

**SAĞLIKLI İNSAN LENFOSİTLERİNDE
IN VITRO GENOTOKSİK ANALİZLER
VE UYGULANAN YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Tuba Büyükçoban
Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Temmuz, 2010

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Tuba Büyükçoban'ın "Sağlıklı insan lenfositlerinde *in vitro* genotoksik analizler ve uygulanan yöntemlerin karşılaştırılması" başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki Doktora tezi 02/07/2010 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Doç. Dr. Berrin TÜYLÜ
Üye :	Prof.Dr. Fatma ÜNAL
Üye :	Prof. Dr. Kadriye BENKLİ
Üye :	Doç. Dr. A. Tansu KOPARAL
Üye :	Yard. Doç. Dr. Emel Ergene

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

Enstitü Müdürü

ÖZET**Doktora Tezi****SAĞLIKLI İNSAN LENFOSİTLERİNDE *IN VITRO* GENOTOKSİK
ANALİZLER VE UYGULANAN YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI****TUBA BÜYÜKÇOBAN****Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı****Danışman: Doç. Dr. Berrin TÜYLÜ
2010, 91 sayfa**

Bu tez çalışmasında, $[ZnL](ClO_4)_2$, $[NiL](ClO_4)_2$, $[CuL](ClO_4)_2$, $[CdL](ClO_4)_2$, $[CoL](ClO_4)_2$ olarak isimlendirilen, aynı liganda sahip metal kompleksi tuzlarının (1, 0,50 ve 0,25 $\mu g/ml$) insan periferik kan lenfositlerindeki genotoksik etkileri, CBMN (sitokinez bloklayıcı mikronükleus), SCE (kardeş kromatit değişimi) ve CA (kromozom aberasyonu) yöntemleri ile *in vitro* olarak araştırılmıştır. Test maddelerinin insan lenfositlerine 24 ve 48 saat uygulanması sonucunda hücreler; mikronükleus oluşumu, kardeş kromatit değişimi ve yapısal kromozom anomalileri bakımından incelenmiş, CPI (hücre proliferasyon indeksi), RI (replikasyon indeksi) ve MI (mitotik indeks) değerleri belirlenmiştir. Uygulanan sitogenetik test yöntemleri göz önüne alındığında, $[ZnL](ClO_4)_2$ maddesinin 24 ve 48 saatlik uygulamalarda; MN, SCE ve CA testlerinde doza bağlı olarak önemli ölçüde mutajenik etkili olduğu ve $[NiL](ClO_4)_2$ maddesinin de her üç testte buna benzer sonuçlar verdiği saptanmıştır. $[CuL](ClO_4)_2$ maddesi, MN ve SCE testlerinde mutajenik etkili olurken, CA oluşumu üzerine etkili olmamıştır. $[CoL](ClO_4)_2$ ve $[CdL](ClO_4)_2$ maddelerinin ise MN testinde etkisiz, CA testinde düşük dozda etkili, SCE testinde ise bazı dozlarda genotoksik etkili olarak, test bileşenleri içinde daha düşük bir genotoksisiteye sahip oldukları görülmüştür. Ayrıca tüm test maddelerinin CPI, RI ve MI değerlerinde negatif kontrole göre düşmeye sebep olarak, hücre bölünme parametrelerini de olumsuz etkiledikleri sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Genotoksisite, CBMN, SCE, CA, İnsan lenfositleri

ABSTRACT
PhD Dissertation

**IN VITRO GENOTOXIC ANALYSIS ON HEALTHY HUMAN
LYMPHOCYTES AND COMPARISION OF APPLIED METHODS**

TUBA BÜYÜKÇOBAN

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program

Supervisor: Associate Prof.Dr. Berrin TÜYLÜ

2010, 91 pages

In this study, the genotoxic effect of metal salt complexes (1, 0,50 ve 0,25 µg/ml) which have the same ligands that are called [ZnL](ClO₄)₂, [NiL](ClO₄)₂, [CuL](ClO₄)₂, [CdL](ClO₄)₂, [CoL](ClO₄)₂ were investigated with CBMN (cytokinesis-blocked micronucleus), SCE (sister chromatid exchange) and CA (chromosome aberration) techniques on human peripheral lymphocytes *in vitro*. Cells as a result of treatment time of test materials to human lymphocytes of 24 and 48 hours; were examined with regard to micronucleus generation, sister chromatid exchange and chromosomal aberrations and rates of CPI, RI and MI were shown. Taking cognizance of practised cytogenetic test methods, [ZnL](ClO₄)₂ material with treatment time of 24 and 48 hours was shown to have a significantly mutagenic effect depending on MN, SCE and dose of CA tests and it was found that [NiL](ClO₄)₂ material shows the same results with any three tests. [CuL](ClO₄)₂ materials had a mutagenic effect on MN and SCE tests and not affective on CA generation. It was approved that [CoL](ClO₄)₂ and [CdL](ClO₄)₂ materials are not effective on MN test, have a poor effect on CA test, has lower genotoxicity in test constituent parts with a genotoxic effective with some doses. Furthermore, entire test materials with regard to decrease, so far as negative control in the values of CPI, RI and MI were also negatively affected on cell division parameters.

Key Words: Genotoxicity, CBMN, SCE, CA, Human Lymphocytes

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve beni yönlendiren danışman hocam Doç. Dr. Berrin TÜYLÜ'ye;
Her zaman yanımda olan tüm çalışma arkadaşlarıma,
Teşekkür ederim.

Tuba BÜYÜKÇOBAN

Temmuz, 2010

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Mutasyonlar	4
1.1.1. Kromozom düzeyinde mutasyonlar	5
1.1.1.1. Yapısal kromozom bozuklukları ve nedenleri	5
1.1.1.2. Sayısal kromozom bozuklukları ve nedenleri	9
1.1.2. Gen düzeyinde mutasyonlar	12
1.2. Genotoksik etkili ajanlar	14
1.2.1. Fiziksel mutajenler	14
1.2.1.1. İyonize radyasyon	14
1.2.1.2. Non iyonize radyasyon	15
1.2.2. Kimyasal mutajenler	15
1.2.2.1. Baz analogları	16
1.2.2.2. Alkileyici ajanlar	16
1.2.2.3. İnterkalasyon ajanları	17
1.2.2.4. Hidroksile edici ajanlar	17
1.2.2.5. Diğer kimyasal ajanlar	17
1.2.2.6. Klastojenik ajanlar	18
1.2.2.7. Metabolik aktivasyon ile aktive olan ajanlar	18
1.3. Genetik Toksikoloji Testleri	18
1.3.1. Bakteriyal yöntemler	19
1.3.1.1. Ames (salmonella/mikrozom) testi	19
1.3.1.2. SOS (umu) testi	20

1.3.1.3. E.coli lac I mutasyon test sistemi.....	20
1.3.2. Sitogenetik yöntemler	21
1.3.2.1. Yapısal kromozom bozulma (CA) testi.....	26
1.3.2.2. Kardeş kromatid değişimi (SCE) testi.....	27
1.3.2.3. Mikronükleus (MN) testi	28
1.3.3. DNA' daki hasarı saptayan diğer yöntemler.....	30
1.3.3.1. Comet (single cell gel electrophoresis) testi	30
1.3.3.2. Mouse lymphoma testi	31
1.3.3.3. HPRT gen mutasyon testi	32
1.3.3.4. Muta mouse / Big blue yöntemi.....	32
1.3.3.5. TCR Gen Mutasyon test sistemi	33
1.4. Sitogenetik yöntemler ile ilgili çalışmalar	33
2. MATERYAL VE METOD	37
2.1. Materyal	37
2.1.1. Test maddeleri.....	37
2.1.2. Test maddelerinin genel kimyasal formülleri	37
2.1.3. Test maddelerinin dozları ve hazırlanışı	37
2.2. Metod	38
2.2.1. Kullanılan deney ekipmanları ve kimyasallar.....	38
2.2.2. Lenfosit kültürü.....	39
2.2.3. CBMN Metodu	39
2.2.4. SCE ve CA Metodu	40
2.3. İstatistiksel Analiz	41
2.4. CPI'nın (Hücre Proliferasyon İndeksi) Saptanması	42
3. BULGULAR	43
4.TARTIŞMA SONUÇ	71
KAYNAKLAR	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
1.1. Sentrik halka ve asentrik fragment.....	7
1.2. Disentrik ve trisentrik kromozom aberasyonları.....	8
1.3. Kromatid tipi aberasyonlar.....	9
1.4. Kromozom tipi aberasyonlar.....	9
1.5. CBMN test prosedürü	22
1.6. Tek mikronükleuslu binukleat hücre.....	23
2.1. [ML] (ClO ₄) ₂	37
3.1. Bir mikronükleuslu iki çekirdekli hücre	64
3.2. İki çekirdekli hücre	64
3.3. Üç çekirdekli hücre	65
3.4. Dört çekirdekli hücreler	65
3.5. 2'li kardeş kromatit değişimleri gözlenen kromozomlar.....	66
3.6. 3'lü kardeş kromatit değişimleri gözlenen kromozomlar.....	66
3.7. 6'lı kardeş kromatit değişimleri gözlenen kromozomlar.....	67
3.8. 7'li kardeş kromatit değişimleri gözlenen kromozomlar.....	67
3.9. 9'lu kardeş kromatit değişimleri gözlenen kromozomlar.....	68
3.10. Kromozom aberasyonu (sister union).....	68
3.11. Kromozom aberasyonu (kromatid kırığı).....	69
3.12. Kromozom aberasyonu (disentrik kromozom)	69
3.13. Kromozom aberasyonu (kromozom kırığı).....	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
3.1. [ZnL](ClO ₄) ₂ CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN değerleri ve CPI sonuçları	44
3.2. [NiL](ClO ₄) ₂ CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN değerleri ve CPI sonuçları	45
3.3. [CuL](ClO ₄) ₂ CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN değerleri ve CPI sonuçları	46
3.4. [CdL](ClO ₄) ₂ CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN değerleri ve CPI sonuçları	47
3.5. [CoL](ClO ₄) ₂ CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN değerleri ve CPI sonuçları	48
3.6. [ZnL](ClO ₄) ₂ 'in 24 ve 48 saatlik muamelelerinin CA (kromozom aberasyonları) üzerine etkisi	49
3.7. [NiL](ClO ₄) ₂ 'in 24 ve 48 saatlik muamelelerinin CA (kromozom aberasyonları) üzerine etkisi	50
3.8. [CuL](ClO ₄) ₂ 'in 24 ve 48 saatlik muamelelerinin CA (kromozom aberasyonları) üzerine etkisi	51
3.9. [CdL](ClO ₄) ₂ 'in 24 ve 48 saatlik muamelelerinin CA (kromozom aberasyonları) üzerine etkisi	52
3.10. [CoL](ClO ₄) ₂ 'in 24 ve 48 saatlik muamelelerinin CA (kromozom aberasyonları) üzerine etkisi	53
3.11. [ZnL](ClO ₄) ₂ 'in kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi.....	54
3.12. [NiL](ClO ₄) ₂ 'in kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi	55
3.13. [CuL](ClO ₄) ₂ 'in kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi	56
3.14. [CdL](ClO ₄) ₂ 'in kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi	57
3.15. [CoL](ClO ₄) ₂ 'in kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi	58
3.16. [ZnL](ClO ₄) ₂ 'in DNA replikasyonu ve mitoz bölünme üzerine etkisi.....	59
3.17. [NiL](ClO ₄) ₂ 'in DNA replikasyonu ve mitoz bölünme üzerine etkisi.....	60
3.18. [CuL](ClO ₄) ₂ 'in DNA replikasyonu ve mitoz bölünme üzerine etkisi.....	61
3.19. [CdL](ClO ₄) ₂ 'in DNA replikasyonu ve mitoz bölünme üzerine etkisi.....	62
3.20. [CoL](ClO ₄) ₂ 'in DNA replikasyonu ve mitoz bölünme üzerine etkisi.....	63

KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrad (Derece)
Bn	: Binüklead hücre
BrdU	: 5'-Bromo-2'-Deoxyuridine
CA	: Kromozom aberasyonu
CHO	: Çin Hamster ovaryum
cm	: Santimetre
Cyt-B	: Sitokalsin B
CPI	: Cell Proliferasyon İndeksi
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DS	: Disentrik Kromozom
gr	: Gram
KCl	: Potasyum Klorür
KH ₂ PO ₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
LD ₅₀	: Bir kimyasalın deneklerin yarısını öldüren toksik dozu
Lt	: Litre
mg	: Miligram
MI	: Mitotik İndeks
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
MMC	: Mitomisin C
MMS	: Methyl methanesulfonate
MN	: Mikronükleus
N	: Normalite
Na ₂ HPO ₄	: Disodyum hidrojen fosfat
NaCl	: Sodyum Klorür
NADPH	: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
Nm	: Nanometre
RI	: Replikasyon İndeksi
RNA	: Ribonükleik Asit

Rpm	: Round (Rotor) Per Minute (devir/dakika)
SC	: Kardeş kromatid
SCE	: Kardeş kromatid değişimi
SMART	: Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi
SS	: Standart Hata
SU	: Sister Union
UV	: Ultraviyole
WHO	: Dünya Sağlık Teşkilatı (World Health Organisation)
μ l	: Mikrolitre

1. GİRİŞ

Genotoksisite, genetik materyalde genotoksik etkili fiziksel ya da kimyasal ajanlar ile oluşturulan hasarları ifade eden bir terimdir. Genetik materyali tehdit eden, son ürün oluşumunu etkileyen ve mutajen olarak bilinen bu ajanlar, fiziksel ya da kimyasal kaynaklı, doğal ya da yapay olabilen, DNA'nın yapısını ve düzenini değiştiren, doğrudan ya da dolaylı olarak DNA'yı hedefleyen, proteinlere bağlanan, sitoplazma etkinliğini, bütünlüğünü ve viskozitesini değiştiren ajanlardır [1, 2]. Genetik materyalde oluşan hasarlar, DNA onarım mekanizmaları tarafından düzeltilemediğinde, kromozom ya da gen düzeyinde olabilen mutasyonlara yol açarlar. Farklı mekanizmalarla, değişik biçimlerde meydana gelerek, genetik yapıda mikro ya da makro düzeyde hasara yol açan mutasyonlar, genotoksisiteyi saptayabilen çok çeşitli yöntemler ile belirlenebilmektedir. Genetik materyal üzerinde kromozom ve gen düzeyinde meydana gelen hasarları tespit eden genotoksisite testleri, fiziksel ve kimyasal ajanlara maruziyet, birey ya da populasyon duyarlılığı, risk değerlendirme, doz yanıt ilişkisi ve tedavi rejimlerinin etkinliği konularının araştırıldığı çalışmalardır. Bu nedenle de çok sayıda kullanım alanına ve amacına sahiptirler. Bunlar içinde; çevresel kirleticilerden etkilenme, gıda ve ilaç kullanımındaki etkilenme, mesleki maruziyet ile etkilenme olguları başta gelmektedir. Genotoksisite ya da mutajeniteyi belirlemeye yönelik çalışmalar, 1970'li yıllardan günümüze dek gelişerek devam etmektedir. Bu sayede yaşamın her alanında maruz kalınma olasılığı bulunan tüm genotoksinleri saptama ve bu ajanlarla ilgili gerekli önlemleri alma olanakları gelişmektedir.

Genetik hasarı, kromozom düzeyinde tespit edebilen "Sitogenetik Yöntemler" ile gen ya da DNA düzeyinde belirleyen diğer yöntemler, farklı mutasyonel mekanizmaları belirlemek amacıyla *in vivo* ya da *in vitro* düzeyde uygulanabilmektedir. Hücre kültürü uygulamalarının geliştirilmesinden sonra, *in vitro* testler daha yaygın ve etkin olarak kullanılmaya başlanmıştır. Sitogenetik yöntemler içinde en önemlileri: yine *in vivo* ve *in vitro* olarak uygulanabilen; kromozom aberasyon (CA), kardeş kromatit değişimi (SCE) ve mikronükleus (MN) testidir.

Mutasyonların meydana getirdiği hücrel işlev bozuklukları pek çok hastalıkla birlikte, kanserin de zeminini hazırlayan önemli bir olgudur. Çünkü deneysel olarak kansere neden olduğu kanıtlanmış maddelerin neredeyse tamamı aynı zamanda mutajenik etkili birer genotoksindirler. Bu noktada kanserden korunma stratejisinde, mutajenite araştırmalarının temel bir yeri olduğunu vurgulamak yerinde olacaktır. Karsinojen ve mutajenlerin tayini için kullanılan *in vitro* genotoksisite testleri, kültüre edilmiş çok çeşitli insan hücrelerindeki genotoksik maruziyetin sonuçlarını görebilmek açısından özel bir önem taşır. Bunun yanı sıra aynı çevresel koşullarda yaşayan, aynı mesleki ortamı paylaşan ve aynı alışkanlık ya da aynı hastalıklara sahip olan, kısacası genotoksin maruziyeti benzer olan insan grupları için yapılan çalışmalarda hücre kültürü şartlarının kullanılması kaçınılmazdır.

Günümüzde herhangi bir ilacın organ ve dokular üzerine kanserojen, mutajen, teratojen olma olasılığını araştırmak ve antikanser (terapötik) ilaç etkinliğini belirlemek için hayvan testlerine tercih edilen hücre kültürü testlerinden elde edilen sonuçların daha gerçekçi ve spesifik sonuçlar verdiği Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü tarafından da bildirilmektedir [3]. İnsan lenfositlerindeki kromozom çalışmaları, kimyasallar ve radyasyonun genotoksik etkilerini izlemek için yapılmaktadır.

Terapötik kullanım amacı ile sentezlenen maddelerde beklenen sonuç, sağlıklı hücrelere en düşük zararı vermesidir. İlaç gelişimi ve tasarımı için yapılan çalışmalarda yeni sentezlenen maddeler içerisinde metaller de tuz, toz, bileşik şeklinde farklı türevlerde kullanılmaktadır.

İlaç etken maddesi olarak tasarlanan ve test edilecek olan metallerin seçiminde; metabolizmaları, toksisite mekanizmaları, gıda ve kozmetikte kullanımı, ilaç terapisi, çevresel ve mesleki maruziyetle meydana gelen toksikolojik etkileri ile ilgili var olan *in vivo* ve *in vitro* bilgiler göz önünde tutulmaktadır [4-8].

Bazı metaller organizmanın büyüme, gelişme ve üremesi için önemli elementlerdir. Bu metallerin diyetle alınan dozları vücudun optimal biyolojik fonksiyonları için gereklidir. Diğer yanda bu metallere yüksek dozda maruziyet insan sağlığına zararlı etkiler yapabilmektedir [5]. Bu durum metal toksisitesinin

temelini oluşturan doza bağılı etki ile açıklanmaktadır (doz cevap eğrisi, Berthard, 1912).

Metal toksisitesinin araştırılmasında etkili olan mesleki ve çevresel maruziyetleri içine alan tarama testlerinin kapsamı geniştir. Hava kirliliğiyle oluşan metal maruziyetinin, ağır metal kirliliği ile oluşan metal maruziyetinin, dental uygulamalarda kullanılan döküm alaşımların genotoksik potansiyelinin, metal aracılı reaksiyonlarda oluşan serbest radikallerin genotoksikite oluşturma potansiyellerinin, metal iyonlarının doğrudan ya da dolaylı olarak doku içine salınması ile oluşan hücre hasarının belirlenmesinde CA, SCE, MN testleri kullanılmaktadır [9-13].

Metallerin de, mutajenlerin kompleks bir sınıfı olduğu bilinmektedir. Metallerin DNA'ya etkisi farklı yollarla olmaktadır. Bu bileşikler DNA'da iplik kırıkları ile DNA parçacıkları oluşumuna yol açmakta ve sonuçta genetik materyale zarar verebilmektedir [1].

Metal bazlı ilaçların genotoksisitesi çok önemlidir. Çünkü bunlar, ikincil tümör formasyonları üretebilmektedir. Kanser tedavilerinde kullanılan metal bazlı ilaçların, genetik materyalde meydana getirebileceği mutasyonlar, kromozom kırıkları oluşturarak kanserli hücre sayısının artmasına sebep olmaktadır. Kimyasal test maddeleri ve ilaç öncül maddelerinin insan kromozomlarında oluşturduğu hasarlarda kısa süreli genotoksik testlerle tespit edilebilmektedir. SCE ve MN gibi sitogenetik testler karsinojenik kimyasalların insan hücreleri üzerindeki genotoksik potansiyellerini ortaya çıkarmada sıklıkla kullanılmaktadır. İnsan lenfositlerinde MN sayısı ve SCE frekansı, yeni sentezlenen ilacın mutajenik potansiyelinin ana ilaç ile karşılaştırılmasına izin vermektedir [14].

Bu çalışmada Yard. Doç. Dr. Gühergöl Uluçam'ın doktora tezi kapsamında sentezlenen ve Prof. Dr. Kadriye Benkli tarafından analizleri yapılan, ligandları aynı olan beş farklı metal kompleksi tuzunun LD₅₀'nin (% 50 mitoz inhibisyonu yaratan doz, sitotoksik doz) altındaki dozlarının, insan periferik lenfositlerindeki genotoksik etkisi, *in vitro* olarak kromozomal düzeydeki mutasyonları belirleyen, kromozom aberasyon (CA), kardeş kromatid değişimi (SCE) ve mikronukleüs (MN) testi olmak üzere, üç ayrı sitogenetik yöntem kullanılarak araştırılmıştır.

Sözü edilen yöntemlerin tümü sözkonusu olası mutajenik etkileri saptamak amacıyla, bağımsız ya da birkaçı birlikte karşılaştırmalı olarak kullanılmaktadır. Bir testte pozitif etkili olan bir ajan, diğerinde negatif etkiye sahip olabilmekte ya da her üçünde de pozitif genotoksik aktivite gösterebilmektedir [13-16]. Bu testlerin son yıllardaki en önemli kullanım amaçlarından biri, genotoksik etkisi bilinmeyen herhangi bir fiziksel ya da kimyasal ajanın mutajenik etkisinin sağlıklı hücreler üzerinde sınılanması iken, bir diğeri de beslenme, günlük yaşam aktiviteleri ve ilaç alımı yoluyla, ya da çevresel ve mesleki olarak belirli genotoksik ajanlara sürekli maruz kalan bireylerin genetik yapılarının izlenmesi ve hasar tipinin belirlenmesidir. Bu tez çalışmasında kullanılan, genotoksisite testlerinin sözü edilen ilk amaca hizmet eden çalışma konuları içinde, farklı alanlarda kullanıma sunulan ya da sunulacak olan, kimyasal bileşiklerin mutajenik / karsinojenik potansiyellerinin ya da antimutajenik / antikarsinojenik özelliklerinin çalışılması gelmektedir. Bu çalışmada ilaç geliştirme ve ilaç öncül maddesi tasarlama amacıyla sentezlenmiş olan aynı liganda sahip beş farklı metal kompleksi tuzunun, insan lenfosit hücrelerinde kromozomal düzeyde oluşturabileceği hasarlar, diğer bir deyişle klastojenik etkiler araştırılmıştır.

1.1. Mutasyonlar

Kanser oluşumunun somatik mutasyon birikimi ile açıklanması bilinen bir doğrudur. Genotoksinler, kromozom ve genlerde değişim ya da yeniden düzenlenmeye sebep olan ajanlardır. Mutasyon ise DNA hasarına yol açan işleyiş mekanizması ile hücre ya da organizma için kalıtsal değişimdir. Toksik madde ve genetik materyal ikilisinin sonucu mutasyon olabilir. Mutasyon, mutajen denilen fiziksel veya kimyasal ajanlarla uyarılma sonucu [17] veya kendiliğinden oluşan [18] genetik materyalde meydana gelen rastgele ve ani değişikliklerdir [19, 20, 21]. Mutasyonlar popülasyonda yeni allel meydana getirebildiği gibi var olan allellerin frekansını değiştirebilirler [22]. Mutasyonun kendiliğinden meydana gelme olasılığı düşük olmasına karşın, mutajenlerin etkisiyle ortaya çıkan mutasyon frekansı oldukça yükselmektedir [18]. Mutasyonlar, kromozom

düzeyindeki mutasyonlar ve gen düzeyindeki gen veya nokta mutasyonları olmak üzere iki ana sınıfta incelenebilmektedir [22-24].

1.1.1. Kromozom düzeyinde mutasyonlar

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 ya da mitoz bölünme sırasında çeşitli boyama teknikleri kullanılarak tespit edilebilmektedir [24, 25].

1.1.1.1. Yapısal kromozom bozuklukları ve nedenleri

Kromozom kırığı ya da yeniden düzenlenmesinden oluşur. Alkilleiyici ajanların oluşturduğu kromozomda parça kaybı, ilavesi ya da yerdeğiştirmesi olayıdır. Kromozomdaki yapısal değişiklikler kromatid kollarındaki kırılmalardan oluşur. Kırılma tipi, sayısı, tekrar birleşme özelliğine göre farklı mutasyonlar gözlenebilir.

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, transpozibil elementler gibi ajanlarca oluşabilmektedir. İnsanda 5. kromozomun kısa kolundaki delesyon sonucu oluşan “cri du chat” sendromu, bireyde fiziksel kusur ve zekâ geriliğine sebep olmaktadır [18]. Terminal ve interkalar delesyonlar bulunmaktadır. Aktarılan tip mutasyonlardır.

b) Duplikasyon

Kromozom mutasyonu süreci bazen, bir kromozom segmentinin ekstra bir kopyasının üretilmesi şeklinde gelişir. Haploid organizmalarda tek set kromozom yer aldığı için duplikasyon bölgesini gözlemlemek kolay olmasına rağmen, diploid organizmalarda duplikasyon heterozigotları ilginç çift yapıları gösterebilirler. Bunlar “tandem” (ABCBCD), ya da “revers” (ABCCBD) denilen

şekillerde tanımlanabilir. Özetle, bir kromozom segmentinin kromozom üzerinde çift halde bulunması şeklindeki değişimlerdir. Aktarılan tip mutasyonlardır. [26].

c) İnverson

Bir kromozomda 2 bölgede oluşan kırığın oluşturduğu segmentin 180° dönerek tekrar kromozoma ters şekilde yapışması şeklinde meydana gelen mutasyon tipine inverson mutasyon denilmektedir. Delesyon ve duplikasyonun tersine genetik materyal miktarında herhangi bir değişiklik yoktur. İnverson kromozomlarının heterozigot çiftleri mayozda “loop” denilen yapıyı oluşturabilir. İnversondaki segment sentromer içeriyorsa “perisentrik inverson”, sentromer içermiyorsa “parasentrik inverson” adını alır. Parasentrik inverson lobu homolog sentromerler ile disentrik köprü oluştururken aynı zamanda asentrik fragment oluşumuna da yol açar [17,26]. Perisentrik inversonlar yeni karyotiplerin artmasını sağlarlar [22]. İnverson tipi mutasyonlar, homozigot halde öldürücü iken, heterozigot durumlarda fenotipe değişime yol açarlar. Homozigot inversonlu kromozomlu hücrelerde mayozda normal kromozom eşleşmesi olur [18]. Aktarılan tip mutasyonlardır.

d) Translokasyon

Homolog olmayan iki kromozom arasında, kromozom segmentinin veya gen dizisinin pozisyonunda meydana gelen bir değişiklik olup, genetik materyalde bir kazanç ya da kayıp yoktur [24]. Homolog kromozomlar arasında, bir kromozomdaki segmentin 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 [10, 21]. İnterkromozomal translokasyonda iki kromozom arasında cros over olur ve mutasyona uğrar ise resiprokal translokasyon sonucunda onkogenler aktifleşir. 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 [20]. Resiprokal translokasyonlar kromozom boyama teknikleriyle gözlenebilir. Bir takım flüoresans boyalarla işaretlenen DNA, kendine

uygun kromozomu bulur ve ona bağlanır. Bu preparasyonlar açık mavi renkte olup, pembe boyalar da farklı kromozomları boyamak için kullanılır.

