S., “Oxygen radicals and renal diseases”, *Miner Electrolyte Metabolism*, **23**, 140–143. A. d. O. Rios et al. / *Food Chemistry* 113 (2009), **1117**, 1113–1118, 1997.
- [43] Weijl, N., I., Elsendoorn, T., J., Lentjes, E., G., W., M., Hopman, G., D., Bakker, A., W., Zwinderman, A., H., Cleton, F., J., Osanto, S., “Supplementation with antioxidant micronutrients and chemotherapy-induced toxicity in cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy: a randomised, double-blind, placebo-controlled study”, Department of Clinical Oncology, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands, Department of Clinical Chemistry, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands, Department of Dietetics and Nutrition, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands, Department of Medical Statistics, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands, **40**, 1713-1723, 2004.

- [44] Anonim, 2009.
<http://www.webalice.it/alberto.frangini/cisplatin.jpg>.
- [45] Antunes, L. M. G., & Bianchi, M. L. P., “Antioxidantes da dieta como inibidores da nefrotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina”, *Revista de Nutrição*, **17**, 89-96, 2004.
- [46] Bünger, J., Stork, J., Stalder, K., “Cytotoxic and genotoxic effects of coordination complexes of platinum, palladium and rhodium in vitro”, Department of Occupational and Social Medicine at the Centre of Environmental and Occupational Medicine, Georg-August University Göttingen, Waldweg 37, D-37073 Göttingen, Germany, **69**, 33-38, 1996.
- [47] Benkli, K., Tunalı, Y., Cantürk, Z., Artagan, Ö., Alanyalı, F., “Cytotoxic and genotoxic effects of [Ru(phi)3]2ş evaluated by Ames/Salmonella and MTT methods”, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Chemistry, Anadolu University, 26470 Eskişehir, Turkey, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, Anadolu University, Eskişehir, Turkey, Faculty of Science, Department of Biology, Anadolu University, Eskişehir, Turkey, 1-5, 2008.
- [48] Fall, M., Haddouk, H., Morin, J., P., Forster, R., “Mutagenicity of benzyl chloride in the *Salmonella*/microsome mutagenesis assay depends on exposure conditions”, Inserm U644, Faculté de Médecine, 76183 Rouen, France, CIT, BP 563, 27000 Evreux, France, **633**, 13-20, 2007.
- [49] Aufderheide, M., Gressmann, H., “A modified Ames assay reveals the mutagenicity of native cigarette mainstream smoke and its gas vapour phase”, Department of In-Vitro Toxicology, Fraunhofer Institute of Toxicology and Experimental Medicine, Nikolai-Fuchs-Strasse 1, 30625 Hannover, Germany, **58**, 383-392, 2007.
- [50] Arroya, S., G., Eslava, J., C., Pietrini, R., V., Segura, M., E., C., Marque, A., R., F., Aguirre, J., J., E., “Differential mutagenic response of *Salmonella typhimurium* to the plant-metabolized organophosphorus insecticides, phoxim and azinphos methyl”, Laboratorio de Citogenética Ambiental, Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria,

Coyoacán 04510, D.F., México, Laboratorio de Mutagénesis Ambiental, Centro de Ciencias de la Atmósfera, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510 D.F., México, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510 D.F., México, **21**, 950-955, 2007.

- [51] Dilek, B., “Porsuk Nehri’nin Genetotoksik Etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 2004.
- [52] Hrelia, P., Fimognari, C., Maffei, F., Brandi, G., Biasco, G., Cantelli-Forti, G., “Mutagenic and clastogenic activity of gastric juice in human gastric diseases”, *Mutation Research*, **514**, 125-132, 2002.