İnsanlarda Down sendromlu hastalarda isokromozom 21 veya başka bir ifadeyle “Robertsonian Translokasyon” (sentrik füzyon) da denilen özel bir translokasyon tipi bilinmektedir [23, 21]. 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 [24].

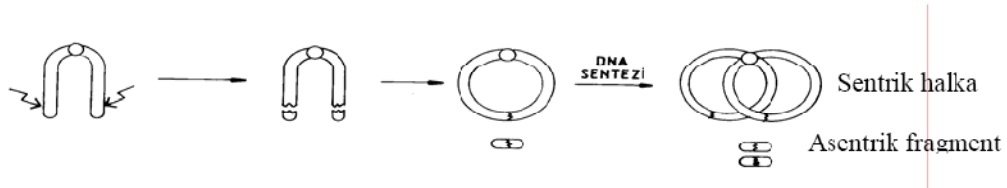
Translokasyonların insanda çoğu kez fenotipik anormallikler meydana getirdiği, hamilelikte düşüklere ya da doğumdan sonra ölümlere yol açtığı, yaşayanlarda da zihinsel kusurlara sebep olduğu bilinmektedir [18]. Aktarılan tip mutasyonlardır.

e) İzokromozom

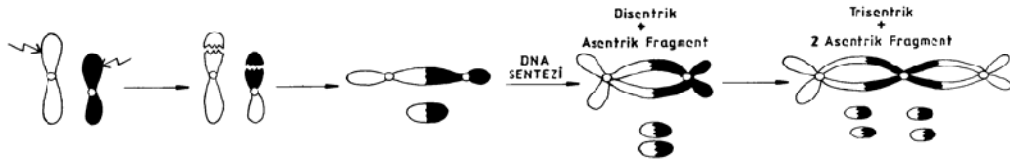
Sentromerdeki bir kıraktan meydana gelen yeni bir bir kromozomdur. İki telosentrik kromozomun açılarak özdeş kollara sahip iki kromozom meydana getirmesi ile izokromozomlar oluşur. Sentromerin enlemesine anormal şekilde bölünmesi şeklinde de ifade edilir. Aktarılmayan tipteki mutasyonlardır [18].

f) Ring (halka) kromozom

Aktarılmayan tipteki mutasyonlardır. Translokasyon ile bağlantılı olan halka oluşumu şu şekilde gerçekleşir. Kromozom eşleşmesi sırasında translokasyon noktasında dik açı yapacak bir biçim alan (translokasyon haçı) kromozomlar ancak bu şekilde orijinal kromozomlardaki homologları ile eşleşebilirler. Haç ya da kuadrivalenti oluşturan dört kromozom, kiazmaların uçlara kayması sonucu metafaz 1 de sadece uçlarından birbirlerine yapışık kalarak bir halka yapısı meydana getirirler. Bu yapılar mayozda önemli bozukluklara yol açabilirler, çünkü bu kromozomları taşıyan hücreler kısır olabildikleri gibi farklı gen ürünleri de oluşturabilirler [19].



Şekil 1.1. Sentrik halka ve asentrik fragment [27]



Şekil 1.2. Disentrik ve trisentrik kromozom aberasyonları [27]

g) Sentrik füzyon ve fizyon (Sentrik kaynaşma)











İki akrosentrik kromozomun birleşerek bir metasentrik kromozom oluşturması ve kromozom sayısında da azalmaya yol açan bir aberasyondur. Robertsonian translokasyon olarak da bilinir [18].

h) Sister union (kardeş kromatid birleşmesi)

Aktarılmayan tipteki mutasyonlardır. Birçok araştırmacıya göre kırılmalar rastgele yerlerde meydana gelmezler, buna göre kromozomlar üzerinde bazı bölgelerin kırılmaya karşı duyarlılıkları diğer bölgelere göre daha fazladır. Ayrıca kromozomlar genellikle tek kromatid halinde olduklarında yani metabolik evrede daha kolay kırılırlar. Yeniden yapışma olmaması durumunda meydana gelen sentromerli ve sentromersiz parçalar mitoz ilerlerken uzunlamasına yarılr ve her biri iki kromatid meydana getirir. Daha sonra her parçadaki kromatidin kırık uçları birbiriyle birleşebilir. Bu olaya kardeş kromatidlerin birleşmesi adı verilir [19].

i) Disentrik kromozom

Aktarılmayan tipteki mutasyonlardır. Mayoz 1 anafazında hücrenin karşılıklı kutuplarına göç ederler. İnversiyon lobundaki 2 gen arasındaki cross over dan dolayı iki sentromer anafaza birlikte göç etmeye başlayacağı için bir rekombinant kromatid disentrik köprü formasyonunu oluşturur. İki sentromerli bu kromozom disentrik kromozom adını alır [25].

kromozomlar arası değişim	farklı kollardaki değişim		aynı koldaki değişim		ara kırık
 disentrik	 sentrrik ring	 disentrik	 intersitisiyal delesyon	 isokromatid delesyon	
 resiprokal translokasyon	 perisentrrik inversiyon	 duplikasyon	 parasentrrik inversiyon	 duplikasyon delesyon	 tamamlanmamış kol içi değişimler

Şekil 1.3. Kromatid tipi aberasyonlar [28].

kromozomlar arası değişim	kollar arası değişim	kol içi değişim	ara kırık
 disentrik	 sentrrik ring	 intersitisiyal delesyon	
 resiprokal translokasyon	 perisentrrik inversiyon	 parasentrrik inversiyon	

Şekil 1.4. Kromozom tipi aberasyonlar [28].

1.1.1.2. Sayısal kromozom bozuklukları ve nedenleri

Hücre bölünmesi kusurlarından oluşur. Çeşitli tipleri olan ve her birine farklı adlar verilen kromozom sayısı değişimleri başlıca iki grup altında toplanır.

a) Öploidi

Haploid kromozom sayısının katları kadar artmasıyla kendini gösteren öploidi, kromozom takımı sayısındaki değişimler olup, bir takımdaki kromozomların hepsinin sayısının birden tam katlar halinde artması veya organizmada tek takım kromozom bulunmasıdır [19]. Öploide bireyler

monoploid, diploid, triploid, tetraploid ve poliploid şeklinde artan kromozom takımlarına sahiptir [10]. Normalde diploid olan hayvan ve bitki türlerinde ender olarak bazı bireylerin hücrelerinde sadece bir takım yani n sayıda kromozom bulunması olayına monoploidi denir. Bir monoploid sahip olduğu tüm genler için hemizigottur ve resesif genler fenotipte ifade edilirler. Poliploidi genomdaki kromozom sayısının hepsinin birden ikiden fazla kata yükselmesidir. [18-20, 25]. 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 ölürlere [20]. Bir poliploidin sahip olduğu kromozom takımlarının hepsi aynı türe aitse bu olaya otoploidi, birden fazla türe aitse allopoloidi adını alır [19, 21].

Poliploidi bazen bir bireyin somatik hücrelerinde de meydana gelir ve endoploidi olarak adlandırılır. Endomitoz sonucu meydana gelen bu olay, farklılaşmış ve bölünme yeteneği kaybolmuş bazı hücrelerde nükleus zarı kaybolmadığı halde kromozomların mitozda boyuna bölünerek sayılarını iki veya daha fazla kata yükseltmeleri sonucu oluşur. Endomitoz, anafaz ve telofazın gerçekleşmemesi ve kromozom sayısının her bölünmede 2 katına çıkmasını ifade eder [18].

Endoreduplikasyon ise kromozom sayısının artması, kromatidlerin bölünmesi ama hücrenin bölünmemesi durumudur. Endomitozda olduğu gibi kromozomlar katı kadar artar, ancak hücre bölünmesi gerçekleşmez ve böylece sentromerlerinden birbirine tutunmuş çok sayıda kromatidden oluşmuş olan kromozomlar meydana gelir [20].

b) Anöploidi

Normal kromozom setinde bir ya da birden fazla kromozom takımının kazanılması ya da kaybedilmesi şeklindeki mutasyonlardır.

Mayoz veya mitozda hücre bölünmesi ve mitotik iplik aparatını etkileyen anojenik ajanlar tarafından kromozom kaybı ya da ilavesinin olması şeklindeki mutasyonlara anöploidi denilmektedir. Anöploidi, somatik ve üreme hücrelerinde hücre bölünmesi sırasında spontan olarak ya da kimyasalların indüksiyonu ile meydana gelebilmektedir [29].

Anöploidi hayvanlarda genellikle ölümcül olup, ölü doğan fetüslerde saptanabilmektedir [24, 25]. Anoploid birey, haploid sayıdan bir eksik veya fazla sayıda kromozom taşıyan eşey hücrelerinin döllenmeye katılmasıyla oluşur [18]. Anormal sentromer yapısı, kinetokor hasarının bir sonucu olan anafazda kromozom kayıpları, anafazda kromozom düzensiz ayrılması, mitotik kayma, mikroflamentteki kusurlar sonucu sitokinez bölünmesinde oluşan hata gibi mekanizmalar sonucu meydana gelmektedir. Anöploidinin, kanserin erken aşamalarında ortaya çıkabilen bir durum olduğu tahmin edilmektedir. Yapılan çoğu çalışmada solid tümörlerde anöploidiyle ilişkili olan sentromer anormalliklerinin olduğu tespit edilmiştir [29].

Anöploidi iki ayrı senaryo içerebilir. Kromozom ayrılmaması (nondisjunction) durumunda iki kromozom aynı kutba gider. Sonuç olarak kusurlu gamet ile normal gamet birleşiminden monozomik birey oluşumu gözlenir. İkinci durum ise, anafazda geri kalmadır. İğ iplikleriyle bağlantını n kopması sonucu bir kromozomun yanlış lokalize olması durumu gerçekleşir. [20].

Diploid bir bireyde tek bir kromozomun eksik olması durumuna monosomi denir. Bu bireyin oluşumu, mayozda kromozomların ayrılmaması sonucu meydana gelen bir gamet ile normal bir gametin birleşmesi sonucu oluşur ve kromozom sayısı $(2n - 1)$ olur. İnsanda otozomlara ilişkin monosomi öldürücüdür, ancak monosomik poliploidler yaşayabilmektedir. Nullisomi ise bir kromozomun organizmada homologu ile birlikte eksik olmasıdır, $(2n - 2)$ ile gösterilirler. Polisomi durumu, bir takımdaki kromozomlardan birinin veya birkaçının sayısının artması olayıdır. Trisomi, bir diploidde bir kromozomun fazla bulunmasıdır. $(2n + 1)$ formülü ile gösterilir. [19, 25].

Otozomal trisomi $(2n+1)$ durumunda erken ölüm gözlenirken, otozomal monosomi durumunda $(2n-1)$ doğmadan ölüm gerçekleşir. Bunlar dışında nullisomi, polisomi gibi anöploidi çeşitleri vardır. Down sendromlu bireylerin otozomal kromozomlarından 21. kromozomda trisomi görülür ve pek azı yetişkinlik çağına ulaşır. Çok ender olarak çocuk sahibi olan Down sendromlu kadınlara da rastlanmaktadır. [10, 19, 20]. Otozomal monosomi ise $(2n-1)$, insanlarda gelişmeden ölen embriyolarda saptanabilmektedir [24]. 13.kromozom trisomisi Patau, 18. kromozon trisomisi Edwards sendromuna yol açan trisomiler

de gözlenmektedir. Bu bireylerde çok sayıda yapısal ve mental kusur bulunmaktadır.

1.1.2. Gen düzeyindeki mutasyonlar

Genellikle bir allel formdan diğerine olan genetik materyalin kalıtılabilir değişimleridir. Gen mutasyonu, genom içerisinde bir genin sayısı ve kromozomdaki yeri değişmeden yapısının değişmesi durumudur. DNA'daki nükleotid dizisinin, bu dizideki bazların sırasının ya da oranının değişmesi şeklinde meydana gelen ve nokta mutasyonu olarak da bilinen mutasyonlardır. Spontan (kendiliğinden) ve indüklenmiş / uyarılmış (bir ajan tarafından) mutasyon olarak sınıflandırılır [4, 24]. Spontan mutasyon nedenleri içinde DNA replikasyon hataları, tautomerik değişim, metilasyon, gen kırılması, transpozibil elementler sayılabilir.

Bir gendeki değişim sonucu yeni bir allelin oluşması ile bu alleli taşıyan organizma ya da hücre mutant adını alır. Bu mutant allel geri mutasyona uğrayarak tekrar eski haline dönebilir [18, 19, 22]. Mutasyonun bireyin fenotipinde kendini belli etme şansı değişkendir. Değişikliğin genotipte gözlenmemesi ya da canlıyı öldürmesi şeklinde ifade edilen iki uç nokta arasında mutasyonların büyük çoğunluğu bireyin fenotipinde çeşitli değişikliklere yol açar ve onun ortama uyumunu, bunun sonucunda da yaşama yeteneğini çeşitli ölçülerde etkileyebilir.

Gen yapısındaki bir mutasyon her zaman fenotipe yansımayaabilir, o genin ürününü, ürününün yapısını ve aktivitesini değiştirmeyebilir. Böyle bir durumda bu gendeki bir mutasyon sessiz (silent) mutasyon olarak adlandırılır [30, 31]. 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" denir. 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 [30, 32].

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. Hücre siklusunda her zaman gerçekleşebilir. Diğer bir durum, bir pirimidin bazının bir pürin bazıyla yer değiştirmesidir. Bu tür mutasyona ise transversiyon (çapraz geçiş) mutasyon denilmektedir [20, 30]. Transversiyon sadece DNA replikasyonu safhasında gözlenir. AT→ GC, GC→ AT, TA→CG, CG→TA şeklinde transisyon ve AT→TA, GC→CG, AT→CG, GC→ TA şeklinde de transversiyon mutasyonları meydana gelebilmektedir [24, 31]. Yapılan bir çalışmada GC→TA ve GC→CG tipi transversiyon mutasyonun oksidatif koşullarda ortaya çıktığı görülmüştür [2].

b) Çerçeve kayması (Frame-Shift) mutasyonları

Polindromik bölgelerde bir ya da birkaç bazın eklenmesi ve çıkarılması şeklindeki mutasyonlardır. Örneğin insan mitokondriyal DNA’sında ilk stop kodonunda oluşan nokta mutasyon Cyt c oksidaz sentezini engeller. 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 [32].

İnsanlarda Duchenne Müsküler Distrofi (DMD), pıhtılaşma faktörü IX eksikliği nedeniyle gelişen hemofili B ve β Talesemi gibi hastalıklarda çerçeve kayması mutasyonlarının rol oynadığı belirlenmiştir [30].

1.2. Genotoksik Etkili Ajanlar

Genotoksik etkiye sahip ajanlar iki ana grupta toplanmaktadır. Bunlar iyonize ve iyonize olmayan radyasyonun teşvikiyle meydana gelen mutasyonlardan sorumlu fiziksel ajanlar ve alkilleyici, hidroksile edici, çapraz bağlayıcı, klastojenik ajanlar, psoralenler, nitroz asidi, baz analogları olarak sınıflandırılan kimyasal ajanlardır.

1.2.1. Fiziksel mutajenler

Muller ve Stadler tarafından X ışınları gibi çeşitli radyasyonların fiziksel mutajen oldukları tespit edilmiştir. İyonize ve iyonize olmayan radyasyon şeklinde bir sınıflandırma yapılmaktadır [17, 32]. Günümüzde ve gelecekte kullanımı kaçınılmaz olan radyasyonun zararlı etkilerinden korunmanın ve biyomonitöring çalışmalarının önemini ele alındığı, biyolojik dozimetride kromozom aberasyonlarının yerinin tanımlandığı çalışmalar yapılmıştır [27].

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 [32]. İyonize radyasyonda dimerleşme oluşur ve replikasyon, transkripsiyon hataları sonucunda genetik materyalde kırılma ve kopmalar gözlenir. Sonuçta baz yapısı bozulacağı için çift zincirde karşılıklı gelmesi gereken bazlar arasında bağ yapılamaz ve iplik kırılır, hatta kromozomlarda da kırılma ve kopma gözlenebilir. Mutajenik etki doza bağlı artış gösterebilir. Ayrıca hücrenin bulunduğu siklus evresinin de önemi vardır.

1.2.1.2. Non iyonize (iyonize olmayan) radyasyon

İyonize olmayan radyasyona örnek olarak verilecek UV ışınları potansiyel mutajenik özellikteki fiziksel mutajenlerdir. UV ışınları üreme hücrelerine etki edemez ancak deri hücrelerinde hasara yol açmaktadır [33]. UV ışınları pirimidin dimerlerini etkileyerek çift sarmal yapısını bozarlar.

1.2.2. Kimyasal mutajenler

Kimyasal maddelerin mutajenik etkileriyle ilgili ilk çalışma 1. ve 2. dünya savaşında kullanılan ve hücrelerde mutasyona yol açtığı görülen nitrojen mustard gazıdır [32]. Daha sonra yapılan çalışmalarda gıdalarda katkı maddesi olarak 2500 kimyasal maddenin bulunduğu ve bunların mutajenik etki yapabileceği çeşitli testlerle tespit edilmiştir [23].

Bitki ekstralarında 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 [34]. 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 indüklemektedirler [30]. Yapılan çalışmalarda karsinojenlerin çoğunun mutajen olduğu ama tüm mutajenlerin karsinojenik etki göstermeyebileceği anlaşılmıştır [21].

Günlük yaşamda karşı karşıya kalınan kimyasal içeriğe sahip maddelerin büyük bir çoğunluğunun mutajenik olduğu, bu mutajenlerin de % 90'dan fazlasının karsinojenik olduğu bilinmektedir. Bunları göz önüne aldığımızda, bu maddelerin karsinojenik potansiyelleri açısından test edilmesinin genel sağlık ve sürdürülebilir yüksek yaşam kalitesi açısından önemi ve gereği anlaşılmaktadır [34, 35].

1.2.2.1. Baz analogları

Bu maddeler standart bazlara benzerler ancak baz eşleşmelerini tam olarak yapamazlar. Replikasyon sırasında bazlara uygun substratlar bazların yerine replikasyona katılır. 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 [24, 31, 35].

1.2.2.2. Alkilleyici ajanlar

Bazlara alkil gruplarını eklerler ve böylece baz eşleşmelerinin doğru yapılmasına engel olurlar. Organik makromoleküllerin nükleofilik merkezlerine afinite gösteren elektrofilik bileşikleridir. Fosfodiester bağında oksijenin alkilasyonu ile fosfotriester oluşur. Alkillenen bazda N-glikozidik bağ zayıflar ve depürinasyon ya da depirimidasyon oluşur. Nokta mutasyonların her üç tipini de indükler. Yapısında bir ya da fazla sayıda reaktif grubu taşıyan, bu gruba göre mono, bi veya polifonksiyonel alkilleyici ajan olarak adlandırılan kimyasallardır. Örneğin, epoksid ve etilen amin, monofonksiyonel alkilleyici ajan sınıfına dahilken, sülfat ve sülfonatların çoğu bifonksiyonel alkilleyici ajan sınıfına girmektedir [10, 32].

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 alkilleyici özelliğe sahip olduğu ve karsinojenik etki gösterebildiği bilinmektedir [4, 24, 32]. Etilmetan sülfanat (EMS), hardal gazı, dimetilsülfonat (DMS), nitrozoguanin (NG) alkilleyici ajanlar arasında olup, bu ajanlar çoğunlukla tautomerik kayma sonucu yanlış baz eşleşmesi ile transisyon tipi mutasyona yol açmaktadırlar [30].

1.2.2.3. İnterkalasyon ajanları

Temelde DNA molekülüne eklemeler yaparak onun yapısını bozan acroline boyaları, proflavin, akridin, ethidyum bromid gibi 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 [20, 30, 32]. Birer alkilleyici ajan olan genotoksik aminlerin, amino florinlerin frame-shift mutasyonuna sebep olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. İnterkale edici ajanların insanlar için ciddi bir potansiyel mutajen ve karsinojen olduğu belirtilmiştir [36].

1.2.2.4. Hidroksile edici ajanlar

Nükleotid bazlarına hidroksil grubu eklerler. Yanlış baz eşleşmesine sebep olurlar. En iyi bilinen hidroksile edici ajan hidroksilamin'dir. Aflotoksin B ise, guanin bazına saldıran ve nükleotidden bu bazı çıkaran güçlü bir mutajendir [20].

1.2.2.5. Diğer kimyasal ajanlar

Nitröz asitin (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 demainasyonu ile oluşan urasil de adenin ile eşleşmektedir [10].

Hidrojen peroksit (H_2O_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 [30].

MMC, aflatoksin B, streptomisin gibi ajanlar da kromozom kırıkları oluşturma özelliğinde olup mutajenik etkiye yol açmaktadırlar [10].

1.2.2.6. Klastojenik ajanlar

Kromozomlarda kırıklara sebep olan fiziksel veya kimyasal ajanlardan olan klastojenler, tümör promotörleri olup DNA'da geniş delesyonlar oluştururlar. Bleomisin, kampotesin, m-AMSA, o-AMSA, akridin, aktinomisin D, methotrexate, metil akrilat, fluodeoksiüridin, UV radyasyon, benzen, benzo(a) pren, MMS (metil metano sülfanat)'ın klastojenitesi bilinmektedir. [37, 38].

Pestisitler ve metilleyici ajanlar da mutajenitesi ve klastojenitesi çalışılan maddelerdendir. [4, 26, 39].

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 ifade bulan ürün, 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 sistemince metabolize olmakta, sonuçta oluşan metabolizma ürünü exo epoksit DNA'ya interkale bir ajan olarak bağlanarak aktivasyon göstermektedir [40].

1.3. Genotoksisite Çalışmaları

Genetik toksikoloji çalışmalarıyla belirlenen potansiyel genotoksik etkiler, kanser gibi hastalıkların nedenlerinin belirlenmesinde kullanılabilirler [41]. 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. Toksik olan materyallerin *in vitro* daki genetik etkilerini ölçmek için kullanılan *in vitro* genetik toksikoloji testleri, diğer tüm *in vitro* toksikoloji

testlerinin öncülüdür [42]. Çevresel koruma programı olan EPA mesleki ve çevresel maruziyet risklerini belirleyen pek çok laboratuvar tarafından kabul gören sitotoksosite testlerinden elde edilen verileri toplayarak veri tabanı oluşturmaktadır [4].

In vivo olarak başlayan genotoksosite test çalışmaları daha sonraki S9 aktivasyonunun geliştirilmesiyle *in vitro*ya kaymıştır [42].

Mesleki ve çevresel maruziyetten kanser gelişimine, katkı maddelerinden dental dolgu maddelerine, bitki ekstraktlarından yeni sentezlenen ilaçlara insan ve sağlığı ile karşılaşacak tüm madde ve etkenlerin etkilerinde standart testler haline gelen mutajenite ve genotoksosite çalışmaları; *in vitro* olarak yapılabilmesi, pratik, güvenilir, standartlara uygun, kriterleri belli, sonuca yönelik çalışmalar olması sebebiyle dünya üzerinde etkin bir şekilde çalışılmaktadır. [42-49].

1.3.1. Bakteriyal yöntemler

Besiyerlerinde üretilen bakteriler ile kolay, hızlı ve düşük maliyetle yapılan testler sonuca odaklı ve zaman kazandırıcı nitelikleri sebebiyle tercih edilmektedirler. Kısa zamanlı test sistemleri içinde en yaygın olarak kullanılan testlerden birisi de bakteriyel testlerdir. Mutant bir genin yabani tipe geri dönmesini sağlayan mutasyonlara geri mutasyon, yabani tipte oluşan mutasyonlar sonucu mutant formları tespit etmede kullanılan mutasyonlara da ileri mutasyon adı verilir.

1.3.1.1. Ames (Salmonella/mikrozom) testi

Basit, hızlı, ekonomik, kısa zamanlı bir geri mutasyon testidir. Uygulama kolaylığı, hassalığı sebebiyle tercih edilen, *Salmonella thiphimrium*'u test maddesi olarak kullanan (özellikle TA 98 ve 100 suşlarını) ve bakterinin histidin geninde farklı mutasyonlarla gelişmek için histidine ihtiyaç duyan değişik tipte oksotrofik mutantlara dönüştürülmüştür. Ortamdaki histidin tükendikten sonra geri dönüşen (his-revertant) bakterilerin aynı koloniler şeklinde büyümesi esasına dayanır. 1970' lerin başında Prof. Dr. Ames ve Dr. Maron tarafından geliştirilen

Salmonella/mikrozom testi; detayları en iyi bilinen, geçerliliği, uygulanma kolaylığı ve hassaslığı nedeniyle en fazla kabul gören ve günümüzde de standart olarak sıklıkla kullanılan bir yöntemdir [24]. Mutajenik potansiyeli belirlemede en çok kullanılan testlerden birisi olup, kimyasalların bu testte pozitif sonuç verirken, *in vivo* testlerde negatif sonuç verdikleri de olası sonuçlar olarak bildirilmiştir [26].

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. Umu operonunun ifade edilme düzeyini, β -galaktosidaz enzim aktivitesinin ölçülmesiyle saptanan, kompleks, kimyasal ajanların genotoksik etkilerini saptamada kullanılan, kolonimetrik bakteriyal bir ileri mutasyon yöntemidir. β -galaktosidaz enzim aktivitesi kontrol grubuna göre iki kat fazla ise kimyasal mutajenite açısından pozitifdir. Umu testinde hücrelerin canlı olarak kalması zorunlu değildir ve Ames testinde miktar olarak toksik olabilecek kimyasalları test etmeye olanak sağlar. Ames'e yakın bir duyarlılığa sahiptir.

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

Bakterilerde meydana gelen mutasyonların genetik ve moleküler analizinde kullanılan bir ileri mutasyon testidir. 1983'te Müller ve ark. tarafından *E.coli*'de geliştirilmiştir. Bu sistemde laktaz operonundaki reseptörü kodlayan *lacI* 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 [50].

1.3.2. Sitogenetik yöntemler

Yeni sentezlenen maddelerin genotoksik etki yönünden araştırılmasında mikronükleus testinin sıklıkla kullanılıyor olması çalışmada ilk yöntem olarak MN tekniğinin seçilmesi konusunda destekleyici olmuştur. Bu kapsamda, test maddelerinin olası genotoksik etkilerinin, Fenech ve arkadaşlarının uyguladığı yöntemden modifiye edilen CBMN tekniği ile araştırılması ve elde edilen bulguların türevler arasında karşılaştırılmasıyla, klastojenik etkiye yönelik bir değerlendirme yapılması amaçlanmıştır.

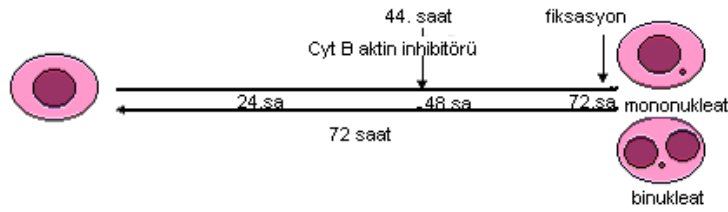
İlk deney seti CBMN tekniği kullanılarak kurulmuştur. CBMN denemesi, kültüre edilen insan hücrelerinde MN sayımı için tercih edilen bir methodur. Çünkü, sayım ilk bölünmesini geçiren hücrelerle sınırlıdır. Kromozom düzeyinde meydana gelen DNA hasarlarının araştırılmasında güvenilir sonuçlar veren CBMN (Sitokinez Bloklama Mikronükleus) tekniği temel prensip olarak sitoplazma bölünmesinin Sitokalsin-B (Cyt-B) ile engellendiği kültür koşullarında çekirdek bölünmesini tamamlamış ve bir test maddesi ile muamele edilmiş hücrelerin içerdiği mikronükleus (MN) miktarının belirlenmesine dayanmaktadır. Sayım için sitoplazmaları korunmuş olan 1000 binükleat hücre/doz kullanılır.

Bu hücreler; bir küf mantarı olan *Helminthosporium dematioideum*'dan izole edilen bir kalıp metabolit olan sitokalsin B (Cyt B)'nin birinci bölünme döngüsünü takiben ilave edilmesiyle sitokinezin inhibe edilmesinden sonra beliren çift çekirdekleriyle ayırt edilir. Cyt-B ile, kültürdeki hücrelerden bölünen hücreler sitoplazma bölünmesi inhibe edilerek ayırt edilir. 1 mitoz geçiren binükleat hücrelerdeki MNler sayılır. Kromozom/kromatid kırığı, kromozom rearanjmanı, apoptotik hücre, nekrotik hücre saptanabilir. BrdU bu teknikte kullanılmaz, çünkü bölünen ve bölünmeyen çekirdeklerin ayrımı için fazla miktarda BrdU kullanımı klastojenik etki yapar. Boyama tekniği olarak Giemsa ile birlikte akridin orange kullanıldığında DNA yeşil-sarı, RNA ise kırmızı renkte gözlenir.

*sitotoksik (hücre üzerine etkili olan) ajanlar NEKROZ'a,

*genotoksik (DNA, kromozom, iplik üzerine etkili olan) ajanlar APOPTOZİS'e yol açar.

Ayrıca radyasyon sebebiyle hücrede H_2O_2 , HO_2 , OH , H gibi kökler oluşması durumunda protoplazma enzimleri tahrip olur ve sonuçta hücre ölürse buna apoptosis, eğer hücre ölmez, bölünmez hale gelir ve beslenemez (dev hücre) ise doku ölümü gerçekleşir ki bu duruma da nekroz adı verilir. Binukleat hücrelerdeki sınırlı MN sayımı; bu denemenin en büyük değişkeni olan suboptimal hücre bölünme kinetiklerinin oluşturduğu şaşırtıcı etkileri önler. CBMN denemesi son yıllarda, kromozom kırılması, kromozom kaybı, non-disjunction, nekroz, apoptozis ve sitostazis ölçümlerinde kullanılan en yaygın metoddur. [51,52]



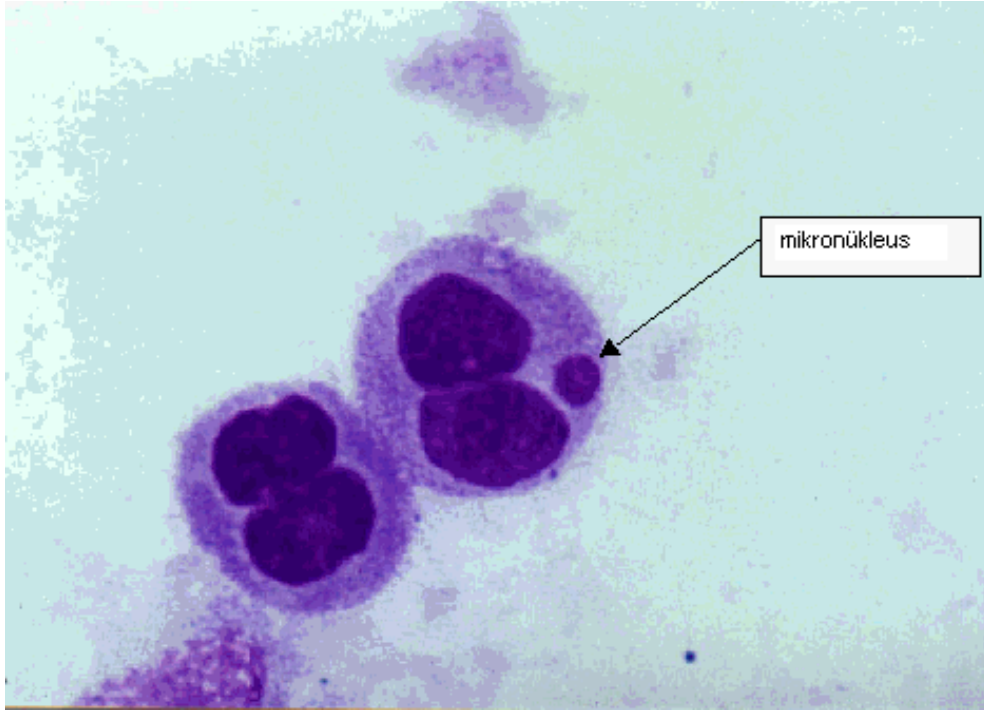
Şekil 1.5. CBMN test prosedürü

Yöntemde test maddesinin 24 ve 48 saatlik muamele süresinin nedeni ise, test maddesinin G_0 da verilmesi durumunda olası PHA'ya direnç veya mitoz gecikmesi ya da test ajanı kısa ömürlü ise hücrelerin sadece G_0 / G_1 fazında gözükmelerine karşı alınan bir önlem olmasındandır. MN, gerçek nükleusun dışında sitoplazmada bulunan nüklear orijinli yuvarlak cisimlerdir. İğ ipliği kinetokor fonksiyon kaybı, kromozom alt birim hasarı, hücresel fizyolojik değişim, mekanik parçalanmayla oluşan kromozom fragmentleri ve anafazda geç kalarak her 2 kardeş nükleusada gidemeyen kromozomlardan oluşur. Şekil, yapı ve boyanma özellikleriyle nükleusa benzerler ve çok çeşitli büyüklüklerde olabilirler. MN, kromozom kırıklarından ya da nüklear bölünme boyunca anafazda geri kalan kromozomlardan orijinlenir. İnsan hücrelerindeki MN indeksi; genetik toksikoloji testleri için standart sitogenetik testlerden birini oluşturmaktadır.

CBMN tekniğinde kullanılan sitokinez inhibitörü, aktin filamentlerinin ucuna bağlanarak aktin polimerizasyonunu önler ve hücreler anafaz evresine

geçemez. Böylece bölünen ve bölünmeyen hücre ayrımı netleşir. Test sonunda MN tanımlanmasında Fenech ve ark. (2003) tarafından Human Micronucleus Project (HUMN) kapsamında belirlenen sayım kriterleri kullanılmaktadır. Bunlardan başlıcaları aşağıda verilmiştir:

- Sadece sitoplazması iyi korunmuş binukleat hücreler sayılmalı
- Hücre grupları arasındaki bireysel hücre sınırları ayrılmalı
- MN gerçek nükleus ile aynı boyanma özellikleri ve yapıya sahip olmalı
- MN gerçek nükleustan görülebilir yuvarlak bir cisim olarak ayrılmış olmalı
- MN çapı gerçek nükleusun yarısından fazla olmamalı



Şekil 1.6. Tek mikronükleuslu binukleat hücre

Kromozom eldesinde kullanılan hücreler arasında kemik iliği, trofoblast, testisteki spontan bölünen hücreler direkt (*in vivo*) kullanılır iken, kan hücresi ve amniyotik sıvı ise *in vitro* olarak kültüre edilerek kullanılmaktadır. Tüm sayılan hücrelerin bölünme döneminde olması gerekmektedir. *In vivo* yöntemlerde ya doğrudan kromozom elde edilir ya da kısa süreli kültürler kullanılır. *In vitro* uygulamalarda ise yapay uyarıcı ile mitozu teşvik edilerek periferik kan kültürü

gibi kısa ya da fibroblast deri kültürü gibi uzun süreli kültürler elde edilir. Kısa dönem periferik lenfosit kültürü ile yapılan sitogenetik testlerin hızlı, ucuz, hassas, insan biyolojisine uygun olması, çalışılan dozların küçük miktarlarda etkili olması, kolay elde edilen çekirdekli hücrelerle çalışmaya olanak vermesi avantajları arasında sayılmaktadır.

Kromozomal aberasyonlar ise, spontan olarak ya da kimyasal/radyasyon gibi mutajenlerin etkisiyle ortaya çıkan, kromozomun yapısı ve sayısında meydana gelen değişimlerdir. Kromozom aberasyon testi, kromozomda meydana gelen bu klastojenezisin belirlenmesini amaçlamaktadır. Bu test, insan periferik lenfositlerinin *in vitro*'da önce fitohemoglütinin (PHA) ile bölünmeye teşvik edilmesi, inkübasyonun 70. saatinde kolşisin veya kolsemid gibi inhibitörlerle hücrelerin metafazda tutulması esasına dayanılmaktadır.

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 [53].

Yapısal Kromozom Bozunma Testi (CA) ile anöploidi/poliploidi gibi sayısal kromozom bozuklukları, kromozom/kromatid tipi kırılmalar, anormal birleşmeler saptanabilir. Klastojenik etkinin araştırılmasında kullanılır. Genelde kısa süreli lenfosit kültürleri tercih edilir. Büyüme için gerekli aminoasit, mineral, kontaminasyon engelleyici antibiyotik, hücreyi çoğalmaya teşvik eden madde olan PHA (normal lenfositler vücutta G₀-G₁ fazında uyur durumdadır, bölünmeye teşvik edilerek blast hücre haline gelirler) bulunan ortama alınan lenfositler 37⁰C de 72 saat inkübe edilir. Bu süreçte farklı zamanlarda kimyasallar eklenir. 70. saatte kolşisin eklenir (anafaz inhibitörü, iğ ipliklerini parçalar, hücreleri metafazda tutar). Süre sonunda santrifüj edilerek izolasyona başlanır, KCL ile hücre şişirilerek sitoplazma tahrip edilir. Fiksasyon yapılır (hücrenin canlılık özelliklerini bozmadan öldürülmesi). Preparasyon yapılır. Fosfat tamponuyla hazırlanan Giemsa ile boyanır. Oda sıcaklığında kurutularak preparat yapılır. Disentrik/asentrik kromozom, kromozom/kromatid kırığı, ring oluşumu, kardeş kromatid birleşmesi bakılır. En az 3 doz kimyasal test maddesi, mutajenitesi kesin

olarak bilinen bir pozitif (+) kontrol, çözücü, spontan mutlaka uygulamada olması gereken elemanlardır. *In vivo* CA tekniğinde hücreler metafaz 1 de iken, *in vitro* da ise metafaz 1 sonrasında sayılır.

Bir kromozomda, kardeş kromatidler arasında parça değişimi olmasına kardeş kromatid değişimi denir. SCE, kardeş kromatidlerin homolog lokuslarındaki resiprokal değişimdir ve replikasyona bağlıdır. 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 edilmesi sağlanır. BrdU bağlanan DNA doğal ve yapay ışıktaki degrade olduğundan ışık maruziyetinden kaçınılır. Kanser gibi hastalıklarda, SCE frekansında artış olduğu bilindiği için, mutajenlere maruziyet sonucu oluşabilecek hasarların belirlenmesinde sıklıkla tercih edilen bir tekniktir. SCE sıklığını etkileyen faktörler ve sebepleri şunlardır.

BrdU: Kendisi de SCE oluşturacağı için minimum konsantrasyonda kullanılır.

Ekim zamanı: Yavaş hücre döngüsü ile SCE sıklığı artar.

Medyum bileşenleri ve sıcaklık: Hücre döngü zamanına etki ederek dolaylı olarak SCE sıklığını etkiler.

Soma hücresi kromozomları genelde birleşmez ve sinapsis oluşturmaz. Ajan etkisiyle; profaz/metafazda oluşmuş olan kardeş kromatid cross-over'a benzer bir resiprokal değiş tokuş geçirir. Bu durum genler değişmediği için yeni allel kombinasyonu oluşturmaz.

Örneğin; BLM genindeki mutasyon replikasyon hatasına yol açar ve Bloom sendromu oluşur. DNA ile kovalent bağlanan ve onarıma engel olan maddeler SCE'yi indükler. Sadece iplik kırılması SCE'ye sebep olmaz. Baz alkilleyici ajanlar ve çapraz bağlayıcı ajanlar (=bifonksiyonel alkilleyici ajan yani DNA'da 2 farklı nükleofilik merkezle reaksiyona giren muhtemel karsinojen bileşikler) iplik ayrımını engelleyerek replikasyonu bloke eder ve SCE'yi artırır. Bir timin bazı analogu olan BrdU'dan faydalanılır (Bu bazı analogu replikasyonun değil, eklenen bazların hatalı olmasına yol açar). BrdU varlığındaki 1. metafazda CA, 2. metafazda SCE gözlenir. Preparasyona kadarki işlemler CA'nın aynıdır.

Sonrasında ışınlatma tamponu içindeki preparatlar UV'ye bırakılır. BrdU'yu alan DNA doğal ve yapay ışıkta degrade olur. 60°C de 1saat inkübasyon yapılır. Amaç BrdU nun yapısını bozmak ve Giemsayı alabilmesini sağlamaktır. Hazırlanan preparatlar boyanır ve kurutulur. Floresans boyama yapıldığında, BrdU + DNA kompleksi boyayla bağlanamaz ve soluk gözlenir.

MI = metafaz hücresi/ total hücre sayısı

RI = $\frac{(1 \times M1) + (2 \times M2) + (3 \times M3)}{100}$

100

Bir anti kanser ilaç olan gemitabinin 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 [54].

Genotoksisite testlerinin kullanım alanları arasında; çevresel ajanlara sürekli maruz kalan bireylerin biyoizleme çalışmaları, çevresel ajanlardan izole edilen yapay ya da kirletici ajanın etki araştırmaları, sentezlenerek gıda, sağlık, temizlik, sanayi gibi alanlarda kullanılan ya da kullanılacak bileşiklerin mutajenik, karsinojenik, anti mutajenik, anti karsinojenik etkilerinin tespiti, hastalıkların genetik hasarla ilişkilendirilmesi, biyoteknoloji ürünlerin risk değerlendirmeleri, biyolojik doz belirleme sayılmaktadır [11, 32, 55, 56].

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 [57-59].

1.3.2.1. Yapısal kromozom bozulma (CA) testi

Anöploidi ve poliploidi gibi sayısal kromozom bozulmaları ile kromozom/kromatid tipi kırılmalar, anormal birleşmeler CA test sistemi ile saptanabilmektedir. Bu test yöntemi klastojenik etkinin araştırılmasında 70'li yıllardan bu yana uygulanmaktadır. Kromozom ve kromatid tipi kırılmalar sınıflandırılmıştır [28, 60].

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 dayanmaktadır. *In vitro* CA testinde genellikle memeli somatik hücreleri, insanda ise lenfositler kullanılmaktadır [25, 59].

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 [53].

Laboratuvarda çalışan kişilerde kimyasallara maruziyete bağlı olarak lenfositlerdeki CA seviyesinde etkili denilebilecek bir artış olmaktadır [61]. 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 [12, 56].

1.3.2.2. Kardeş kromatid değişimi (SCE) testi

SCE testi, kardeş kromatidler arasında 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 [17].

Benzin istasyonunda çalışan ve sigara kullananlarla yapılan bir çalışmada, benzen maruziyeti ve sigara içiminin kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, mitotik indeks ve replikasyon indeksini azaltıcı yönde birlikte etkili oldukları görülürken; sigaranın ve benzenin CA frekansı üzerinde beraber bir etkisinin

olmadığı anlaşılmıştır. Sigara ve benzen maruziyette ise önemli derecede SCE frekansı artışı olduğu kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak anlaşılmıştır [12].

Bir antikanser ilaç olan gemsitabinin lenfositlerde CA ve SCE frekansında artışa yol açtığı, *in vitro*'da doza bağlı olarak hem sitotoksik, hem genotoksik olduğu bir çalışmada belirlenmiştir [54].

Karaciğer kist hidatik tedavisinde kullanılan albendozun genotoksik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, tedavi öncesi ve sonrası bu ilacın kromozomlar üzerindeki etkisi incelenmiştir. Sonuçta, bu ilacın periferik kan kültüründe SCE frekansında önemli derecede bir artışa sebep olduğu ve muhtemel bir mutajen olabileceği sonucuna varılmıştır [62].

1.3.2.3. Mikronükleus (MN) testi

Mikronükleus hücre çekirdeğinin dışında sitoplazmada yer alan çekirdek orijinli küçük küresel bir oluşumdur. Mitotik hücrelerde kromozom fragmentlerinden ya da anafazda geç kalarak her iki kardeş çekirdeğe dahil olmayan kromozomlardan veya tam ya da asentrik kromozom fragmentlerinden köken alır. [62, 63].

Mikronükleusun içerdiği kromozomal fragmentler öncelikle iğ ipliği, kinetokor ya da diğer mitotik aparatların fonksiyon kaybından, kromozom alt birimlerinde oluşan hasarlardan hücresel fizyolojideki değişimlerden ve mekanik parçalanmadan kaynaklanmaktadır. MN içeren hücre sayısındaki artış, maruz kalınan klastojenik ya da anöjenik ajanların genotoksik etkilerini yansıtan bir biyomarkırdır [29, 65].

MN ilk olarak 1891'de Howell ve Jolly tarafından insan eritrositlerinde tanımlanmıştır. Bu yüzden "Howell-Jolly cisimciği" olarak adlandırılmıştır [1].

MN sıklığı çok yaygın olarak phytohemagglutinin ile stimüle edilmiş periferik kan lenfositlerinde belirlenmektedir. En sık kullanılan metod mitojenle stimüle edildikten sonra hücrelerin bölünmesini engelleyen bir uygulamanın yapıldığı "Sitokinez Bloklama Mikronükleus" (CBMN) tekniğidir. [24, 25, 51, 64, 66-68]. Cyt-B, aktin polimerizasyonunu inhibe eden, *Helminthosporium dematiadeum*'dan elde edilen bir ekstredir. 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 [64].

MN oluşumu, klastojenik ve anöjenik mekanizmaların her ikisiyle de uyarılmakta olup, ağız ve burun mukozası, idrardaki dökülen epitel hücrelerinde ya da periferel kandaki tek çekirdekli lenfositlerde tespit edilebilmektedir.

Karsinojenlere maruz kalmış bireylerde, artan kanser riskini göstermek amacıyla bu dokulardaki morfoloji bozukluğunu, kromozom kırıklarını, premalign değişikliklerini belirlemek için MN testi yapılabilmektedir [69]. Fakat çoğunlukla, farklı genetik hasar tiplerini belirlemek amacıyla kısa zamanlı lenfosit kültürü tercih edilmektedir [1, 11, 66, 68, 70-72].

CBMN testi mikronükleusların belirlenmesi yanında;

- Nükleoplazmik köprülerin (NPB)
- Gen amplifikasyon belirteçlerinin (NBUD)
- Hücre bölünmesi inhibisyonunun
- Nükleer bölünme indeksinin (NPI)
- Nekrozis ve apoptozisin de belirlenmesini sağlamaktadır [25]

CBMN tekniği, ilk olarak insan lenfosit hücrelerinde MN'nin tespiti için geliştirilmesine rağmen, günümüzde tümör, kemik iliği hücresi gibi birçok hücrede de uygulanmaktadır [67].

İnsan Mikronükleus Projesi (HUMN) adıyla bilinen, insan lenfositlerinde CBMN sonuçlarının toplandığı ve karşılaştırıldığı uluslararası bir veri bankası vardır. [70, 71, 73, 74].

MN (mikronükleus) sayım kriterleri:

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

- MN çapı gerçek nükleusun yarısından fazla olmamalı, lenfositlerdeki MN çapı ana çekirdek çapının 1/16' sı ile 1/3' ü arasında olmalı
- MN'ler ana nükleusa bağlı olmamalı, belirgin olarak ayırdelebilmeli
- Sadece sitoplazması iyi korunmuş binukleat hücreler sayılmalı
- Hücre grupları arasındaki bireysel hücre sınırları ayrılmalı
- MN gerçek nükleus ile aynı boyanma özellikleri ve yapıya sahip olmalı

- MN gerçek nükleustan görülebilir yuvarlak bir cisim olarak ayrılmış olmalı
- Binükleat (iki çekirdekli) hücre sayım kriterleri:

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

- Hücrelerde iki ana çekirdekli olmalı
- Çekirdek sınırları bozulmamış olmalı
- Ana çekirdekler aynı boyutlarda olmalı
- Ana çekirdeklerin boyanma düzeyleri eşit olmalı
- İki çekirdekli hücredeki çekirdekler nükleoplazmik köprü ile bağlanmış olabilir. Bu köprü çekirdek çapının $\frac{1}{4}$ 'ünden daha büyük olmamalı
- Komşu hücrenin sitoplazmik sınırından açıkça ayrılabilmelidir [51, 70, 71, 74].

1.3.3. DNA' daki hasarı saptayan diğer yöntemler

1.3.3.1. Comet (single cell gel electrophoresis - SCGE) testi

The Comet test veya tek hücre jel elektroforez (SCGE) testi olarak bilinen test hücre seviyesinde DNA hasar tespiti için kullanılır. Comet testinin alkali versiyonu ilk defa 1988'de Singh tarafından bulunmuştur. Bu yöntem yüksek hassasiyetli ölçüm yapmak amacıyla geliştirilmiştir. DNA'daki tek iplik kırılmalarının, kararsız alkali bölgelerin, DNA-DNA/DNA-protein çapraz bağlanmalarının ve onarım bölgelerindeki hataların belirlenmesini sağlayan sitogenetik bir testtir [38, 75-78]. Uygun laboratuvar koşullarında bitki hücrelerinde de uygulanmıştır. Diğer test sistemlerinde bölünen hücreye ihtiyaç duyulurken bu testte bu durum bir önkoşul değildir. Hızlı, gözlenebilir, duyarlı, ucuz olan ve karsinogeniteyi modifiye eden faktörlerin çalışılmasında güçlü bir araç olarak karşımıza çıkan test sistemi için küçük miktarlarda örnek yeterli olmaktadır. Testin en önemli avantajları; tek hücre düzeyinde veri toplanmasına olanak sağlaması, her örnek için az sayıda hücreye ihtiyaç duyması, DNA hasarının tespitindeki hassasiyeti, ökaryot tek hücre populasyonlarında *in vivo* ve *in vitro* çalışmalara olanak sağlaması, maruziyet durumundaki insan populasyonlarında ve

çevresel monitoring çalışmalarında kullanılması, ekogenotoksisite çalışmalarında yarar sağlamasıdır. Oksidatif DNA hasarı, farklı beslenme faktörlerinin koruyucu etkisi bu yöntem ile çalışılmıştır [9, 15, 75-77, 79-82].

Tümör radyoduyarlılık ve kimyasal duyarlılık değerlendirmede, kanser terapilerinde hasta yönetimini bireyselleştirmek için bu testten yararlanılmaktadır.

Hücrelerin bir lam üzerine agaroz ile karıştırılarak tutunması sağlanan yöntemde, deterjan ve yüksek konsantrasyonlu tuz çözeltisi ile hücreler lizis edilir. Elde edilen DNA'ya alkali ortamda ve yüksek pH'da elektroforez uygulanır. DNA bu ortamda katottan anoda doğru taşınır [77]. DNA'daki hasara göre jel üzerinde yayılmış DNA parçacıkları kuyruk şeklinde floresans ya da nonfloresans mikroskopta uygun bir boyama yapılarak gözlenebilir. Bu kuyruğun ölçülmesiyle incelenen kimyasal maddenin DNA'da meydana getirdiği hasarın boyutuyla ilgili tahmin yapılabilmektedir [83]. Comet testinde elektroforez ortamının pH değeri değiştirilerek farklı hasarlar saptanabilir. Nötral pH'da DNA göçünde çift iplik kırılmaları, alkali pH'da (12-13) hem tek hem çift iplik kırılmaları, 13'den daha yüksek pH'da ise tek iplik kırılmaları gözlenebilmektedir.

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 [6]. Comet testinin çapraz bağlayıcı ajanların oluşturduğu hasarı belirlemede negatif sonuç verdiği bir çalışmayla tespit edilmiştir [82, 84].

1.3.3.2. Mouse lymphoma (fare lenfoma) testi

Timidinkinaz (tk) lokusunda baz çifti değişimleri, çerçeve kayması ve küçük delesyonların sebep olduğu mutasyonları saptayan testtir.

Timidin kinaz geninin kullanıldığı fare lymphoma testi, çok geniş oranda kullanılan, tk lokusundaki gen ve kromozomal mutasyonları belirleyen *in vitro* memeli gen mutasyon testidir. Deoksiribonukleotidmonofosfatların (dNMP) kaynaklarından olan timidinmonofosfat (TMP) büyük ölçüde diğer nukleotidlere dönüşmez. Eğer diğer letal TMP analogları ile değişirse hücre ölümü gerçekleşir. Bu analogların fosforilasyonu, memeli hücresinde timidini TMP'ye fosforile eden

tk tarafından sağlanır. Tk enzimi olmayan hücreler ise letal analogların sitotoksik etkisine dirençlidir [99]. Kimyasallarca indüklenen gen mutasyonu, kromozomal hasarı belirlemede faydalı ama pahalı bir testtir. Bu testte kullanılan hücreler timidin kinaz lokusu heterozigot olan hücrelerdir [86, 87].

1.3.3.3. HPRT gen mutasyon testi

Test *in vitro* ortamda uygulanan bir memeli geri mutasyon testidir. Hprt geni, büyük ya da küçük orandaki delesyonlar, DNA baz çifti değişimleri, heterolog kromozom rekombinasyonları gibi genetik değişimleri belirtme özelliğine sahiptir. Şöyleki; HPRT geni 6TG gibi pürin analoglarının dönüşümünü katalizler. Normal hücrelerde 6TG baz analogları bulunursa hücrede sitotoksik etki yapar. Ama mutant hücrelerde pürin sentezinden sorumlu enzim inaktif olduğu için 6TG rekabeti kazanır ve pürinlerin yerine geçerek hücrelerin hayatta kalmasını sağlar.

Sonuç olarak eğer 6TGli ortamda hücreler yaşıyorlarsa mutasyona uğradıklarının kanıtıdır ve test maddesi mutajeniktir sonucuna varılır. 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. [83].

1.3.3.4. Muta mouse / Big blue yöntemi

Temelde transgenik (TG) mouse sistemleri big blue, mutamouse ve gpt deltadır. λ fajına dayanan sistemler mutamouse testinde lac Z, big blue testinde lac I sistemidir. Bakteriyal lac I ya da lac Z genleri reporter genlerdir. Bu genler vektörün parçası olarak fare kromozomuna entegre edilir ve *in vitro* paketleme reaksiyonlarıyla fare genomik DNA'sından faj partikülü olarak kolayca geri alınabilir. Bu sistemler ileri mutasyon sistemleridir. TG denemelerinde rodent dokularından transgenler elde edilir ve mutasyon taşıyan genler petri içerisinde koloni rengine göre seçilir. Transgenler memeli hücrelerinde ifade edilemez

çünkü genetik olarak nötraldirler, *in vivo* selektif baskının etkisinden kaçınırlar [88].

1.3.3.5. TCR gen mutasyon test sistemi

TCR gen mutasyon metodu, Ishioka ve Deng tarafından yapılan metoddan modifiye edilmiştir. Ficoll/ Hypaque kullanılarak tüm kandan lenfositler izole edilir ve rekombinant interlökin 2 ve %10 FCS içeren RPMI 1640 medyumunu ile süspande edildikten sonra, test maddesiyle 24 saat muamele edilir. Mitojenik sitümilasyon için, her mlde 2×10^5 hücre içeren PHA-M eklenir ve %5 lik karbondioksit ortamında inkübe edilir. Hücreler 24 kuyucuklu plastik petrilere 7 gün kültüre edilir ve medyum gün aşırı değiştirilir. Becton Dickinson immunositometri sistemi ile 30 dakika buz üzerinde muamele edilen 1×10^6 hücre Anti CD-3 MoAb ile işaretlenen fitoeritrin ve Anti CD-4 MoAb ile işaretlenen floresans isotiyosiyonat ile boyanır. Hücreler yıkandıktan sonra, ölü hücreleri ortamdaki uzaklaştırmak için son konsantrasyon $10 \mu\text{g/ml}$ olacak şekilde hücre süspansiyonuna propidyum iyodid eklenir. Hücre süspansiyonları, FACScan flow sitometri ile analiz edilir. Lenfosit parçaları ileri ve sağ açılı ışıkla uzaklaştırılır ve 2×10^5 hücreden fazla olan sonuçlar çift parametre ile elde edilir. Normal CD4+ hücrelerinin 1/25 lik dilimine ulaşan CD3 seviyesine mutant pencere yerleştirilir. Mutant pencere için CD4 sol ve sağ floresans limitleri, normal CD3+ 4+ hücrelerinin FITC floresans şiddetinin 0.5 ve 2 katı olacak şekilde kurulur. Flow sitogramdaki CD4+ T hücrelerinin toplam sayısının mutant hücre penceresine bölünmesiyle elde edilen sonuçlar TCR gen mutasyon frekansı değeri olarak ölçülür [89].

1.4. Sitogenetik Yöntemler ile İlgili Çalışmalar

CBMN tekniği standart bir genotoksisite testi olup dünya üzerindeki pek çok laboratuvar tarafından kabul edilen bir metoddur. Yapılan bazı çalışmalara göre kanser gelişimi ile östrojenler arasında bir ilişki varlığı ortaya konulmuştur.

Medroksiprogesteron asetatın genotoksik potansiyeli 1, 5 ve 10 μ M lik dozlarla insan lenfositlerinde uygulanmış, CA ve SCE testleri yapılmış ve S9 metabolik aktivasyonu varlığında toksik etki gösterdiği saptanmıştır [90].

Akciğer kanserli hastalar ve sağlıklı kişilerle yapılan çalışmada DNA hasarı ile oksidatif stres parametrelerinde lenfositlerde comet testi ile herhangi bir ilişki bulunamamıştır [85].

Göğüs kanserli hastalar ve kontrollerle yapılan çalışmada MN testi kullanılmış ancak Metasystems Metafer 4 version 2.12 görüntü analizi kullanılmıştır ve diagnostik test olarak kullanımı uygun görülmüştür [91]. Göğüs kanserinde kullanılan östrojenin genotoksitesinin araştırıldığı çalışmada MN sayısının arttığı, SCE de ise zayıf genotoksik etki gözlemlendiği belirtilmiştir [92].

Ayrıca iyonize α partikül ile uyarılan CA ların bölgesel yeniden düzenlenmelerin kümülatif (birikimli) ürünleri olduğu M-FISH analizleri ile gösterilmiştir [93].

Piyasada satılan antibiyotik, antifungal ve antihistamin içeren ilaçların genotoksitesisi ile ilgili 467 ilacın incelendiği çalışmada bakteriyal, *in vitro* sitogenetik ve fare lenfoma testleri yapılmış ve büyük bir kısmı toksik bulunmuştur [6]. Artan MN miktarı ile insanlardaki kanser riskinin tahmin edilebilir kılındığı belirtilmektedir [94].

Başka bir çalışma da CBMN nin akciğer kanser riski belirlemede çok güçlü bir biyomarkır olacağını, MN, nükleoplazmik köprüler ve nüklear budlardaki artışa bağlı olarak açıklar [7].

Apitol isimli madde ile yapılan çalışmada, bu maddenin mitotik indeksi ve SCE miktarını artırmış ve genotoksik potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir [95]. Antimikrobiyal bir ilaç olan sulfamethoxazole çalışmasında 10 – 500 μ g/ml lik dozlar kullanılmış ve zayıf bir genotoksik etkiye sahip olduğu görülmüştür [96]. Apigeninle yapılan çalışmada CBMN testi uygulanmış ve MN artışı olduğu belirtilmiştir [97].

Antimikrobiyal bir ilaç olan trimetoprim ile yapılan çalışmada comet ve MN sayılarında artış görüldüğü belirtilmiştir [98]. Sigara içen radyoloji teknisyenlerinde trimetoprimin kromozom üzerine etkisi her doz süre kombinasyonu için her bireyden 50 metafaz sayılarak doza bağlı kromozomal

düzensizliğin arttığı, uygulama süresi artışından etkilenmediği belirtilmiştir [99]. 1-100 µg/ml lik trimetoprim konsantrasyonlarında SCE, MN frekanslarının arttığı ve ilacın sitotoksik ve ılımlı genotoksik etkisinin olduğu bildirilmiştir [100].

Nitroimidazol türevi olan tiridozole (TNZ) mitotik indeksi düşürürken, SCE sayısını artırmış ancak replikasyon indeksine etki etmemiştir. *In vitro* insan lenfositlerinde potansiyel genotoksik ve sitotoksik etkisi vardır [101].

Karaciğer kist hidatiği hastalarında kullanılan albendazolun muhtemel genotoksik etkisi SCE ile araştırılmış ve kontrol grubuna oranla SCE frekansının arttığı saptanmıştır [102]. 45 sağlıklı donör ile yapılan bleomysin etki araştırmasında CBMN testi ile MN sayısında artış tespit edilmiştir [103]. Antikanser ilaç olarak kullanılan doksorubisinin doza bağlı olarak MN frekansını artırdığı gözlenmiştir. Ayrıca nekrotik hücre sayısının da arttığı ancak apoptotik hücre sayısının aynı kaldığı saptanmış, böylece, doksorubisinin hem klastojenik hem de anöjenik olduğu belirlenmiştir [104].

Antimikrobiyal ilaç olan fansidar, kültüre edilen insan lenfosit hücrelerinde araştırılmış ve SCE ve MN frekanslarını artırdığı gözlenmiştir. Ayrıca hamilelerde kullanılmaması gerektiği de belirtilmiştir [105].

Çevresel etki belirlemede, İzmir körfezi iç, dış ve orta sedimentlerindeki örnekler AMES testi ile incelenmiş ve iç kısımdaki mutajenik aktivitenin fazla olduğu saptanmıştır [106].

Çevresel biyoizleme çalışmalarına bir başka örnek ise Bosna Hersek'te uranyuma maruz kalan kişilerle yapılan CBMN denemeleridir. Bu çalışmada kontrol gruba oranla MN sayısında belirgin bir artış gözlenmiştir [107].

Porsuk çayı suyunun tarım bitkileri üzerine ekotoksikolojik etkileri, ağır metal birikimi ile araştırılmış ve Porsuk çayı suyu ile sulanan bazı örneklerde MN oluşumunun uyarıldığı tespit edilmiştir [108].

Bir çalışmada ise mononukleat (tek çekirdekli) hücrelerin hücre kültürü başlamadan önceki *in vivo* hasarı gösterdikleri için CBMN testinde ele alınması gerektiği önerilmektedir [109].

MN sayımlarının sadece binukleat hücrelerde yani bir nükleer bölünme geçiren hücrelerde yapılması tavsiye edilmektedir. Bazı anöjenlerin MN frekansını hem mononukleat hem de binukleat hücrelerde artırdığı, ancak

klastrojenlerin (mitomisin C gibi) sadece binukleat hücrelerde artırdığı bilgisi verilmektedir [110]. Ayrıca binukleat insan lenfositlerindeki MN sayımı bir kontrol çalışması ile değişkenlik katsayısı % 5,5 – 9,5 olarak bulunduğu belirtilmiştir [111].

Kimyasal karsinogenlerin DNA bağlanma kapasitesini ölçmek için insan periferik kan lenfositlerinin kullanımı adlı çalışmada ³²P yaklaşımı ile daha hassas sonuçlar elde edileceği belirtilmiştir [112]. Aynı zamanda insan lenfositleri genetik polimorfizmler ile genotoksosite arasındaki ilişkinin de açıklanmasında kullanılmaktadır [113].

Ayrıca sitogenetik biyomarkırlar ve genetik polimorfizm ilişkisinde CA testinin kanser riski ile ilişkisinin SCE ve MN den daha iyi olduğu belirtilmektedir [114]. N-Nitrosoprolidinin genotoksik etkisi *in vivo* fare kromozomları ve MN indüksiyonu açısından değerlendirilmiş ve kromozom kırığı ve gap sayısında artış, mikronükleuslu polikromatik eritrositlerde (MPCE) ise doza bağlı artış bulunmuştur. Kromozom kırığı ve MPCE sayısındaki artışın paralelliği iki yöntem arasındaki ilişkinin de varlığını göstermiştir [115]. *In vivo* olarak Big blue transgenik fare karaciğerinde MeIOx mutajenitesi araştırılmış ve mutasyon frekansını artırdığı belirlenmiştir [116].

2. MATERYAL VE METOD

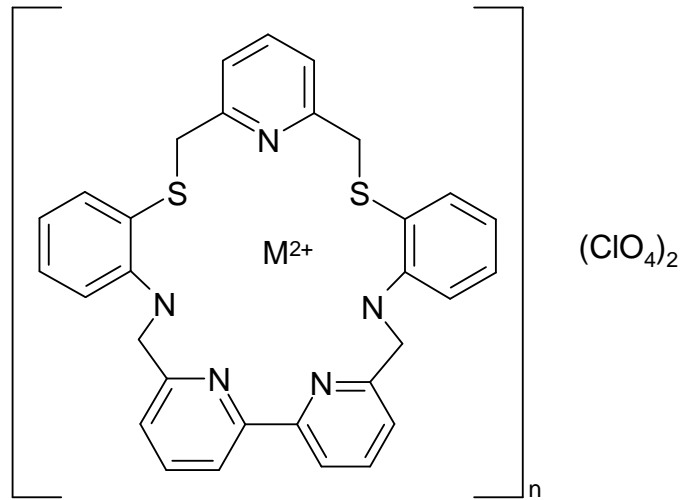
2.1. Materyal

2.1.1. Test maddeleri

Bu çalışmada genotoksik aktivitesi sınanmak üzere, Yrd. Doç. Dr. Gühergül Uluçam'ın doktora tezi kapsamında sentezlenen ve Prof. Dr. Kadriye Benkli tarafından kimyasal analizleri yapılan metal kompleksi tuzlarından ligantları aynı olan, 5 tanesi test maddesi olarak seçilmiştir.

2.1.2. Test maddelerinin genel kimyasal formülleri

Deneyde kullandığımız test maddelerinin adları ve açık formülleri aşağıda verilmiştir.



Şekil 2.1. $[ML] (ClO_4)_2$

2.1.3. Test maddelerinin dozları ve hazırlanışı

Tez çalışması için kullanılacak olan $[ZnL](ClO_4)_2$, $[NiL](ClO_4)_2$, $[CuL](ClO_4)_2$, $[CdL](ClO_4)_2$, $[FeL](NO_3)_2$, $[CuL](NO_3)_2$, $[CoL](ClO_4)_2$, $[CdL]Cl_2$

kodlu metal kompleksi tuzlarından deney kriterlerini karşılayacak olan aynı liganda sahip 5 tanesi seçilerek çalışmalara başlanmıştır. Bunlar; $[ZnL](ClO_4)_2$, $[NiL](ClO_4)_2$, $[CuL](ClO_4)_2$, $[CdL](ClO_4)_2$, $[CoL](ClO_4)_2$ dir.

Test maddelerinin sitotoksik dozlarını ve LD_{50} değerlerini belirlemek amacı ile literatür çalışmaları baz alınarak 20 $\mu g/ml$ ve 10 $\mu g/ml$ konsantrasyonlar denenmiştir. Ancak elde edilen sonuçlarda hücre sağkalımı elde edilememiş ve maddeler lenfositler için oldukça toksik bulunmuştur. Kullanılan maddelerin yeni sentez olması ve literatürdeki dozların kullanılamaması metal, metal tozu ve metal kompleksi toksisitelerinin lenfositler üzerindeki etkilerinin birbirlerinden bağımsız olduğu sonucunu düşündürmektedir.

Tüm test maddelerinin 20 $\mu g/ml$, 10 $\mu g/ml$, 5 $\mu g/ml$ lik dozları iki donörde de denenmiş ve oldukça toksik bulunmuştur. Elde edilen sayım sonuçlarına göre 2.5 $\mu g/ml$ LD_{50} değeri olarak saptanmıştır. İki ayrı donör kullanımını gerektiren çalışmada elde edilen sonuçlar tablolarda belirtilmiştir.

Daha sonraki aşamada, sağlıklı, sigara ve ilaç kullanımı olmayan birinci donörden alınan periferik kan 2,5 $\mu g/ml$ – 1 $\mu g/ml$ lik dozlar ile muamele edilmiştir. $Cd(ClO_4)_2$, $Co(ClO_4)_2$ maddelerinin 2,5 $\mu g/ml$ lik dozları ve $Ni(ClO_4)_2$, $Cu(ClO_4)_2$, $Cd(ClO_4)_2$ maddelerinin 1 $\mu g/ml$ lik dozlarının 48 saatlik uygulamalarında ilk denemelerde sonuç alınmıştır. Ancak ikinci tekrar deneylerinde tüm maddeler için her iki donörde de LD_{50} değerinin 2.5 $\mu g/ml$ olduğu saptanmış ve tablolara işlenmiştir. Ayrıca spontan mikronükleus, pozitif kontrol ve negatif kontrol değerleri saptanmıştır.

Deney sırasında içinde besiyeri ve kan bulunan tüplere her bir dozdan 50 μl ilave edilmiştir.

2.2. Metod

2.2.1. Kullanılan deney ekipmanları ve kimyasallar

Santrifüj, mikroskop, inkübatör, pHmetre, flowkabin, buzdolabı, hassas terazi, falcon tüp, mikropipet, enjektör, lam, lamel, erlen, beher, şale.

Kromozom medyumu, Sitokalsin B, Sorensen tamponu, fiksatif, Giemsa, hipotonik solüsyon, nitrik asit, entellan, BrdU.

2.2.2. 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 CO₂ 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.

2.2.3. CBMN Metodu

Periferik lenfosit vericisi olarak sigara ve ilaç kullanmayan, bilinen mutajenlere maruz kalmamış iki donör seçilerek, steril enjektörle damar yolu ile alınan kan beklemeden 2.5 ml'lik kromozom medyum B (Biochrom) içeren besiyerine ekilmiş ve 37°C'de 72 saatlik inkübasyona alınmıştır. 44. saatte sitokinez durdurucu (anafaz bloke edici) olarak Cyt-B eklenmiştir.

Lenfositler test maddeleriyle 24 ve 48 saatlik iki ayrı muameleye maruz bırakılmış ve 72. saatin sonunda tüpler hafifçe çalkalanarak 1200 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Dipte kalan 1ml'lik sıvı homojenize edilmiş ve önceden hazırlanarak 37°C'lik etüvde bekletilen hipotonik solüsyon (KCL %0,4'lük) damla damla 7 ml ilave edilmiştir. Damlatarak uygulama yapılmasının nedeni hücrelerde kümeleşme olmamasını sağlamaktır.

Süre sonunda tüpler 1200 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Fiksatif ile 3 kez muamele gören tüplerde son santrifüjden sonra kalan 0.7 ml'lik sıvının bir kısmı pasteur pipetiyle hassas bir şekilde çekilerek her lamın farklı alanlarına 6 damla gelecek şekilde 20 cm uzaklıktan damlatılarak preparasyon tamamlanmıştır. Preparasyonda kullanılan lamlar 2 gün önce 1N

HNO₃ ile 24 saat muamele edilmiş, ardından 30 dk musluk suyu altında yıkanarak 3 kez distile sudan geçirilerek +4 °C de kapalı bir şekilde muhafaza edilmiştir.

Her doz için 3 etiketli lam hazırlanmış ve 24 saat oda sıcaklığında üzeri kapalı olarak kurumaya bırakılmıştır. Boyama işlemi 12 dk %5 lik Giemsa ile önceden nitrik asitle temizlenmiş olan şaleler içinde yapılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lamlar entellan ile daimi hale getirilerek mikroskopik incelemeye hazır hale getirilerek sayımlara başlanmıştır.

2.2.4. SCE ve CA Metodu

Sağlıklı donörlerden temin edilen kan hücrelerinin kültür ortamına aktarılmasında ve tüm işlem basamaklarında toksik ve enfekte edici ajanlara maruziyetini engellemek amacı ile deneyler hijyenik şartlarda gerçekleştirilmiştir.

Kan hücrelerinin vericilerden alınmasının hemen ardından karanlık ortamda saklanan BrdU solüsyonu her tüpe 10 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Hazırlanan hücre kültürü CO₂ inkübatöründe 37 °C de 72 saatlik inkübasyona başlanmıştır. BrdU içeren DNA doğal ve yapay ışıktaki bozulduğu için test sonuçlarını etkilememesi açısından hücre kültürleri deney süresince ışıktan korunmuştur.

Periferik lenfositler test maddelerinin tüm tablolarda belirtilen 1 µg/ml, 0,5 µg/ml ve 0,25 µg/ml konsantrasyonlarına 24 ve 48 saat maruz bırakılmışlardır. Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (70. saatte) her tüpe steril şartlarda kolşisin ilave edilmiş ve homojenize edilmiştir. Ön muamelenin ardından 72. saatte tüpler 1750 rpm'de 5dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Dipte kalan 1ml'lik sıvı homojenize edilmiş ve önceden hazırlanarak 37 °C'lik etüvde bekletilen hipotonik solüsyon (KCL %0,4'lük) damla damla 7 ml ilave edilmiştir.

Damlatarak uygulama yapılmasının nedeni hücrelerde kümeleşme olmamasını sağlamaktır. Süre sonunda tüpler 1200 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Fiksatif ile 3 kez muamele gören tüplerde son santrifüjden sonra kalan 0.7 ml'lik sıvının bir kısmı pasteur pipetiyle hassas bir şekilde çekilerek her lamın farklı alanlarına 6 damla gelecek şekilde 60 cm uzaklıktan damlatılarak preparasyon tamamlanmıştır. Preparasyonda kullanılan

lamalar 2 gün önce 1N HNO₃ ile 24 saat muamele edilmiş, ardından 30 dk musluk suyu altında yıkanarak 3 kez distile sudan geçirilerek +4 °C de kapalı bir şekilde muhafaza edilmiştir.

Her doz için 3 etiketli lam hazırlanmış ve 24 saat oda sıcaklığında üzeri kapalı olarak kurumaya bırakılmıştır. CA denemesi için boyama işlemi 26 dk %5 lik Giemsa ile önceden nitrik asitle temizlenmiş olan şaleler içinde yapılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lamalar entellan ile daimi hale getirilmiş ve mikroskopik incelemeye hazır hale getirilerek sayımlara başlanmıştır.

SCE denemesinde ise önce preparatlar ışınlanmış ardından boyanmıştır. Bir günlük kurumaya alınan preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri film tabakası şeklinde Sorensen tamponu ile kaplanmış ve 30 dk UV lambası içeren özel düzenek altında ışınlanmıştır. Işınlamanın ardından lamalar 60 °Cde 1XSSC solüsyonu ile 1 saat muamele edilmiştir. Önceden hazırlanan ve süzölmüş olan Giemsa boyası ile 26 dk boyunca boyanan preparatlar, lam kurutma aparatına alınarak 1 gün kuruması beklenmiş ve entellan ile kaplanarak daimi hale getirilmiştir.

Hazırlanan preparatlardan her doz için ikinci mitoz bölünmeyi geçiren 50 hücre SCE için, birinci ve ikinci bölünme geçiren 50 hücre CA için 100X büyütmede SCE, CA, MI, RI sayımları yapmak üzere Olympus CH40 marka ışık mikroskopunda incelenmiştir. 1000 hücre içindeki metafaz evresinde olan hücrelerin oranı hesaplanarak mitotik indeks bulunmuştur.

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 literatürde mevcut olan Dunnett-t ve Student-t testi kullanılarak analiz edilmiştir [14, 40, 95]. Analiz sonuçlarına göre pozitif kontrol, çözücü kontrol ve kullanılan tüm dozların anlamlılık derecesi “*” işareti ile ifade edilmiştir [45, 90, 96, 98, 110].

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 tercih edilen donörlerin ilaç ve sigara kullanımı olmamasına dikkat edilmiştir. İlaç ve sigara kullanmayan sağlıklı iki kişiden alınan kan örnekleri üzerinde test maddelerinin genotoksik etkisini incelemek için CBMN, SCE ve CA 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 1 µg/ml birinci doz, 0,5 µg/ml ikinci doz ve 0,25 µg/ml üçüncü doz olmak üzere 24. ve 48. saatlerde uygulanmış, pozitif mutajen olarak MMC (Mitomisin-c), negatif kontrol olarak DMSO kullanılmıştır. Deney sonucu elde edilen preparatlardaki 1000 binüklead (iki çekirdekli) hücre içindeki MN sayısı hesaplanmıştır.

Standart istatistiksel veriler Dunnet 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 anlamlı sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Bu sonuçlara bağlı olarak test maddelerinin hücre proliferasyonu üzerinde [CoL](ClO₄)₂ maddesi hariç olmak üzere sitotoksik etkili olduğu görülmüştür.

Tüm doz ve maddelerde SCE ve CA oranları saptanmış ve elde edilen veriler tablolara yerleştirilmiştir. SCE ve CA oranları tüm maddelerde spontan ve negatif kontrole göre artış göstermektedir.

Çizelge 3. 1. [ZnL](ClO₄)₂ CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN değerleri

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	MN sayısı ±SS	CPI
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	1000	8.0± 0.00	0.06
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	16.5± 6.36	0.05
	[ZnL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	1000	13.0± 1.41	0.14
		0,5 µg/ml	1000	17.0± 7.07	0.12
		0,25 µg/ml	1000	12.0± 0.00	0.08
48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	1000	6.0± 0.00	0.08
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	25.5± 6.36*	0.04
	[ZnL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	1000	8.0± 1.41	0.03
		0,5 µg/ml	1000	8.5± 4.94	0.05
		0,25 µg/ml	1000	9.5± 2.12	0.08
	Spontan	-	1000	6.5± 0.70	0.55

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

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

[ZnL](ClO₄)₂ ile yapılan çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan MMC ile 48 saatlik muamele sonucunda elde edilen veriler negatif kontrol verilerine göre anlamlı bulunmuştur (p≤0,05). 24 saatlik muamelede doz azalırken CPI değerleri düşmüş, 48 saatte ise doz artışı hücre çoğalması üzerinde belirgin bir etki yapmıştır. 24 saatlik uygulamada negatif kontrole göre MN frekansında artış vardır ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Çizelge 3. 2. [NiL](ClO₄)₂ CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN değerleri

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	MN sayısı ±SS	CPI
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	1000	8.0± 0.00	0.06
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	16.5± 6.36	0.05
	[NiL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	1000	7.5± 0.70	0.03
		0,5 µg/ml	1000	17.5±0.70	0.24
		0,25 µg/ml	1000	27.0± 2.82**	0.07
48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	1000	6.0± 0.00	0.07
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	25.5±6.36*	0.04
	[NiL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	1000	20.0± 5.65*	0.09
		0,5 µg/ml	1000	15.0± 1.41	0.06
		0,25 µg/ml	1000	8.0± 0.00	0.05
	Spontan	-	1000	6.5± 0.70	0.55

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

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

[NiL](ClO₄)₂'in 24 saatlik 0,25 µg/ml'lik dozundaki anlamlılık (p≤0,01), 48 saatlik pozitif kontrol ve 48 saatlik 1 µg/ml'lik dozundaki anlamlılıktan (p≤0,05) daha yüksektir. 48 saatlik madde uygulamasında doz azalmasına paralel olarak CPI değerlerinde azalma olmuştur.

Çizelge 3. 3. [CuL](ClO₄)₂ CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN değerleri

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	MN sayısı ±SS	CPI
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	1000	8.0 ± 0.00	0.06
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	16.5 ± 6.36	0.05
	[CuL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	1000	16.5 ± 4.94	0.06
		0,5 µg/ml	1000	16 ± 2.82	0.07
		0,25 µg/ml	1000	12.0 ± 0.00	0.10
48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	1000	6.0 ± 0.00	0.08
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	25.5 ± 6.36*	0.04
	[CuL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	1000	12.0 ± 0.00	0.11
		0,5 µg/ml	1000	13.5 ± 4.94	0.16
		0,25 µg/ml	1000	11.0 ± 2.82	0.16
	Spontan	-	1000	6.5± 0.70	0.55

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

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

[CuL](ClO₄)₂ ile yapılan çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan MMC ile 48 saatlik muamele sonucunda elde edilen veriler Dunnet t testine göre anlamlı bulunmuştur (p ≤ 0,05).

24 saatlik uygulamada doz artışı ile CPI değerlerinde azalma, 48 saatlik uygulamada ise doz azalışına bağlı bir artma saptanmıştır.

Çizelge 3. 4. [CdL](ClO₄)₂ CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN değerleri

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	MN sayısı ±SS	CPI
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	1000	8.0± 0.00	0.06
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	16.5 ± 6.36	0.05
	[CdL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	1000	7.5 ± 0.70	0.04
		0,5 µg/ml	1000	9.0± 1.41	0.07
		0,25 µg/ml	1000	10.5 ± 2.12	0.12
48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	1000	6.0± 0.00	0.08
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	25.5 ± 6.36**	0.04
	[CdL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	1000	18.0 ± 1.41*	0.07
		0,5 µg/ml	1000	10.0 ± 1.41*	0.05
		0,25 µg/ml	1000	17.5 ± 0.70*	0.41
	Spontan	-	1000	6.5± 0.70	0.55

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

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

[CdL](ClO₄)₂ ile yapılan çalışmada 48 saatlik muamele sonucunda, 1 µg/ml - 0,5 µg/ml - 0,25 µg/ml'lik dozlarda elde edilen MN sayıları istatistiksel olarak anlamlı ancak dozdan bağımsız değişim göstermektedir.

Çizelge 3. 5. [CoL](ClO₄)₂ CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN değerleri

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	MN sayısı ±SS	CPI
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	1000	8.0 ± 0.00	0.06
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	16.5 ± 6.36	0.05
	[CoL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	1000	13.0 ± 1.41	0.24
		0,5 µg/ml	1000	12.5 ± 2.12	0.25
		0,25 µg/ml	1000	15.0 ± 4.24	0.20
48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	1000	6.0 ± 0.00	0.08
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	25.5 ± 6.36*	0.04
	[CoL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	1000	6.0 ± 1.41	0.08
		0,5 µg/ml	1000	7.5 ± 0.70	0.07
		0,25 µg/ml	1000	9.0 ± 0.00	0.67
	Spontan	-	1000	6.5± 0.70	0.55

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

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

[CoL](ClO₄)₂ ile yapılan çalışmada 24 saatlik muamelede 0,25 µg/ml'lik en düşük dozda en yüksek MN değeri saptanmıştır. Bu değer pozitif kontrol sayısına yakındır. 48 saatlik muamelede de doz azalırken MN sayılarında artış gözlenmiştir.

Çizelge 3. 6. [ZnL](ClO₄)₂ 'in 24 ve 48 saatlik muamelelerinin CA (kromozom aberasyonları) üzerine etkisi

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	Aberasyonlar					CA/Hücre sayısı
				K'	K''	SU	DS	R	
-	Spontan	-	50	1	2	-	-	-	% 6
			50	1	2	-	-	-	
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	50	1	2	10	2	-	% 37
			50	4	4	12	-	2	
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	50	3	43	3	3	-	% 109
			50	8	47	1	1	-	
	[ZnL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	50	-	5	1	1	-	% 11
			50	1	3	-	-	-	
		0,5 µg/ml	50	1	8	1	-	-	% 17
			50	-	7	-	-	-	
		0,25 µg/ml	50	2	10	1	-	3	% 31
			50	3	12	-	-	-	
48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	50	1	2	6	1	-	% 23
			50	3	3	7	-	-	
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	50	5	74	10	2	-	% 146
			50	7	43	5	-	-	
	[ZnL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	50	2	5	2	1	-	% 17
			50	1	3	-	2	1	
		0,5 µg/ml	50	1	2	2	1	-	% 8
			50	1	-	-	1	-	
		0,25 µg/ml	50	1	1	2	1	-	% 7
			50	1	-	1	-	-	

DMSO, Dimetilsülfoksit; **MMC**, Mitomisin C; **K'**, Kromozom kırığı; **K''**, Kromatid kırığı; **SU**, Sister union; **DS**, Disentrik kromozom; **R**, Ring oluşumu

[ZnL](ClO₄)₂ ile yapılan 24 saatlik muamelede 0,25 µg/ml'lik en düşük dozda en yüksek CA değeri saptanmıştır. 48 saatlik muamelede ise doz azaldıkça düşen CA değerleri elde edilmiştir.

Çizelge 3. 7. [NiL](ClO₄)₂ 'in 24 ve 48 saatlik muamelelerinin CA (kromozom aberasyonları) üzerine etkisi

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	Aberasyonlar					CA/Hücre sayısı	
				K'	K''	SU	DS	R		
-	Spontan	-	50	1	2	-	-	-	% 6	
			50	1	2	-	-	-		
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	50	1	2	10	2	-	% 37	
			50	4	4	12	-	2		
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	50	3	43	3	3	-	% 109	
			50	8	47	1	1	-		
	[NiL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	50	3	3	3	-	-	% 13	
			50	-	4	-	-	-		
		0,5 µg/ml	50	4	2	-	-	-	% 16	
			50	5	5	-	-	-		
		0,25 µg/ml	50	5	1	-	-	3	% 23	
			50	7	5	2	-	-		
	48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	50	1	2	6	1	-	% 23
				50	3	3	7	-	-	
Pozitif kontrol (MMC)		0,3µg/ml	50	5	74	10	2	-	% 146	
			50	7	43	5	-	-		
[NiL](ClO ₄) ₂		1 µg/ml	50	1	1	-	-	-	% 8	
			50	-	2	3	-	1		
		0,5 µg/ml	50	-	1	2	-	-	% 8	
			50	1	2	2	-	-		
		0,25 µg/ml	50	1	-	-	-	-	% 5	
			50	2	2	-	-	-		

DMSO, Dimetilsülfoksit; **MMC**, Mitomisin C; **K'**, Kromozom kırığı; **K''**, Kromatid kırığı; **SU**, Sister union; **DS**, Disentrik kromozom; **R**, Ring oluşumu

[NiL](ClO₄)₂ ile yapılan 24 saatlik muamelede 0,25 µg/ml'lik en düşük dozda en yüksek CA değerine ulaşılmıştır. 48 saatlik muamelelerde dozdan bağımsız ve negatif kontrole göre düşük CA değerleri elde edilmiştir.

Çizelge 3. 8. [CuL](ClO₄)₂ 'in 24 ve 48 saatlik muamelelerinin CA (kromozom aberasyonları) üzerine etkisi

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	Aberasyonlar					CA/Hücre sayısı	
				K'	K''	SU	DS	R		
-	Spontan	-	50	1	2	-	-	-	% 6	
			50	1	2	-	-	-		
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	50	1	2	10	2	-	% 37	
			50	4	4	12	-	2		
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	50	3	43	3	3	-	% 109	
			50	8	47	1	1	-		
	[CuL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	50	7	1	-	-	-	% 25	
			50	12	5	-	-	-		
		0,5 µg/ml	50	1	3	-	-	-	% 10	
			50	3	3	-	-	-		
		0,25 µg/ml	50	3	3	1	-	-	% 18	
			50	8	3	-	-	-		
	48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	50	1	2	6	1	-	% 23
				50	3	3	7	-	-	
Pozitif kontrol (MMC)		0,3µg/ml	50	5	74	10	2	-	% 146	
			50	7	43	5	-	-		
[CuL](ClO ₄) ₂		1 µg/ml	50	2	2	-	1	-	% 12	
			50	4	2	-	1	-		
		0,5 µg/ml	50	2	3	-	-	-	% 20	
			50	10	5	-	-	-		
		0,25 µg/ml	50	4	4	1	-	-	% 28	
			50	9	7	1	2	-		

DMSO, Dimetilsülfoksit; **MMC**, Mitomisin C; **K'**, Kromozom kırığı; **K''**, Kromatid kırığı; **SU**, Sister union; **DS**, Disentrik kromozom; **R**, Ring oluşumu

[CuL](ClO₄)₂ ile yapılan 48 saatlik muamelede 0,25 µg/ml'lik en düşük dozda en yüksek CA değeri saptanmıştır. Saptanan değer negatif kontrolden daha yüksektir. Bu durum maddenin kromozom üzerinde uzun muamele süresinde ve düşük dozda etkili olduğunu göstermiştir.

Çizelge 3. 9. [CdL](ClO₄)₂ 'in 24 ve 48 saatlik muamelelerinin CA (kromozom aberasyonları) üzerine etkisi

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	Aberasyonlar					CA/Hücre sayısı	
				K'	K''	SU	DS	R		
-	Spontan	-	50	1	2	-	-	-	% 6	
			50	1	2	-	-	-		
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	50	1	2	10	2	-	% 37	
			50	4	4	12	-	2		
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	50	3	43	3	3	-	% 109	
			50	8	47	1	1	-		
	[CdL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	50	4	-	-	-	-	% 8	
			50	-	2	2	-	-		
		0,5 µg/ml	50	6	1	-	-	-	% 21	
			50	11	1	2	-	-		
		0,25 µg/ml	50	8	2	-	-	-	% 27	
			50	10	7	-	-	-		
	48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	50	1	2	6	1	-	% 23
				50	3	3	7	-	-	
Pozitif kontrol (MMC)		0,3µg/ml	50	5	74	10	2	-	% 146	
			50	7	43	5	-	-		
[CdL](ClO ₄) ₂		1 µg/ml	50	1	4	4	1	-	% 18	
			50	3	5	-	-	-		
		0,5 µg/ml	50	2	4	-	-	-	% 23	
			50	7	9	1	-	-		
		0,25 µg/ml	50	5	9	-	-	-	% 33	
			50	4	13	1	1	-		

DMSO, Dimetilsülfoksit; **MMC**, Mitomisin C; **K'**, Kromozom kırığı; **K''**, Kromatid kırığı; **SU**, Sister union; **DS**, Disentrik kromozom; **R**, Ring oluşumu

[CdL](ClO₄)₂ ile yapılan 24 saatlik muamelede doz azalışına paralel CA artışı gözlenmiştir. 48 saatlik muamelede 0,25 µg/ml'lik en düşük dozda en yüksek CA değeri saptanmıştır. Saptanan değer negatif kontrolden daha yüksektir.

Çizelge 3. 10. [CoL](ClO₄)₂ 'in 24 ve 48 saatlik muamelelerinin CA (kromozom aberasyonları) üzerine etkisi

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	Aberasyonlar					CA/Hücre sayısı
				K'	K''	SU	DS	R	
-	Spontan	-	50	1	2	-	-	-	% 6
			50	1	2	-	-	-	
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	50	1	2	10	2	-	% 37
			50	4	4	12	-	2	
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	50	3	43	3	3	-	% 109
			50	8	47	1	1	-	
	[CoL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	50	1	2	-	-	-	% 6
			50	-	3	-	-	-	
		0,5 µg/ml	50	2	4	-	1	-	% 18
			50	1	8	1	1	-	
		0,25 µg/ml	50	4	4	-	-	-	% 25
			50	5	11	1	-	-	
48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	50	1	2	6	1	-	% 23
			50	3	3	7	-	-	
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	50	5	74	10	2	-	% 146
			50	7	43	5	-	-	
	[CoL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	50	-	4	-	-	-	% 7
			50	1	2	-	-	-	
		0,5 µg/ml	50	-	6	-	1	-	% 19
			50	1	8	1	2	-	
		0,25 µg/ml	50	1	7	-	-	-	% 28
			50	3	13	-	4	-	

DMSO, Dimetilsülfoksit; **MMC**, Mitomisin C; **K'**, Kromozom kırığı; **K''**, Kromatid kırığı; **SU**, Sister union; **DS**, Disentrik kromozom; **R**, Ring oluşumu

[CoL](ClO₄)₂ ile yapılan 48 saatlik muamelede 0,25 µg/ml'lik en düşük dozda en yüksek CA değeri saptanmıştır. 24 ve 48 saatlik muamelelerde doz azaldıkça CA sayıları artmaktadır.

Çizelge 3. 11. [ZnL](ClO₄)₂ 'in kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi

Süre	Madde	Doz	Hücre sayısı	Min/Max SCE	SCE / Hücre ± SS
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	50	1-3	1.76 ± 0.56
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	50	6-12	11.60 ± 2.65*
	[ZnL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	50	1-7	3.78 ± 2.63
		0,5 µg/ml	50	1-5	3.54 ± 0.02
		0,25 µg/ml	50	1-5	3.42 ± 0.98
48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	50	1-5	1.51 ± 0.12
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	50	10-22	15.57 ± 2.17**
	[ZnL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	50	2-9	6.02 ± 2.06*
		0,5 µg/ml	50	1-5	3.60 ± 0.33*
		0,25 µg/ml	50	2-5	4.44 ± 0.39*
	Spontan	-	50	1-2	1.62 ± 0.19

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

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

[ZnL](ClO₄)₂ ile yapılan 24 saatlik muamelede 1, 0,5 ve 0,25 µg/ml'lik dozlarda negatif kontrolden yüksek ve birbirine yakın SCE sonuçları elde edilmiştir. Doza paralel SCE artışları gözlenmiştir. 48 saatlik muamelede 1 µg/ml'lik en yüksek dozda istatistiksel olarak anlamlı en yüksek SCE sayısı saptanmıştır.

Çizelge 3. 12. [NiL](ClO₄)₂ 'in kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi

Süre	Madde	Doz	Hücre sayısı	Min/Max SCE	SCE / Hücre ± SS
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	50	1-3	1.76 ± 0.56
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	50	6-12	11.60 ± 2.65***
	[NiL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	50	1-3	2.08 ± 0.73
		0,5 µg/ml	50	1-5	3.78 ± 1.44
		0,25 µg/ml	50	1-6	4.44 ± 1.18
48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	50	1-5	1.51 ± 0.12
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	50	10-22	15.57 ± 2.17**
	[NiL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	50	1-8	6.34 ± 1.49*
		0,5 µg/ml	50	1-8	5.54 ± 0.59*
		0,25 µg/ml	50	1-6	5.00 ± 0.62*
	Spontan	-	50	1-2	1.62 ± 0.19

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

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

[NiL](ClO₄)₂'nin 24 saatlik muamelesinde 0,25 µg/ml'lik en düşük dozda en yüksek SCE sayısı saptanmıştır. 48 saatlik muamelede 1 ve 0,5 µg/ml'lik dozlarda istatistiksel olarak anlamlı ve doza bağlı bir SCE artışı vardır.

Çizelge 3. 13. [CuL](ClO₄)₂ 'in kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi

Süre	Madde	Doz	Hücre sayısı	Min/Max SCE	SCE / Hücre ± SS
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	50	1-3	1.76 ± 0.56
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	50	6-12	11.60 ± 2.65***
	[CuL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	50	1-11	8.70 ± 0.93*
		0,5 µg/ml	50	1-9	8.08 ± 0.33*
		0,25 µg/ml	50	1-8	5.18 ± 0.93
48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	50	1-5	1.51 ± 0.12
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	50	10-22	15.57 ± 2.17**
	[CuL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	50	2-12	7.26 ± 0.82*
		0,5 µg/ml	50	1-9	7.16 ± 0.39*
		0,25 µg/ml	50	1-6	2.84 ± 1.41*
	Spontan	-	50	1-2	1.62 ± 0.19

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

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

[CuL](ClO₄)₂'nin 24 ve 48 saatlik muamelesinde 1 ve 0,5 µg/ml'lik dozlarda negatif kontrolden yüksek, pozitif kontrole yakın ve istatistiksel olarak anlamlı SCE değerleri elde edilmiştir.

Çizelge 3. 14. [CdL](ClO₄)₂ 'in kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi

Süre	Madde	Doz	Hücre sayısı	Min/Max SCE	SCE / Hücre ± SS
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	50	1-3	1.76 ± 0.56
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	50	6-12	11.60 ± 2.65***
	[CdL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	50	1-11	7.08 ± 3.33
		0,5 µg/ml	50	1-9	6.78 ± 2.34
		0,25 µg/ml	50	1-4	3.08 ± 0.50
48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	50	1-5	1.51 ± 0.12
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	50	10-22	15.57 ± 2.17**
	[CdL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	50	3-9	6.86 ± 0.87*
		0,5 µg/ml	50	2-9	6.10 ± 2.68*
		0,25 µg/ml	50	1-9	6.24 ± 0.50*
	Spontan	-	50	1-2	1.62 ± 0.19

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

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

[CdL](ClO₄)₂'nin 24 saatlik muamelesinde doza paralel SCE artışı vardır. 48 saatlik muamelede 1 µg/ml'lik en yüksek dozda en yüksek SCE sayısı saptanmıştır.

Çizelge 3. 15. [CoL](ClO₄)₂ 'in kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi

Süre	Madde	Doz	Hücre sayısı	Min/Max SCE	SCE / Hücre ± SS
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	50	1-3	1.76 ± 0.56
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	50	6-12	11.60 ± 2.65***
	[CoL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	50	1-11	6.74 ± 2.23
		0,5 µg/ml	50	1-10	6.82 ± 1.29
		0,25 µg/ml	50	2-9	4.40 ± 0.96
48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	50	1-5	1.51 ± 0.12
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	50	10-22	15.57 ± 2.17**
	[CoL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	50	1-6	3.60 ± 1.92*
		0,5 µg/ml	50	3-9	6.20 ± 0.45*
		0,25 µg/ml	50	1-8	3.72 ± 1.75*
	Spontan	-	50	1-2	1.62 ± 0.19

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

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

[CoL](ClO₄)₂'nin 24 saatlik muamelesinde dozdan bağımsız SCE artışı vardır. 48 saatlik muamelede 0,5 µg/ml'lik dozda en yüksek SCE sayısı saptanmıştır.

Çizelge 3. 16. [ZnL](ClO₄)₂ 'in DNA replikasyonu ve mitoz bölünme üzerine etkisi

Süre	Madde	Doz	M1	M2	M3	RI ± SS	MI ± SS
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	42	55	3	1.62 ± 0.14	7.08 ± 0.04
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	20	66	14	1.94 ± 0.31*	4.49 ± 0.53**
	[ZnL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	30	52	18	1.88 ± 0.11	2.98 ± 0.04**
		0,5 µg/ml	32	52	16	1,84 ± 0.16	2.01 ± 0.70**
		0,25 µg/ml	24	60	16	1,92 ± 0.11	1.28 ± 0.22**
48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	20	66	14	1.94 ± 0.25	5.96 ± 0.06
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	46	43	11	1.66 ± 0.31*	3.79 ± 0.04***
	[ZnL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	24	16	60	2.36 ± 0.16	3.52 ± 0.71***
		0,5 µg/ml	34	20	46	2.12 ± 0.00	0.99 ± 0.03**
		0,25 µg/ml	38	18	44	2.06 ± 0.08	1.38 ± 0.04**
	Spontan	-	24	42	14	1.82 ± 0.02	6.97 ± 0.07

MMC: Mitomisin-c, DMSO: Dimetilsülfoksit, M1: Metafaz 1, M2: Metafaz 2, M3: Metafaz 3, RI: Replikasyon indeksi, MI: Mitotik indeks± SS: Standart sapma değerleri

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

[ZnL](ClO₄)₂'nin 24 saatlik muamelesinde doza paralel azalış gösteren MI değerleri saptanmıştır. 48 saatlik muamelede dozdan bağımsız MI değerleri bulunmuştur.

Çizelge 3. 17. [NiL](ClO₄)₂ 'in DNA replikasyonu ve mitoz bölünme üzerine etkisi

Süre	Madde	Doz	M1	M2	M3	RI ± SS	MI ± SS
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	42	55	3	1.62 ± 0.14	7.08 ± 0.04**
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	20	66	14	1.94 ± 0.31*	4.49 ± 0.53**
	[NiL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	36	38	26	1.90 ± 0.19	3.12 ± 0.86**
		0,5 µg/ml	38	50	12	1.74 ± 0.02	4.96 ± 0.06**
		0,25 µg/ml	22	68	10	1.88 ± 0.11	2.11 ± 0.14**
48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	20	66	14	1.94 ± 0.25	5.96 ± 0.06
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	46	43	11	1.66 ± 0.31*	3.79 ± 0.04***
	[NiL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	28	18	54	2.26 ± 0.14	3.71 ± 0.99**
		0,5 µg/ml	24	16	60	2.36 ± 0.11	1.22 ± 0.21***
		0,25 µg/ml	30	16	54	1.86 ± 0.19	2.70 ± 0.92**
	Spontan	-	24	42	14	1.82 ± 0.02	6.97 ± 0.07

MMC: Mitomisin-c, DMSO: Dimetilsülfoksit, M1: Metafaz 1, M2: Metafaz 2, M3: Metafaz 3, RI: Replikasyon indeksi, MI: Mitotik indeks± SS: Standart sapma değerleri

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

[NiL](ClO₄)₂'nin 48 saatlik muamelesinde dozdan bağımsız değişim gösteren MI değerleri her üç dozun da pozitif kontrolden daha fazla mitotik inhibitör etkisi olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3. 18. [CuL](ClO₄)₂ 'in DNA replikasyonu ve mitoz bölünme üzerine etkisi

Süre	Madde	Doz	M1	M2	M3	RI ± SS	MI ± SS
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	42	55	3	1.62 ± 0.14	7.08 ± 0.04
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	20	66	14	1.94 ± 0.31*	4.49 ± 0.53*
	[CuL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	30	40	30	2.00 ± 0.11	1.75 ± 0.67**
		0,5 µg/ml	20	70	10	1.90 ± 0.02	2.11 ± 0.50**
		0,25 µg/ml	22	42	36	2.14 ± 0.19*	1.93 ± 0.05**
48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	20	66	14	1.94 ± 0.25	5.96 ± 0.06
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	46	43	11	1.66 ± 0.31*	3.79 ± 0.04**
	[CuL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	24	18	58	2.34 ± 0.31	2.31 ± 0.14**
		0,5 µg/ml	22	14	64	2.42 ± 0.02	1.49 ± 0.12**
		0,25 µg/ml	24	16	60	2.36 ± 0.05	1.71 ± 0.08**
	Spontan	-	24	42	14	1.82 ± 0.02	6.97 ± 0.07

MMC: Mitomisin-c, DMSO: Dimetilsülfoksit, M1: Metafaz 1, M2: Metafaz 2, M3: Metafaz 3, RI: Replikasyon indeksi, MI: Mitotik indeks± SS: Standart sapma değerleri

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

[CuL](ClO₄)₂'nin 24 ve 48 saatlik muamelesinde dozdan bağımsız MI değerleri bulunmuştur. Değerler test maddesinin hem negatif hem de pozitif kontrolden daha fazla mitotik inhibitör etkisi olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3. 19. [CdL](ClO₄)₂ 'in DNA replikasyonu ve mitoz bölünme üzerine etkisi

Süre	Madde	Doz	M1	M2	M3	RI ± SS	MI ± SS
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	42	55	3	1.62 ± 0.14	7.08 ± 0.04
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	20	66	14	1.94 ± 0.31*	4.49 ± 0.53**
	[CdL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	12	22	66	2.54 ± 0.14**	3.99 ± 0.02**
		0,5 µg/ml	26	22	52	2.26 ± 0.14*	2.76 ± 0.12**
		0,25 µg/ml	22	26	52	2.30 ± 0.14	1.13 ± 0.01**
48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	20	66	14	1.94 ± 0.25	5.96 ± 0.06
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	46	43	11	1.66 ± 0.31*	3.79 ± 0.04**
	[CdL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	26	10	64	2.42 ± 0.08	1.76 ± 0.12**
		0,5 µg/ml	26	12	62	2.36 ± 0.05	1.76 ± 0.34**
		0,25 µg/ml	24	16	60	2.36 ± 0.11	1.75 ± 0.31**
	Spontan	-	24	42	14	1.82 ± 0.02	6.97 ± 0.07

MMC: Mitomisin-c, DMSO: Dimetilsülfoksit, M1: Metafaz 1, M2: Metafaz 2, M3: Metafaz 3, RI: Replikasyon indeksi, MI: Mitotik indeks± SS: Standart sapma değerleri

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

[CdL](ClO₄)₂'nin 24 saatlik muamelesinde doza paralel MI değerleri saptanmıştır. 48 saatlik muamelede her doz için birbirine yakın MI değerleri bulunmuştur.

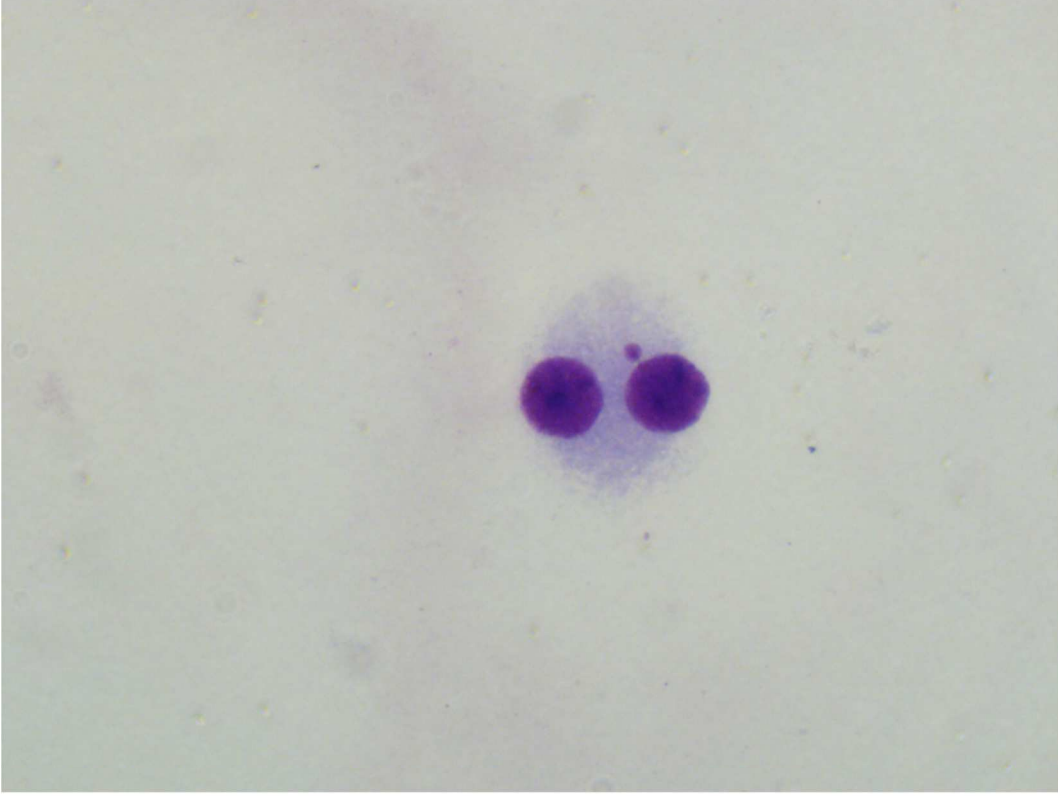
Çizelge 3. 20. [CoL](ClO₄)₂ 'in DNA replikasyonu ve mitoz bölünme üzerine etkisi

Süre	Madde	Doz	M1	M2	M3	RI ± SS	MI ± SS
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	42	55	3	1.62 ± 0.14	7.08 ± 0.04
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	20	66	14	1.94 ± 0.31*	4.49 ± 0.53**
	[CoL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	42	42	16	1.74 ± 0.14	3.60 ± 0.82***
		0,5 µg/ml	40	34	26	1.86 ± 0.08	3.90 ± 0.46**
		0,25 µg/ml	36	36	28	1.92 ± 0.11	1.95 ± 0.42**
48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	20	66	14	1.94 ± 0.25	5.96 ± 0.06
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	46	43	11	1.66 ± 0.31*	3.79 ± 0.04**
	[CoL](ClO ₄) ₂	1 µg/ml	52	28	20	1.68 ± 0.05	1.14 ± 0.24**
		0,5 µg/ml	66	18	16	1.50 ± 0.02	1.12 ± 0.07**
		0,25 µg/ml	54	16	30	1.46 ± 0.14	1.03 ± 2.25**
	Spontan	-	24	42	14	1.82 ± 0.02	6.97 ± 0.07

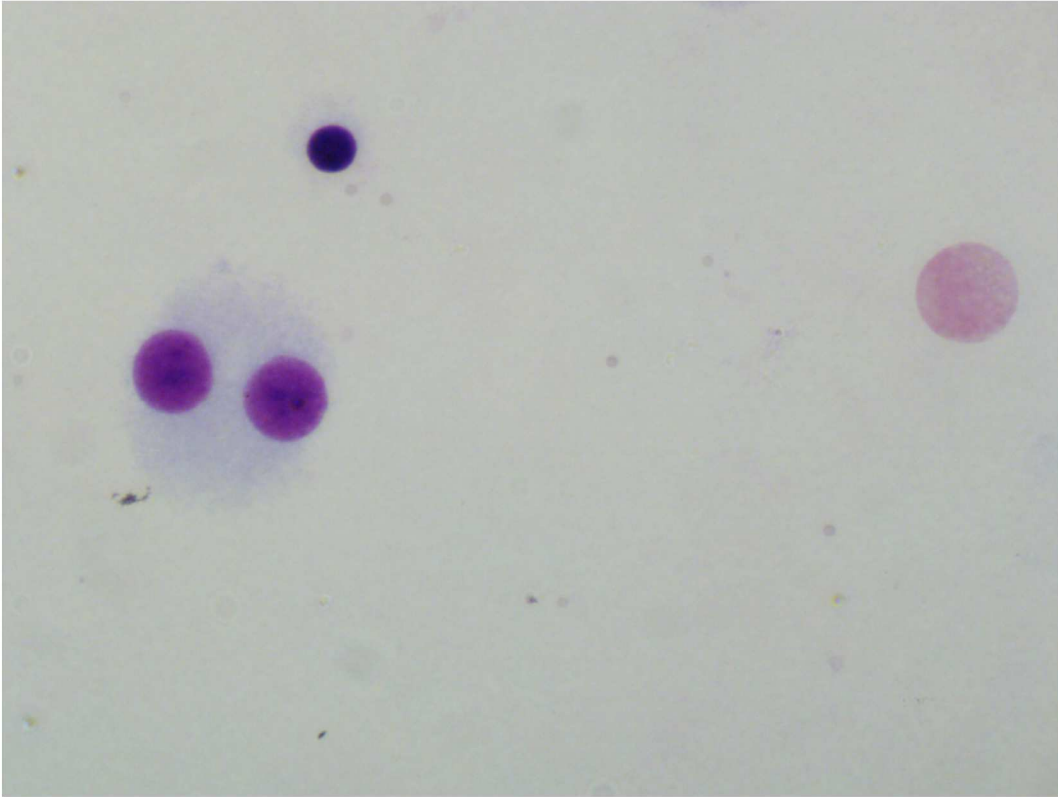
MMC: Mitomisin-c, DMSO: Dimetilsülfoksit, M1: Metafaz 1, M2: Metafaz 2, M3: Metafaz 3, RI: Replikasyon indeksi, MI: Mitotik indeks± SS: Standart sapma değerleri

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

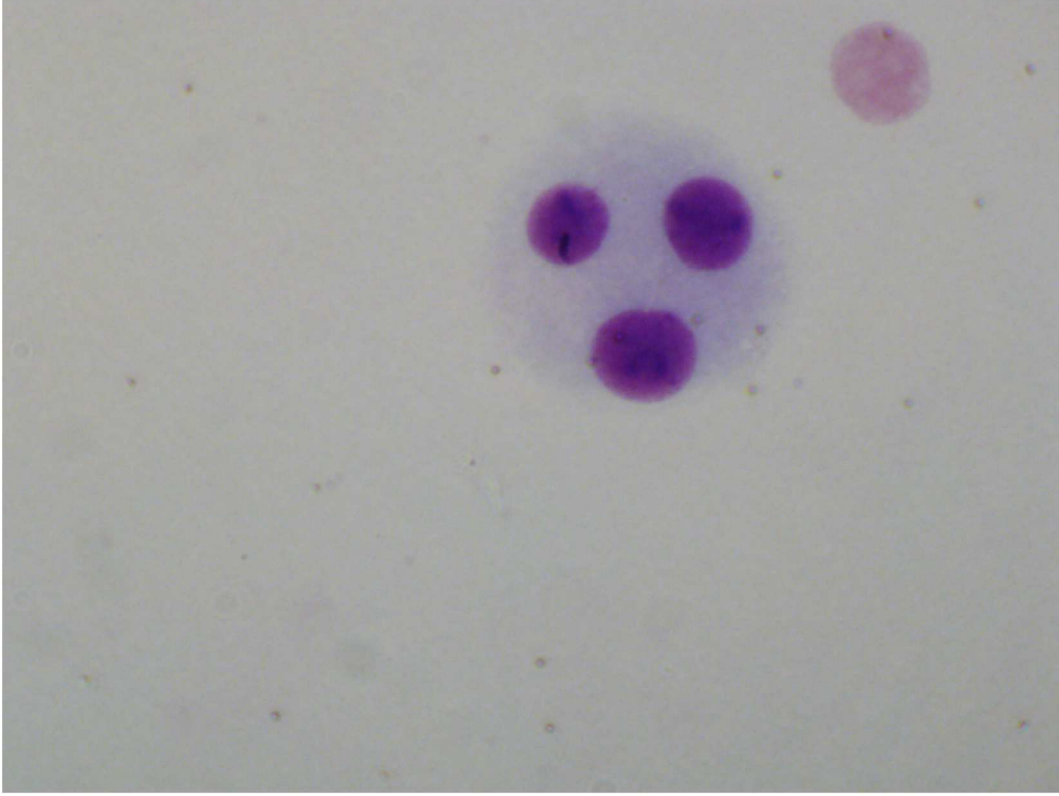
[CoL](ClO₄)₂'nin 24 saatlik muamelesinde dozdan bağımsız MI değerleri bulunmuştur. 0,25 µg/ml'lik dozda en düşük MI değeri saptanmıştır. 48 saatlik muamelede doz azaldıkça azalan paralel azalış gösteren MI değerleri saptanmıştır.



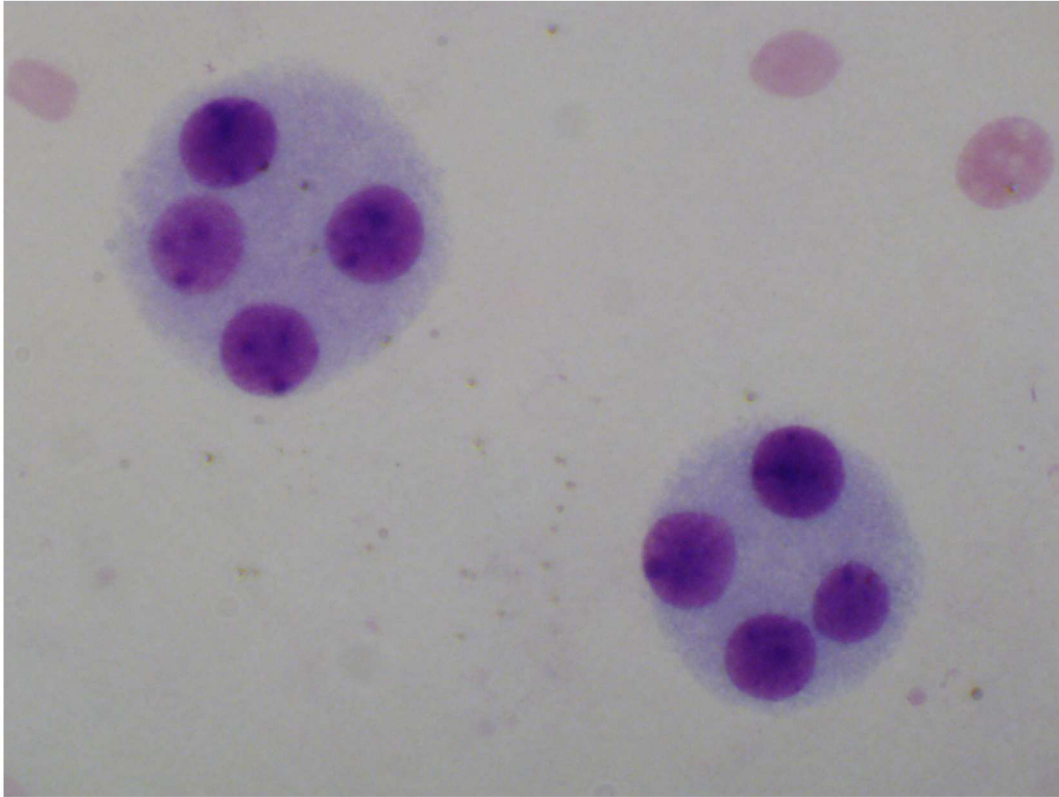
Şekil 3. 1. Bir mikronükleuslu iki çekirdekli hücre (400x)



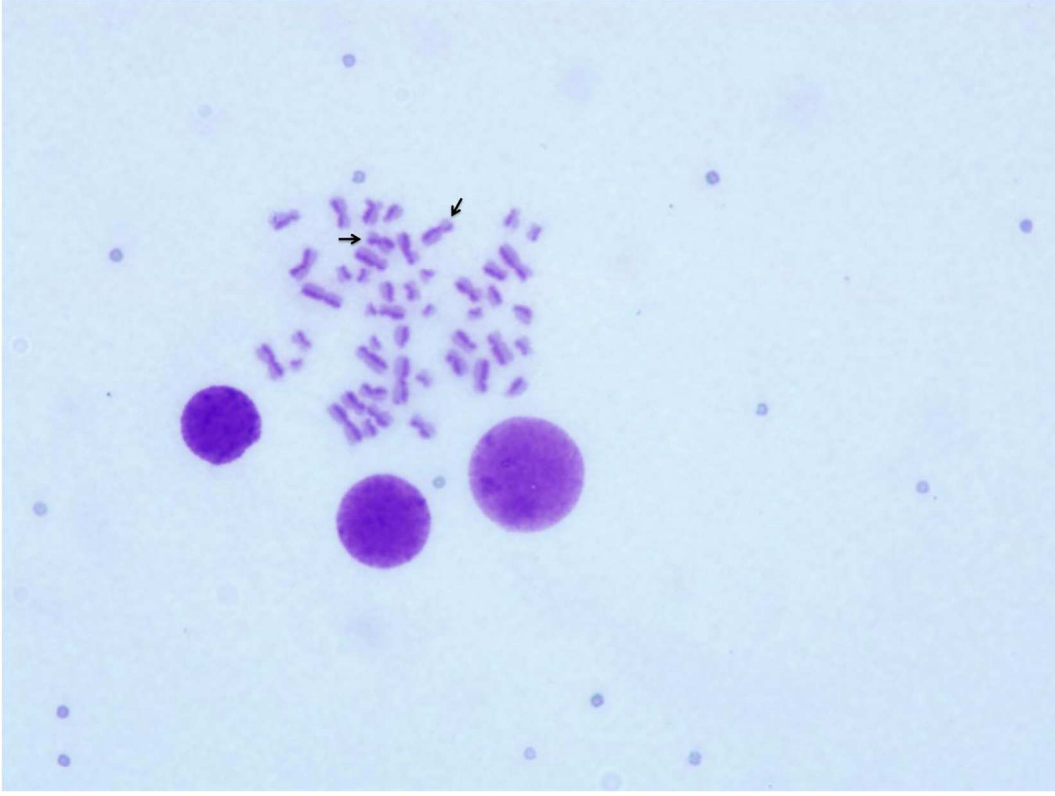
Şekil 3. 2. İki çekirdekli hücre (400x)



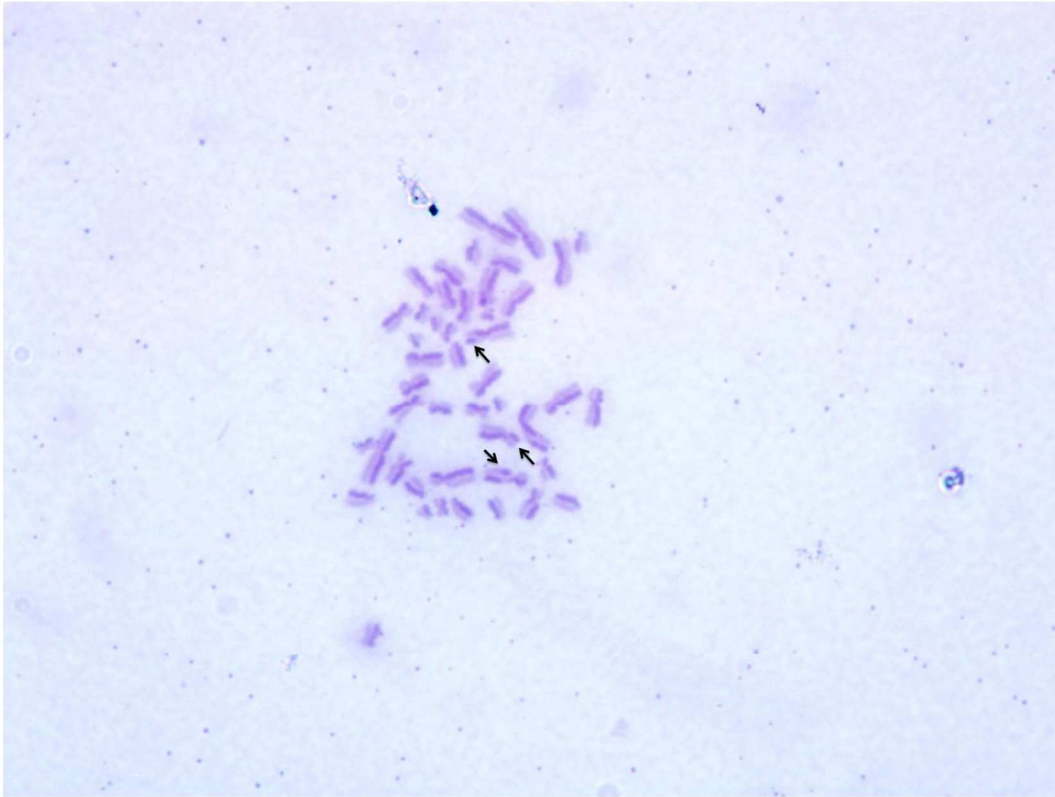
Şekil 3. 3. Üç çekirdekli hücre (400x)



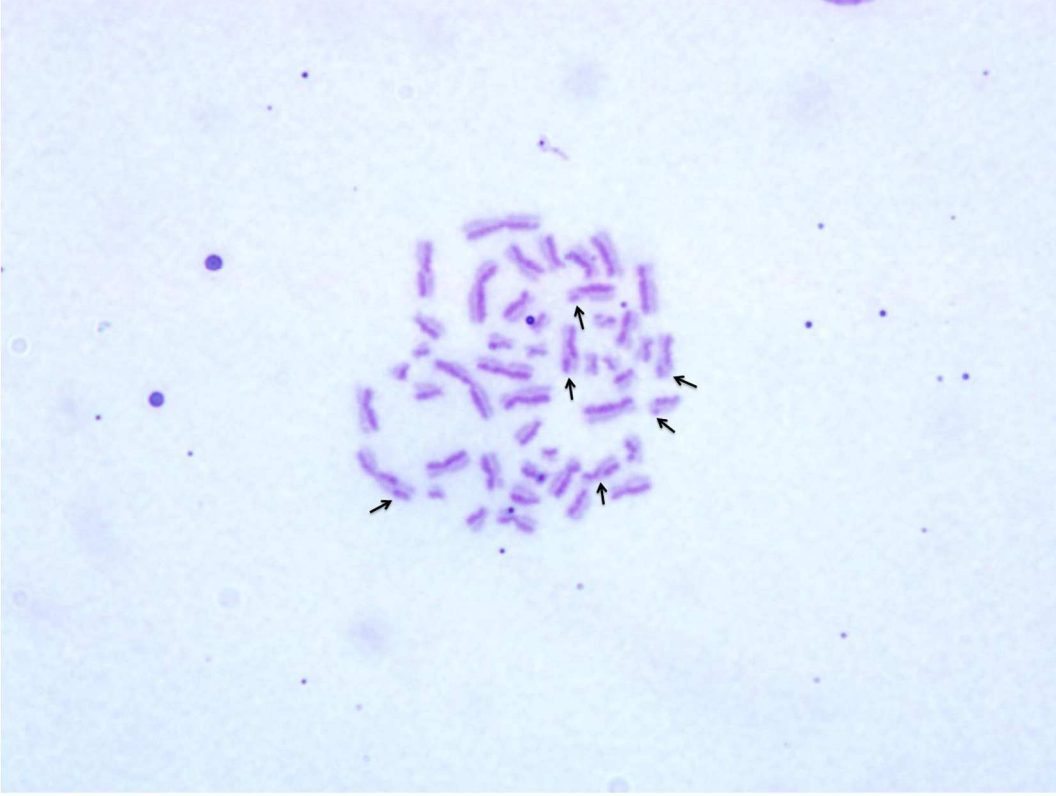
Şekil 3. 4. Dört çekirdekli hücreler (400x)



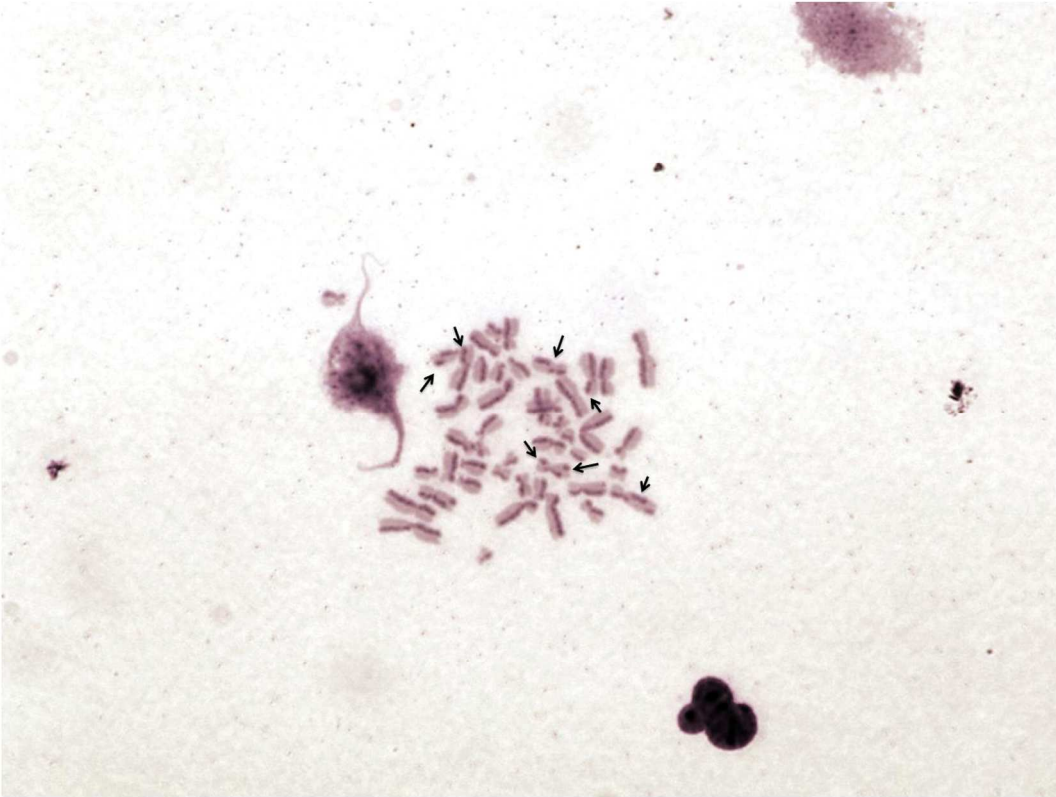
Şekil 3. 5. 2'li kardeş kromatit değişimleri gözlenen kromozomlar (1000x)



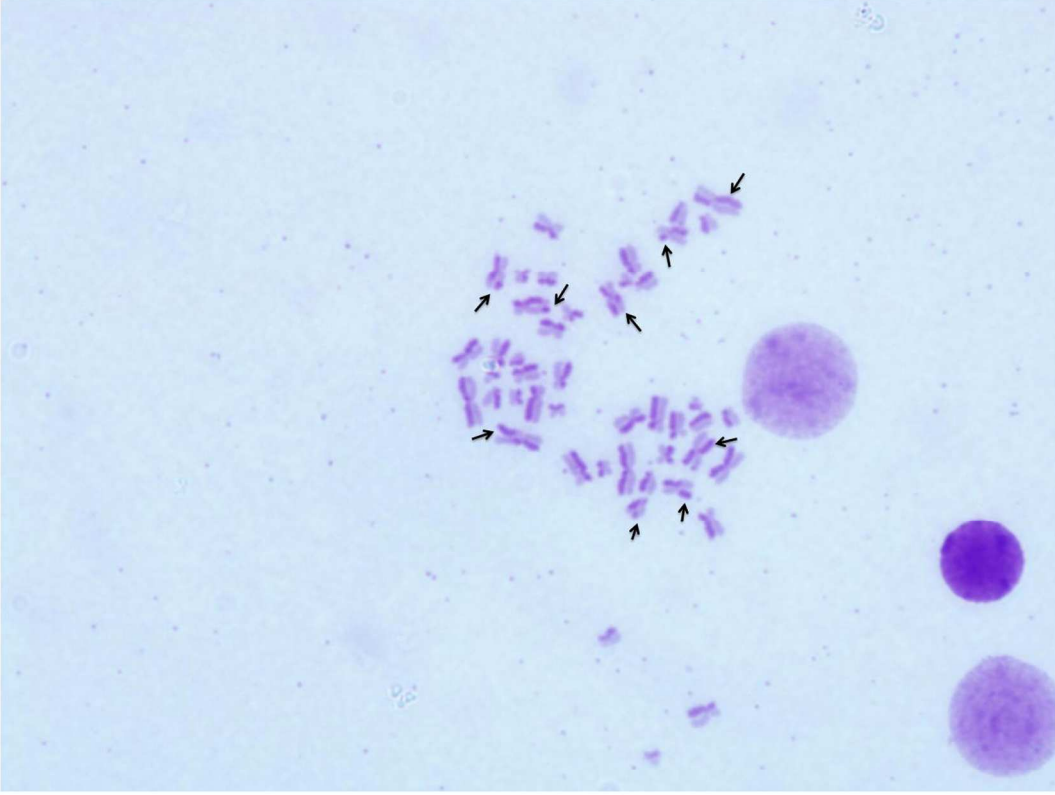
Şekil 3. 6. 3'lü kardeş kromatit değişimleri gözlenen kromozomlar (1000x)



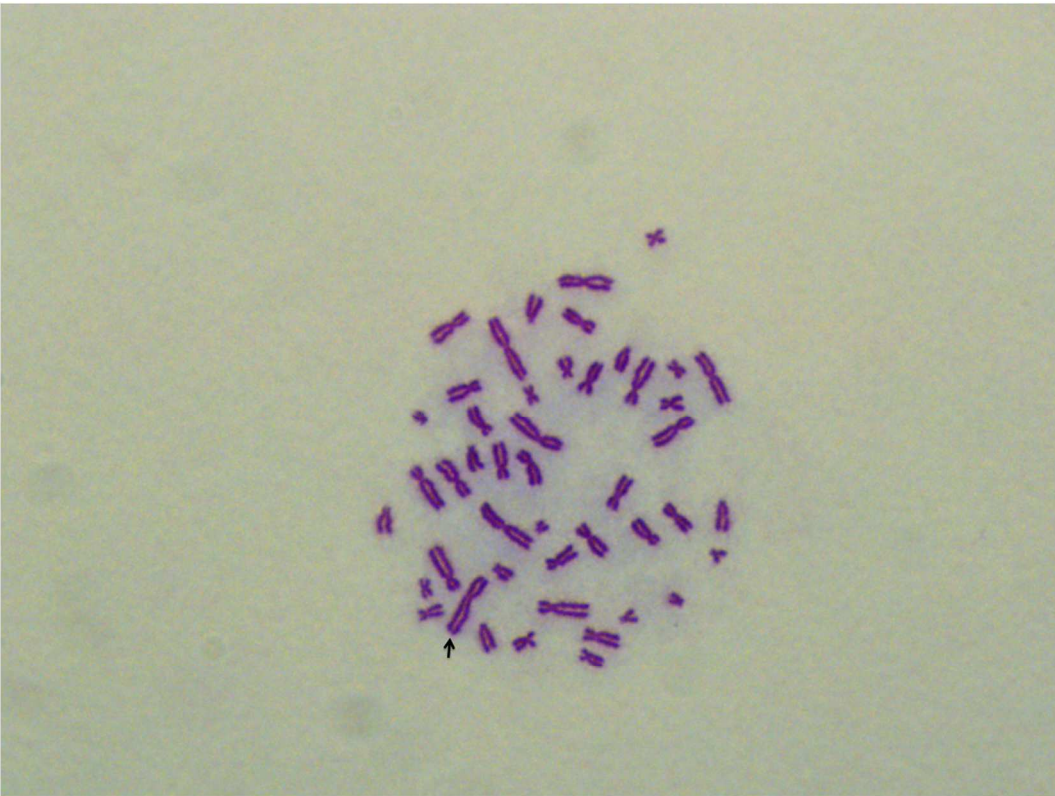
Şekil 3. 7. 6'lı kardeş kromatit değişimleri gözlenen kromozomlar (1000x)



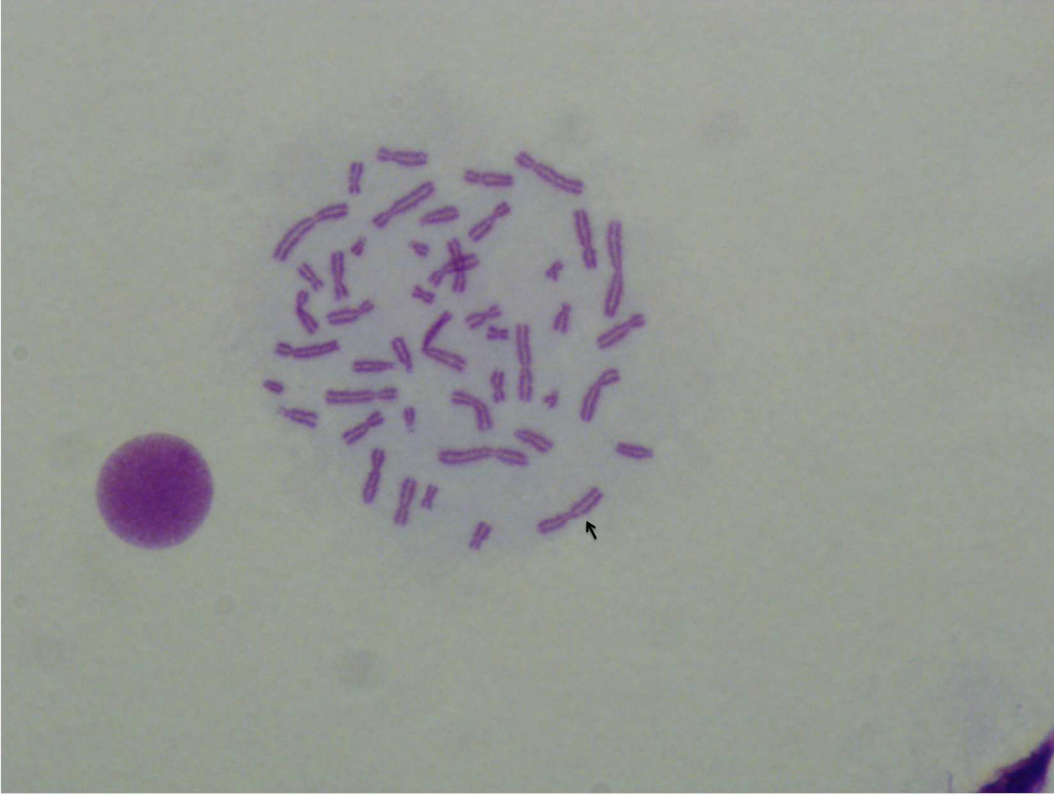
Şekil 3. 8. 7'li kardeş kromatit değişimleri gözlenen kromozomlar (1000x)



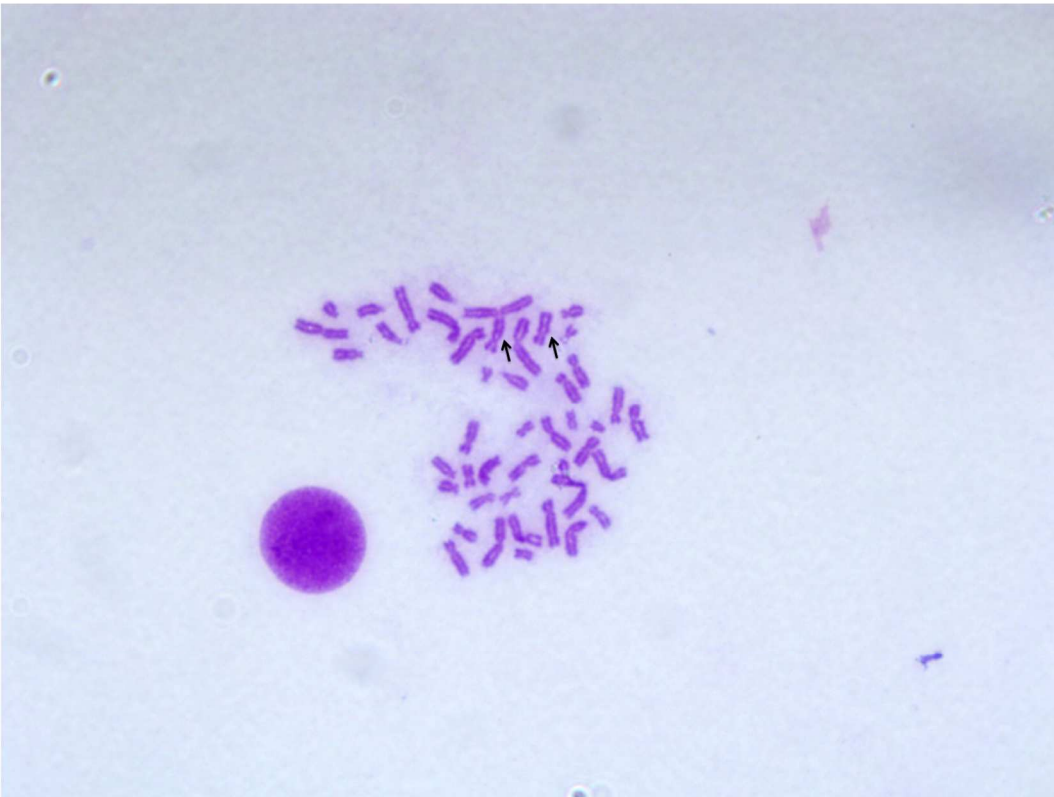
Şekil 3. 9. 9²lu kardeş kromatit değişimleri gözlenen kromozomlar (1000x)



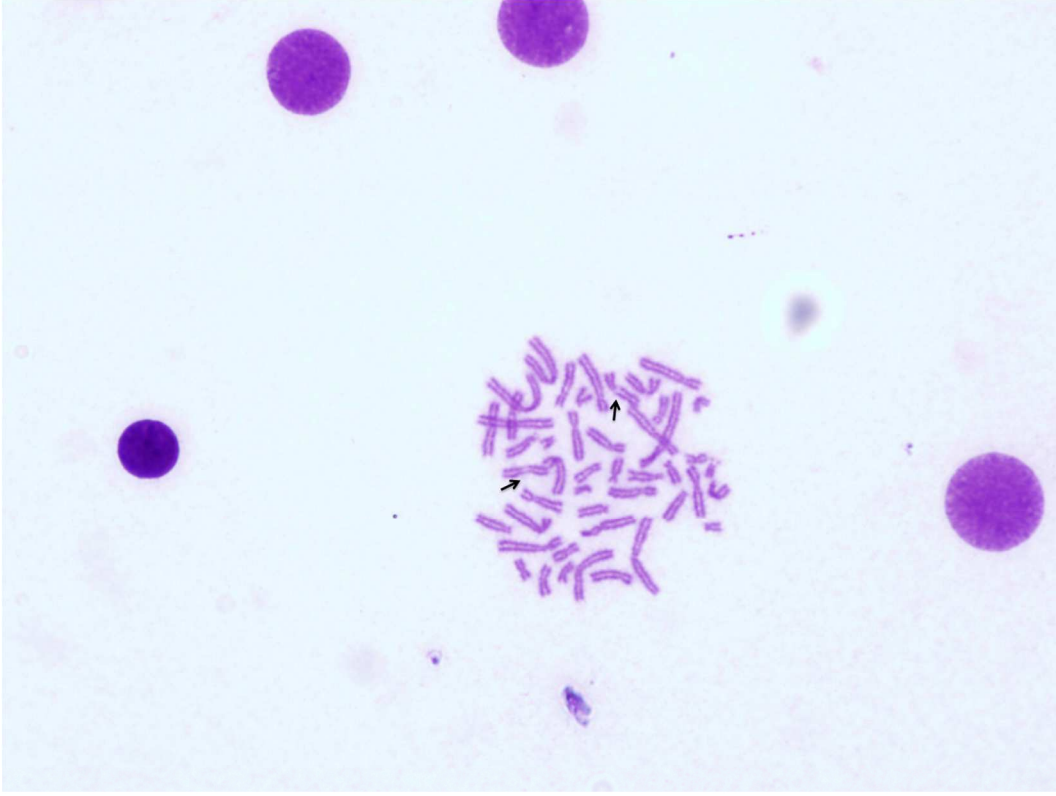
Şekil 3. 10. Kromozom aberasyonu (sister union) (1000x)



Şekil 3. 11. Kromozom aberasyonu (kromatid kırığı) (1000x)



Şekil 3. 12. Kromozom aberasyonu (disentrik kromozom) (1000x)



Şekil 3. 13. Kromozom aberasyonu (kromozom kırığı) (1000x)

4. TARTIŞMA SONUÇ

Klastojenik ve anöjenik etkiyi saptamaya yönelik olan biyoizleme çalışmalarında kullanılan sitogenetik testler, etki kaynağı ve maruziyet sonuçlarının belirlenmesi için önemlidir [117]. Sitogenetik biyomarkırlarla yapılan insan popülasyon çalışmaları içinde en popüler testlerin CA, MN olduğu belirtilmektedir. 1980-2003 arası Medline/Pubmed veri tabanında 833 popülasyon çalışmasında CA, 434 çalışmada MN kullanıldığı saptanmıştır [118]. Bunun sebeplerinden birisi hücre ölümü, mutasyon, kanser ilişkisinin araştırıldığı çalışmaların hız kazanmış olmasıdır. Çünkü genetik materyalde çevresel etmenlerle veya kendiliğinden meydana gelen hasarlar ya onarım mekanizmalarıyla onarılır, ya programlı hücre ölümüne yol açar ya da kalıcı bir mutasyon oluşturur. Yapılan kanser çalışmalarında artmış DNA onarımı kapasitesinin çeşitli kanser türlerine yatkınlıkla ilişkili olduğu düşünülmüştür [119].

Toksik maddeler ve hastalık kaydı ajansı (ATSDR), maddelerin toksikolojik profilleri ile ilgili çalışmaların ve verilerin toplandığı bir kaynak olup bizim çalışmamızda kullanılan metaller ile ilgili daha fazla veriye ihtiyaç duyulduğunun altını çizmektedir [120].

Bu tez çalışmasında kullanılan test maddeleri, özgün ve yeni sentezlenmiş olup, literatürde aynı metal komplekslerinin genotoksik aktivitelerini araştırmaya yönelik başka çalışmalar bulunmamaktadır. Bunun yanı sıra farklı metal, metal tuzu ve türevleri ile yapılan çalışmalar mevcuttur.

Kadmiyum tuzu ile yapılan bir çalışmada, SCE frekansının kontrole göre yüksek anlamlılık derecesinde arttığı gözlenmiştir [15]. Tez çalışmamızda, [CdL](ClO₄)₂'in 24 saatlik muamelesinde SCE üzerinde doza paralel olarak artan bir etkisi olmuştur. 48 saatlik uygulamada 1 - 0,5 ve 0,25 µg/ml'lik her üç dozda da dozdan bağımsız ancak kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 3.14). [CdL](ClO₄)₂'in MN testindeki 48 saatlik muamelesinde her üç dozda da yine dozdan bağımsız ancak yüksek anlamlılıkta sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 3.4). CA sonuçlarına göre [CdL](ClO₄)₂'in 0,25 µg/ml'lik en düşük dozunda kontrole göre yüksek oranda aberasyonları artırdığı gözlenmiştir

(Çizelge 3.9). $[CdL](ClO_4)_2$ 'in MI değerleri 24 saatlik muamelede doza paraleldir. 48 saatlik muamelede mitotik inhibisyon etkisi saptanmıştır (Çizelge 3.19). Kadmiyum ve çinkonun sitotoksisiteyi artırdığına dair başka çalışmalar da bulunmaktadır [17]. Tez çalışmamızda, $[ZnL](ClO_4)_2$ 48 saatlik muamelede 1 $\mu g/ml$ 'lik en yüksek dozda CPI değerini düşürmüş, 0,25 $\mu g/ml$ 'lik en düşük dozda en yüksek MN frekansını göstermiştir (Çizelge 3.2). $[ZnL](ClO_4)_2$ kromozom aberasyonlarını 24 saatlik muamelede 0,25 $\mu g/ml$ 'lik en düşük dozda, 48 saatlik muamelede ise 1 $\mu g/ml$ 'lik en yüksek dozda indüklemiştir (Çizelge 3.7). SCE testinde 48 saatlik muamelede dozdan bağımsız ancak istatistiksel olarak anlamlı artışlar yapan $[ZnL](ClO_4)_2$ MI değerlerini hem 24 hem de 48 saatlik muamelede pozitif kontrolden daha fazla düşürerek etkisini göstermiştir (Çizelge 3.12 ve 3.17).

Yeni sentezlenen platin (II) kompleksinin periferal insan lenfositleri üzerinde cisplatinden daha az genotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur [14].

Tez çalışmamızda, $[CuL](ClO_4)_2$ 24 ve 48 saatlik muamelelerde MI değerlerini anlamlı olarak düşürmüş, SCE frekansını anlamlı olarak artırmıştır (Çizelge 3.13 ve 3.18). 48 saatlik muamelede 0,25 $\mu g/ml$ 'lik en düşük dozda kromozom aberasyonlarını kontrole göre artırmıştır (Çizelge 3.8). MN frekansını ise her iki muamelede de kontrolün 2 katı kadar indükleyerek genotoksik etkisini göstermiştir (Çizelge 3.3). Demir ve bakır genotoksitesinde portakal suyunun etkisi fare kan hücrelerinde *in vivo* olarak comet testi ile araştırılmış ve portakal suyunun demir etkisine karşı önleyici olduğu ancak iyileştirici olmadığı tespit edilmiştir [121].

Krom ve kadmiyumun genotoksik etkisi ile ilgili bir çalışmada ise *in situ labelling* (EM-ISEL) tekniğini kullanılmış ve yeni bilgilere ışık tutmuştur. EM-ISEL tekniğiyle yapılan DNA tek zincir kırığı ölçümleri, her iki bileşiğinde sitotoksik olmayan konsantrasyonlarda genotoksik etkili olduğunu göstermiştir [8].

CBMN tekniği ile $10^{-3} - 10^{-6}$ M lık kadmiyum klorid konsantrasyonları insan lenfositlerinde denenmiş ve yüksek dozun MN frekansını artırdığı bulunmuştur [122]. Tez çalışmasında elde ettiğimiz verilere göre, $[CdL](ClO_4)_2$ 24 saatlik muamelede 0,25 $\mu g/ml$ 'lik en düşük dozda, 48 saatlik muamelede ise

1µg/ml'lik en yüksek dozda MN frekansını artırmıştır. CPI değerleri 24 saatlik muamelede 1 µg/ml'lik en yüksek dozda, 48 saatlik muamelede ise 1 ve 0,5µg/ml'lik dozlarda negatif kontrolün altında değerlere sahiptir (Çizelge 3.4). 10^{-4} M kadmiyum klorit ile yapılan bir başka çalışma bu dozu letal doz olarak vermiştir, çalışma sonucuna göre proliferatif indeks düşmüş, SCE frekansı artmıştır [123]. Tez çalışmamızda da [CdL](ClO₄)₂'in kullanılan her üç dozda SCE frekansını artırıcı etkisi literatüre paralel bulunmuştur (Çizelge 3.14). Sıçanların bazı dokularında yağ asidi bileşimlerindeki değişimde kadmiyumun etkili olduğunu öne süren bir çalışma yapılmıştır [124].

Altı farklı metal tozu ile muamele edilen iki genç sigara kullanmayan donörden alınan insan lenfositlerinde yapılan MN ve FISH analizlerine göre Al, Cd, Hg, Sb, Te, Tl tuzlarından, Tl₂SO₄ hariç hepsinde MN sayılarının artış gösterdiği, KSbO₃ ve CH₃HgCl nin ise yüksek genotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur [13]. Bu sonuç, [CdL](ClO₄)₂'in tez çalışmamızda saptadığımız MN frekansını artırıcı etkisi ile paraleldir (Çizelge 3.4).

Kromozom hasarı ve onarımı üzerine nikel ve radyasyonun genotoksik ilişkisini inceleyen bir çalışmada zaten zayıf mutajen olduğu bilinen nikel asetatın SCE ve CA sayılarını artırmadığı sadece mitotik inhibisyona sebep olduğu belirtilmiştir [125]. Literatür bilgisine karşıt olarak, [NiL](ClO₄)₂'in MN testinde 24 saatlik uygulamada 0,25 µg/ml'lik en düşük dozda pozitif kontrolden daha fazla MN frekansına sebep olurken 48 saatlik muamelede 1 µg/ml'lik en yüksek dozda yine pozitif kontrole yakın MN frekansı elde edilmiştir (Çizelge 3.2). [NiL](ClO₄)₂'in kromozom aberasyonunu artırıcı yönde etkisi görülmemiştir (Çizelge 3.7). Ancak SCE frekansını özellikle 48 saatlik uygulamada negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde artırmıştır (Çizelge 3.12). Literatür ile paralel bir sonuç olarak [NiL](ClO₄)₂'in 24 ve 48 saatlik muamelede mitotik inhibisyon etkisi istatistiksel olarak anlamlıdır (Çizelge 3.17). Berilyumun CA sayısını artırdığı yönünde de kaynaklar mevcuttur [126].

Yapılan diğer bir çalışma da CBMN kinetokor boyama tekniği kullanılarak kadmiyum, krom ve nikel tuzlarının genotoksik etkileri araştırılması sonucu; CBMN tekniğinde kinetokor boyamanın klastojen ve anöjenler arasındaki ayrımı yapmak ve anöploidiyi indükleyen çevresel bileşiklerin tanımlanmasına izin

vermesi açısından önemli olduğu belirtilmiştir. Normal kromozom setinden ayrılan parçaların sentromer taşınması anöploidiye neden olurken, ayrılan parçaların sadece kromozom ve kromatid kırığı şeklinde olması ise klastojenik etkiye sebep olduğunu açıklamaktadır [127]. İnsan diploid fibroblastlarında yapılan çalışmada, tüm bileşiklerin MN sayısını artırdığı, nikelin zayıf mutajenitesinden dolayı düşük genotoksik etki yaptığı görülmüş ve metal tuzlarının anöploidiyi artırdığı gözlenmiştir [127]. Tez çalışmamızda $[\text{NiL}](\text{ClO}_4)_2$ ile yapılan testler sonucunda MN'da oldukça etkili olup genotoksik potansiyeli yüksektir (Çizelge 3.2). Kromozom aberasyonlarını artırıcı etkisi saptanmamış olup, SCE frekanslarında artışa sebep olmuştur (Çizelge 3.7 ve 3.12).

Nikel sülfat ve nikel karbonat hidroksitinin (NiCH) çözülebilir formları, nikel subsülfid, nikel oksit etkileri DNA tek iplik kırıklarını etkilediği ve artırdığı yönündedir. Genotoksitesileri ise en fazladan aza doğru NiCH, nikel oksit, nikel subsülfid, nikel sülfat şeklindedir [128].

Potasyum bromatın insan lenfositleri üzerine *in vitro* genotoksik etkisi SCE, MN ve CA ile 400, 450, 500, 550 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lik dozlarda araştırılmıştır. Sadece 48 saatlik muamele sonucunda SCE sıklığında artış gözlenirken, 24 ve 48 saatlik dozlarda CA artışının neredeyse mitomisin kadar etkili olduğu, 48 saatlik dozlarda MN sayısının da artış gösterdiği belirtilmiştir [129].

Mesleki kurşun maruziyetinin genetik hasara neden olması ile ilgili bir çalışmada, CBMN tekniği ile incelenen iki nükleuslu hücrelerde, kontrole göre MN sayısında dikkate değer bir artış gösterdiği belirtilmiştir. Kurşun bileşiklerinin kromozom bütünlüğünü bozarak, genotoksik etkili oldukları bulunmuştur. İnorganik kurşun tozlarının genotoksitesisi V79 hücrelerinde kurşun klorit ve kurşun asetat ile araştırılmış ve MN sayısının arttığı gözlenmiştir. Bu maddeler hem klastojenik hem de anöjenik etkili bulunmuştur [16]. Bu nedenle, kandaki kurşun seviyesinin de genetik hasar belirleme için iyi bir indikatör olduğu öne sürülmüştür [130].

Sözü edilen tüm bu çalışmalara rağmen, metallerin toksik etkileri ile ilgili daha fazla metabolik, *in vivo* ve *in vitro* çalışmaya, deneysel veriye ve teorik bilgiye ihtiyaç olduğu vurgulanmaktadır [5].

Bu tez çalışması da, antitümör ve antikanser ilaç etken maddesi olarak kullanılabileceği tasarlanan farklı metal kompleksi tuzlarının sahip olabileceği metal genotoksitesini araştırmayı amaçlamıştır.

Uygulanan sitogenetik yöntemlerden ilki olan CBMN tekniği ile yapılan deneysel araştırma verilerine göre:

[ZnL](ClO₄)₂ maddesinde 48 saatlik uygulamada doz artarken CPI ve MN değerleri azalmıştır. 1 µg/ml'lik en yüksek dozda CPI'nın en düşük değerde olması, hücre üzerindeki sitotoksik etkiyi göstermektedir. 0,25 µg/ml'lik en düşük dozun 48 saatlik uygulamasında ise, mikronükleus artışı nedeniyle genotoksik bir aktivite olduğu görülmüştür.

[NiL](ClO₄)₂ maddesinin, 24 saatlik uygulamasında, doz azalmasına bağlı yüksek bir mikronükleus artışı olmuştur. Şöyle ki, uygulanan en düşük doz (0,25 µg/ml) 24 saatlik süreçte, pozitif kontrolden daha fazla MN oluşumuna neden olarak etkili bir genotoksite göstermiştir. Buna karşın, 48 saatlik uygulamada doz artışına bağlı bir mikronükleus artışı olmuş ve MN sayısı 1µg/ml'lik dozda en yüksek değere ulaşmıştır. CPI değerleri ise her iki muamele sürecinde de düşme göstermiştir. Bu durum bize, [NiL](ClO₄)₂ test maddesinin 24 saatlik muamelede doz azalışına, 48 saatlik muamelede ise doz artışına bağlı olarak gelişen genotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

[CuL](ClO₄)₂ maddesinin 1 ve 0,50 µg/ml'lik dozlarının 24 saatlik uygulaması ile MN ve CPI değerleri birbirine ve pozitif kontrole yakın anlamlı sonuçlar vermiştir. 48 saatlik uygulamada ise MN sayısı dozdan bağımsız değişim gösterirken, CPI değerinin 1 µg/ml'lik dozda oldukça düştüğü dikkat çekmektedir. Mikronükleus sayısının dozdan bağımsız artışı ve hücre proliferasyonunun doz artışına bağlı olarak düşmesi, [CuL](ClO₄)₂ maddesinin CBMN testinde pozitif sonuçlar verdiği anlamını taşımaktadır.

[CdL](ClO₄)₂ maddesinin 24 saatlik uygulanması sonucunda yine doz azalmasına bağlı bir MN değeri artışı olmuş, fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ancak uygulamanın sitotoksite açısından hücre proliferasyonu üzerine çok etkili olmadığı söylenebilmektedir. 48 saatlik uygulamada her üç dozda da MN oluşumu kontrole göre anlamlı bir artış göstermiştir.

[CoL](ClO₄)₂ maddesi 48 saatlik uygulamada doz azalırken MN artışı gözlenmiştir. Ancak hücre üzerinde genotoksik olarak herhangi bir etkisi saptanmamıştır.

MN oluşma sıklığı ve CPI (hücre proliferasyon indeksi) verilerinin ANOVA programında istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucunda, test maddeleri CBMN tekniğinin saptadığı genotoksik aktivite açısından; [NiL](ClO₄)₂ = [ZnL](ClO₄)₂ > [CuL](ClO₄)₂ > [CdL](ClO₄)₂ > [CoL](ClO₄)₂ şeklinde sıralanabilmektedir.

Çalışmamızdaki kromozom aberasyonları değerlerine göre; 24 saatlik uygulamada [CuL](ClO₄)₂ maddesi hariç diğer test maddelerinde 0,25 µg/ml'lik en düşük dozlarda kromozom, kromatid kırıkları ve DS kromozomlarda kontrole göre anlamlı bir artış gözlenmiştir.

48 saatlik uygulamalarda ise, [ZnL](ClO₄)₂ maddesinin 1 µg/ml'lik en yüksek doz ile muamelesinde kromatid kırıkları artmıştır. [NiL](ClO₄)₂ maddesinde saptanan değerler, dozdan bağımsız değişim göstermektedir. [CuL](ClO₄)₂ maddesi için doz azaldıkça kromozom kırıklarının kontrole göre arttığı tespit edilmiştir. [CdL](ClO₄)₂ maddesinde doz azalmasına paralel olarak kromatid kırıkları kontrole göre anlamlı derecede artmıştır. [CoL](ClO₄)₂ maddesinde en düşük dozda kromatid kırıkları ve DS sayısında anlamlı artış gözlenmiştir.

Kromozom aberasyonu etkisine göre test maddelerinin etkisi şöyle özetlenebilir: [ZnL](ClO₄)₂ maddesi 1 µg/ml'lik yüksek dozda 48 saatlik uygulamada kontrole göre daha etkili bulunmuştur. [NiL](ClO₄)₂ maddesi doza bağlı olmayan bir etki göstermektedir. [CuL](ClO₄)₂, [CdL](ClO₄)₂, [CoL](ClO₄)₂ maddeleri ise 0,25 µg/ml'lik düşük dozda kontrole göre, aberasyonları artıran etkilere sahiptir.

Test maddelerinin kardeş kromatid değişimi üzerine etkileri için ise aşağıdaki saptamalar yapılmıştır:

[NiL](ClO₄)₂ maddesi hariç diğer test maddelerinde 24 saatlik uygulamada doza paralel bir değişim gösteren SCE sayıları içinde, [CuL](ClO₄)₂ maddesinin 1 µg/ml'lik en yüksek dozunda istatistiksel anlamlılık tespit edilmiştir. [NiL](ClO₄)₂ maddesinde doz ile ters orantılı bir SCE değişimi vardır. 48 saatlik uygulamalarda

tüm test maddelerinin tüm dozlarında Dunnet t testine göre yüksek anlamlılık bulunmuştur. $[ZnL](ClO_4)_2$, $[NiL](ClO_4)_2$ ve $[CoL](ClO_4)_2$ maddelerinin yüksek dozlarındaki SCE artışları anlamlı bulunmuştur. 48 saatlik uygulamada ise tüm maddelerin doza bağlı olarak SCE sayılarını artırdıkları saptanmıştır.

İkinci bölünmesini geçiren hücrelerin sayıca fazlalığı tespit edilmiş ve birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmelerini geçiren hücreler sayılarak replikasyon indeksi ve mitotik indeks saptanmıştır. Buna göre; $[ZnL](ClO_4)_2$ ve $[NiL](ClO_4)_2$ maddelerinin her üç dozunda da 24 ve 48 saatlik uygulamada MI değerlerindeki azalış kontrole göre anlamlı bulunmuştur. Bu durum maddelerin toksik etki ve mitotik inhibisyon etkisi gösterdiklerini belirtmektedir. Tüm maddelerin 48 saatlik uygulamalarında MI değerleri kontrole göre anlamlı bir düşüş göstermektedir.

Aynı liganda sahip metal tuzlarının genotoksik etkilerini araştırmayı hedefleyen bu çalışma sonucunda; test maddelerinin, her üç sitogenetik testte de insan lenfosit kromozomlarında oluşturduğu hasarlar bakımından, 24 saatlik ve 48 saatlik uygulamada, $p \leq 0,05$ ve $p \leq 0,01$ değerleri içinde bir anlamlılığa sahip oldukları görülmüştür. Bu durum, kısa bir maruziyette dahi, metal tuzlarının bazı dozlarının insan hücrelerinde genotoksik etkiye sahip olabileceği, MN, SCE ve CA frekansındaki artışın da bunun bir biyomarkırı olduğunu açıklamaktadır.

Ligandları aynı olan test maddelerinin doza bağlı ve dozdan bağımsız etki göstermeleri ligandın bağlı olduğu metal tuzlarının farklı olması; mitotik inhibisyon, genotoksisite ve hücre proliferasyonu üzerine etkilerinin farklı olmasına sebep olarak gösterilebilir.

Tüm test yöntemleri göz önüne alındığında, $[ZnL](ClO_4)_2$ maddesinin MN, CA, SCE, mitotik indeks üzerinde doza bağlı olarak 24 ve 48 saatlik uygulamada önemli ölçüde etkili olduğu söylenebilir.

$[NiL](ClO_4)_2$ maddesi ise çalışmadaki ikinci sırada önemli genotoksisiteye sahip test maddesidir. CA ve SCE'de doz ile ters orantılı artışlar göstermiştir.

$[CuL](ClO_4)_2$ maddesi, MN ve SCE üzerinde yüksek dozda etkili olurken, CA sayılarını düşük dozda daha fazla etkilemiştir. Mitotik inhibisyonu azaltıcı etkisi dozdan bağımsızdır.

[CoL](ClO₄)₂ ve [CdL](ClO₄)₂ maddeleri ise en az genotoksik etkiye sahip maddeler olarak saptanmıştır. MN üzerinde etkili olmadıkları, CA üzerinde düşük dozda etkili oldukları, SCE'de doza bağlı olarak kardeş kromatid değişimlerini artırdıkları ancak mitotik indeks ve replikasyon indeksi üzerinde diğer maddeler kadar genotoksik etkiye sahip olmadıkları görülmüştür.

Sitogenetik testlerin 48 saatlik uygulamasında, 24 saate göre daha anlamlı sonuçların elde edilmesi, bu test maddelerinin, aynı ya da farklı hücreler üzerinde, daha uzun süreli uygulamaların yapılabildiği, farklı *in vitro* ve *in vivo* testler ile sınılanması önerisini getirmemize olanak tanımaktadır. Bunun yanında, tez çalışmasında kullanılan yöntemlerde sağlıklı insan periferik lenfositleri üzerinde düşük genotoksik etkiye sahip oldukları belirlenen maddeler ile farklı kaynaklardan elde edilen kanserli hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerin belirlenmesi yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Decordier, I. ve Kirsch-Volders, M., “The in vitro micronucleus test: From past to future”, *Mutation research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **1**, 607, 2006.
- [2] Friedberg, E. C., Waliler, G.C.ve Siede, W., *Dna repair and mutagenesis*, ASM Pres., Washington., 1995.
- [3] Davila, J.C., Rodriguez, R.J., Melchert, R.B., Acosta, D Jr., “Predictive value of in vitro model systems in toxicology” *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **38**, 63-96, 1998.
- [4] Kent, C., *Basic of Toxicology*, John Wiley & Sons, Inc., USA, 229-286., 1998.
- [5] Bocco, B., *Animal test alternatives in metal toxicology research. A study by "in vitro" cellular systems*, Doktora tezi, Department De Genetica I Microbiologia, Universitat Autònoma De Barcelona, 2001.
- [6] Shama, A. S. K., Szeto, Y. T., Benzie, I. F. F. ve Tan-un, K. C., A “Preliminary Study of DNA Damage in Peripheral Lymphocytes from Lung Cancer Patients and Healthy Subjects”, *Turkish Journal of Medical Sciences*, **33**, 149-154, 2003.
- [7] El-Zein, R.A., Schabath, M.B., Etzel, C. J., Lopez, M. S., Franklin, J. D. ve Spitz, M. R., “Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay as a Novel Biomarker for Lung Cancer Risk”, *Cancer*, **66**, (12), 2006.
- [8] Depault, F., Cojocar, M., Fortin, F., Chakrabarti, S., Lemieux, N., “Genotoxic effects of chromium(VI) and cadmium(II) in human blood lymphocytes using the electron microscopy in situ end-labeling (EM-ISEL) assay” *Toxicology in Vitro*, **20**, 513-518, 2006.
- [9] Danadevi, K., Rozati. R., Saleha Banu, B. ve Grover , P., “Genotoxic evaluation of welders occupationally exposed to chromium and nickel using the comet and micronucleus assay” *Mutagenesis*, **19** (1), 35-41, 2004.
- [10] Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Descordier, I.ve Kirsch-Volders, M., “Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring”, *Biochimie*, **88** , 1515–1531., 2006.

- [11] Neri, M., Fucic, A., Knudsen, L. E., Lando, C. Merlo, F. ve Bonassi, S., “Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review, *Mutation Research*, **544**, 243–254, 2003.
- [12] Santos, M. F. M. A. , Ferrari, I. ve Luna, H., “Chromosomal aberration analysis in workers exposed to chemical and biological hazards in research laboratories”, *Environmental Research*, **97**, 330–334, 2005.
- [13] Migriole, M., Cocchi, L., Netsi, C. ve Sabbioni, E., “Micronuclei assay and FISH analysis in human lymphocytes treated with six metal salts” *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **34**, 279-284, 1999.
- [14] Marzano, C., Bettio, F., Baccichetti, F., Trevisan, A., Giovagnini, L, Fregona, D., “Antitumor activity of a new platinum(II) complex with low nephrotoxicity and genotoxicity” *Chemico-Biological Interactions*, **148**, 37-48, 2004
- [15] Rozgaj, R., Kašuba, V. ve Fučić, A., “Genotoxicity of cadmium chloride in human lymphocytes evaluated by the comet assay and cytogenetic tests” *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **16**, 187-192, 2002.
- [16] Bonacker, D., Stoiber, T., Böhm, K. J., Prots,I., Wang, M., Unger,E., Thier,R., Bolt, H.M., ve Degen, G.H., “Genotoxicity of inorganic lead salts and disturbance of microtubule Function”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **45**, 346-353, 2005.
- [17] Beynek, N., Uluçam, G., Seller, Z., Akalın, G., Turan, G., ve Benkli, K., “Synthesis, Characterization of Some Transition Metal Complexes of a New Heptadentate N₅S₂ Schiff Base Ligand and the Effects of These Metal Complexes on U2OS Cells Cytotoxicity and DNA Cleavage Activity”, *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, **183**, 2237 - 2247, 2008.
- [18] Sen, S. ve Kar, D. K., *Cytology and genetics*, Alpha Science International Ltd., Harrow, U.K., 2005.
- [19] Temizkan, G. O., *Genetik*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, sayı: 3805, Fen Fakültesi, **229**, İstanbul, 181 -228., 1994.
- [20] Başaran, N., *Tıbbi Genetik ders Kitabı*, Güneş&Nobel Tıp Kitabevi,1999.

- [21] Fairbanks, D. J. ve Andersen, W. R., *Genetics the continuity of life*, ITP company, USA., 1999.
- [22] Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C. ve Gelbart, W. M., *An introduction to genetic analysis*, W. H. Freeman and Company, New York, USA., 1996.
- [23] Sambamurty, A.V.S.S., *Genetics*, Alpha Science International Ltd., Harrow, U.K., 2005.
- [24] Pai, C.A., *Foundation of genetics: A science for society*, Kefford Pres, Singapur., 1985.
- [25] Russel, P. J., *Genetics*, The Benjamin- Cummings publishing company, Inc., Canada, USA., 1998.
- [26] Suzuki, D. T., Griffiths, A. J. F. ve Lewontin, R. C., *An introduction to genetic analysis*, W.H. Freeman and Company, San Francisco, 1981.
- [27] Coşkun, M., Coşkun, M., “Biyolojik dozimetri ve ilgili gelişmeler” *Cerrahpaşa J Med*, **34**, 207-218, 2003.
- [28] Savage, J.R.K., “An introduction to chromosomal aberrations”, *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*, 1999.
URL : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Deep/Chromaber.html>
- [29] Miglani, G. S., *Basic Genetics*, Narosa Publishing House, India, 341-382., 2000.
- [30] Iamarcovai, G., Bonassi, S., Botta, A., Baan, R.A. ve Orsie're, T., “Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature”, *Mutation Research*, **658**, 215-233., 2008.
- [31] Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B., *Moleküler Biyoloji*, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara., 2007.
- [32] Brown, T.A., *Genetics a molecular approach*, Chapman & Hall, London, 191 -213., 1992.
- [33] Kino, K. ve Sugiyama, H., “Possible cause of G·C→C·G transversion mutation by guanine oxidation product, imidazolone”, *Chemistry & Biology* , **8**, 369-378., 2001.
- [34] Bolsover, S.R., Hyams, J.S., Jones, S., Shephard, E.A. ve White, H.A., *From genes to cell*, Willey-Liss, Inc., New York, USA ,119-130., 1997.

- [35] Suzuki, D. ve Knudston, P., *Genethics the ethics of engineering life*, Stoddart Publishing Co. Limited, USA., 1990.
- [36] Sobol, Z., Engel, M. E., Rubitski, E., Ku, W. W., Aubrecht, J., Schiestl, R. H., “Genotoxicity profiles of common alkyl halides and esters with alkylating activity”, *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **633**, 80-94, 2007.
- [37] Ferguson, L. R. ve Denny, W. A., “Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators”, *Mutation Research*, **623** , 14–23., 2007.
- [38] Collins, J. E., Ellis, P. C., White, A. T., Booth, A. E. G., Moore, C. E., Burman, M., Rees, R. W., Lynch, A. M., “Evaluation of the Litron In Vitro MicroFlow® Kit for the flow cytometric enumeration of micronuclei (MN) in mammalian cells”, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **654**, 76-81, 2008.
- [39] Kirpnick, Z., Homiski, M., Rubitski, E., Repnevskaya, M., Howlett, N., Aubrecht, J., Schiestl, R. H., “Yeast DEL assay detects clastogens”, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **582**, 116-134, 2005.
- [40] Karabay, N. U. ve Oğuz, M. G., “Cytogenetic and genotoxic effects of the insecticides, imidacloprid and methamidophos”, *Genetics and Molecular Research*, **4** , 653-662, 2005.
- [41] Jacobson-Kram, D. ve Keller, K.A., “*Toxicology testing handbook principles, applications and data interpretation*”, Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 2001.
- [42] Gad, S.C., *In vitro Toxicology*, Second Edition, Taylor&Francis, New York-London, 94-128, 2000.
- [43] Canımoğlu, S. ve Rencüzoğulları, E., “The Cytogenetic effects of food sweetener maltitol in human peripheral lymphocytes”, *Drug and Chemical Toxicology*, **29**, 269–278, 2006.
- [44] Sarıkaya, R. ve Solak, K., “Benzoik Asit’in *Drosophila melanogaster*’de Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Genotoksitesinin Araştırılması”, *Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, **23**, 19-32, 2003.

- [45] Zhang, Z., Che,W., Liang, Y., Wu, M., Li, N., Shu, Y., Liu, F., Wu, D., “Comparison of cytotoxicity and genotoxicity induced by the extracts of methanol and gasoline engine exhausts”, *Toxicology in Vitro*, **21** ,1058–1065, 2007.
- [46] Munro, I. C., Williams, G.M., Heymann, H.O. ve Kroes, R., “Tooth whitening products and the risk of oral cancer”, *Food and Chemical Toxicology* , **44** , 301–315, 2006.
- [47] Başaran, A.A., “Farmakognozide tek hücre jel elektroforezi uygulamaları” *14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, Bildiriler, (Ed: K.H.C.Başer ve N.Kırimer), Ankara, 2002.
- [48] Guzman, A., de Henestrosa, A. R. F., Marin, A. P., Ho, A., Borroto, J. I. G., Carasa, I. ve Pritchard, L., “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, 2007.
- [49] Snyder, R. D. ve Gren, J. W., “A review, genotoxicity of marketed pharmaceuticals”, *Mutation Research, Reviews in Mutaion Research*, **488**, 151-169, 2001.
- [50] Guengerich, F.P., “Cytochrome P450s and Other Enzymes in Drug Metabolism and Toxicity”, *The AAPS Journal*, **8**, 101-111, 2006.
- [51] Fenech, M., Crott, W.J., “Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes—evidence for breakage–fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay” *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **504**, 131- 136, 2002.
- [52] Fenech, M., “The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to the genotoxicity studies in human populations”, *Environmental Health Perspectives Supplements*, **101**, **3**, 101-107, 1993.
- [53] Yüzbaşıoğlu, D.,Ünal, F., Yılmaz, S., Aksoy, H. ve Çelik, M. , “Genotoxicity testing of fluconazole in vivo and in vitro”, *Mutation Research*, **649**, 155–160,2008.

- [54] Aydemir, N., Çelikler, S. ve Bilaloğlu, R. , “ In vitro genotoxic effects of the anticancer drug gemcitabine in human lymphocytes”, *Mutation Research*, **582** , 35–41,2005.
- [55] Barile, F.A., *Introduction to in vitro cytotoxicology mechanisms and methods*, CRC Pres., USA, 150-153, 1994.
- [56] Ergene, S., Çelik, A., Çavaş, T. ve Kaya, F., “Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: Micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges” , *Environment International*, **33** , 877–885, 2007.
- [57] Gosden, C.M., Davidson, C., Robertson, M., “Lymphocyte culture”, *Human Cytogenetics A Practical Approach: Constitutional Analysis, Vol 1* (Ed: Rooney, D. E., Czepulkowski, B.H.), Oxford University Press, New York, A.B.D., 30 – 54, 1992.
- [58] Güven, K., *Biyokimyasal ve Moleküler Toksikoloji*, Dicle Üniversitesi Basımevi, Diyarbakır, 1999.
- [59] Ulupınar, M., Okumuş, M. ve Okumuş, İ., “Detection of Mutagenic-Carcinogenic Pollutants in Aquatic Systems Using Cytogenetic Methods in Fish”, *Turkish Journal of Zoology*, **26**, 141-148, 2002.
- [60] Ayaz Tüylü, B., *Bazı ilaç öncül maddelerinin mutajenik etkilerinin bakteriyal ve hücre kültürü testleriyle araştırılması*, Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2001.
- [61] Kirkland, D.J., *Basic mutagenicity tests ukems recommended procedures*, Cambridge university Pres., New York, USA, 1990.
- [62] Çelik, A. ve Ateş, N.A., “The frequency of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocyte treated with metronidazole in vitro”, *Drug and Chemical toxicology*, **29**, 85 -94, 2006.
- [63] Norppa, H., Falck, M.ve Ghita, C., “What Do Human Micronuclei Contain?”, *Mutagenesis*, **18**, 221–233, 2003.
- [64] Fenech, M., “The in vitro micro nucleus technique”, *Mutation Research*, **455**, 81–95, 2000.

- [65] Dörter, G., Güçlü, İ., Dalcı, D., Köksal, E.M., “Mikronükleus analiz yöntemi ile uranyum ve zayıflatılmış uranyum’un biyolojik etkilerinin araştırılması”, *Çekmece Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi*, 2003.
- [66] Fenech, M., “Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis blocked lymphocytes a biomarker for DNA damage in human populations”. *Mutation Research*, **404**, 155 -165, 1998.
- [67] Fenech, M., “Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology”. *Toxicology*, **181 -182**, 411 -416, 2002.
- [68] Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Ardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A., “Report from the in vitro micronucleus assay working group”, *Mutation Research*, **540**, 153–163, 2003.
- [69] Demirel, S. ve Zamani, A.G., “Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları”, *Genel Tıp Dergisi* **12 (3)**, 123 -127, 2002.
- [70] Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E.; Human Micronucleus project. “HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures” *Mutation Research*, **534 (1-2)**, 65-75, 2003.
- [71] Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E., Bonassi, E., “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, 1999.
- [72] Tawn, E. J., Holdsworth, D., “Mitogen-induced chromosome damage in human lymphocytes”, *Human Cytogenetics A Practical Approach: Constitutional Analysis, Vol 1* (Ed: Rooney, D. E., Czepulkowski, B.H.), Oxford University Press, New York, A.B.D., 91 – 118, 1992.
- [73] Benn, P.A., Perle, M.A. “Chromosome staining and banding techniques”, *Human Cytogenetics A Practical Approach: Constitutional Analysis, Vol 1* (Ed: Rooney, D. E., Czepulkowski, B.H.), Oxford University Press, New York, A.B.D., 91 – 118, 1992.

- [74] Fenech M., Bonassi S., Turner J., et al. "HUman MicroNucleus project. 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" *Mutation Research*, **534**, 45–64, 2003.
- [75] Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C. ve Sasaki, Y. F., "Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing", *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **35**, 206-221, 2000.
- [76] Collins, A. R., Dobson, V.L., Dusinska, M., Kennedy, G. ve Stetina, R., "The comet assay: what can it really tell us?", *Mutation Research*, **375**, 183–193, 1997.
- [77] Collins, A. R., Dusinska, M. ve Horska, A., "Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay", *Acta Biocihimica Polonica*, **48**, 611-614, 2001.
- [78] Lu, F.C. ve Kacew, S., *Lu's Basic Toxicology*, Taylor&Francis, 2002.
- [79] Woolley, A., *A guide to practical toxicology evaluation, prediction and risk*, Taylor&Francis, London, 2003.
- [80] Rothfuss, A., Steger-Hartman, T., Heinrich, N. ve Wichard, J., "Computational Prediction of the Chromosome-Damaging Potential of Chemicals", *Chemical Research in Toxicology*, **19**, 1313-1319, 2006.
- [81] De Boeck, M., Lison, D., ve Kirsch-Volders, M., "Evaluation of the in vitro direct and indirect genotoxic effects of cobalt compounds using the alkaline comet assay. Influence of interdonor and interexperimental variability" *Carcinogenesis*, **19**, **11**, 2021-2029, 1998.
- [82] Henderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bourner, C.ve Windebank, S., "The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins", *Mutagenesis*, **13**, 89-94, 1998.
- [83] 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., "IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic

- effects of carcinogens in humans”, *Mutation Research*, **463**, 111–172, 2000.
- [84] Güley, M., Vural, N., *Toksikoloji*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, **48**, Ankara Üniversitesi, 1978.
- [85] Soriano, C., Creus, A. ve Marcos, R., “Gene-mutation induction by arsenic compounds in the mouse lymphoma assay”, *Mutation Research*, **634**, 40–50, 2007.
- [86] Clements, J., “The Mouse Lymphoma Assay”, *Mutation Research*, **455**, 97–110, 2000.
- [87] Dougherty, T. J. ve Projan, S. J., *Microbial genomics and drug discovery*, Marcel Dekker, Inc., USA, 2003.
- [88] Nohmi, T., Suzuki, T. ve Masumura, K., “Recent advances in the protocols of transgenic mouse mutation assays” , *Mutation Research*, **455**, 191–215, 2000.
- [89] Wei, J., Yezheng, L., Zhijian, C., Shijie, C., Meibian, Z., Lifen, Z., Jianlin, J., Jiliang, H., “Studing the genotoxicity of vincristine on human lymphocytes using comet assay, micronucleus assay and TCR gene mutation test in vitco”, *Toxicology*, **252**, 113-117, 2008.
- [90] Siddique, Y. H., Ara, G., Beg, T., Afzal, M., “Genotoxic potential of medroxyprogesterone acetate in cultured human peripheral blood lymphocytes” *Life Sciences*, **80**, 212-218, 2006.
- [91] Varga, D., Johannes, T., Jainta, S, Schuster, S., Schwarz-Boeger, U., Kiechle, M., Garcia, B. P. ve Vogel, V., “An automated scoring procedure for the micronucleus test by image analysis” *Mutagenesis*, **19**, **5**, 391-397, 2004.
- [92] Rossi, D., Aiello, V., Mazzoni, L., Sensi, A. ve Calzolari, E., “In vitro short-term test evaluation of catecholestrogens genotoxicity”, *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, **105**, 98–105, 2007.
- [93] Anderson, R. M., Stevens, D. L., Goodhead, D. T., “M-FISH analysis shows that complex chromosome aberrations induced by α -particle tracks are cumulative products of localized rearrangements” *PNAS*, **99**, **19**, 12167-12172, 2002.

- [94] Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., ve ark., “An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans” *Carcinogenesis* Advance Access published September 14, 2006.
- [95] Stanimirovic, Z., Stevanovic, J., Jovanovic, S., Andjelkovic, V., “Evaluation of genotoxic effects of Apitol (cymiazole hydrochloride) in vitro by measurement of sister chromatid exchange”, *Mutation Research*, **588**, 152-157, 2005.
- [96] Abou-Eisha, A., Marcosb, R., Creusb, A., “Genotoxicity studies on the antimicrobial drug sulfamethoxazole in cultured human lymphocytes”, *Mutation Research*, **564**, 51-56, 2004.
- [97] Noel, S., Kasinathan, M., Kumar Rath, S., “Evaluation of apigenin using in vitro cytochalasin blocked micronucleus assay” *Toxicology in Vitro*, **20**, 1168-1172, 2006.
- [98] Abou-Eisha, A., “Evaluation of cytogenetic and DNA damage induced by the antibacterial drug, trimethoprim” *Toxicology in Vitro*, **20**, 601-607, 2006.
- [99] Akbaş, E. ve Budak, T., “Sigara İçen Radyoloji Teknisyenlerinde Trimethoprimin Kromozomal Düzensizlikler Üzerine Etkileri”, *Turkish Journal of Biology*, **22**, 99-109, 1998.
- [100] Abou-Eisha, A. ve Afifi, M., “Genotoxic evaluation of the antimicrobial drug, trimethoprim, in cultured human lymphocytes”, *Mutation Research, Cell Biology and Toxicology*, **440**, 157-162, 1999.
- [101] Lopez Nigro, M. M., Gadano, A. B., Carballo, M. A., “Evaluation of genetic damage induced by a nitroimidazole derivative in human lymphocytes: Tinidazole (TNZ)” *Toxicology in Vitro*, **15**, 209-213, 2001.
- [102] Altıntaş, N., Örenay, S., Aşçı, M., Reyhan, E., Türk, M., Yolasığmaz, A. ve Altıntaş, N., “Karaciğer Kist Hidatiği Tedavisinde Albendazol Kullanan Hastalarda Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Çalışması”, *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, **4**, 235-237, 2005.
- [103] Maffei, F., Carbone, F., Angelini, S., Forti, G.C., Norppa, H. ve Hrellia, P., “Micronuclei frequency induced by bleomycin in human peripheral

- lymphocytes: Correlating blhx polymorphism with mutagen sensitivity”, *Mutation Research*, **639**, 20–26, 2008.
- [104] Dhawan, A., Kayani, M.A., Parry, J. M., Parry, E. ve Anderson, D, “Aneugenic and clastogenic effects of doxorubicin in human lymphocytes”, *Mutagenesis*, **18**, 487-490, 2003.
- [105] Abou-Eisha, A. ve Afifi, M., “Genotoxic evaluation of the antimalarial drug, fansidar, in cultured human lymphocytes”, *Cell Biology and Toxicology*, **20**, 303 -311, 2004.
- [106] Boyacıoğlu, M., “İzmir körfezi sedimentlerinde direkt mutajenlerin belirlenmesi”, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, **21**,(1 -2), 23 -27., 2004.
- [107] Krumic, A., Haveric, S. ve Ibrulj, S., “Micronuclei frequencies in peripheral blood lymphocytes of individuals exposed to depleted uranium” , *Arh Hig Rada Toksikol* , **56**, 227-232, 2005.
- [108] Ocak, A., Çiçek, A., Zeytinoğlu, H. ve Mercangöz, A., “Porsuk Çayı Suyunun Bazı Tarım Bitkileri Üzerindeki Ekotoksikolojik Etkileri”, *ÇEV-KOR*, **11**, 9-13, 2002.
- [109] Kirsch-Volders, M., Fenech, M., “Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes” *Mutagenesis*, **16**, **1**, 51-58, 2001.
- [110] Rosefort, C., Fauth, E.ve Zankl, H., “Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay”, *Mutagenesis*, **19**, 277-284, 2004.
- [111] Patino-Garcia, B., Hoegel, J., Varga D., et al. “Scoring variability of micronuclei in binucleated human lymphocytes in a case-control study” *Mutagenesis*, **21**, **3**, 191-197, 2006.
- [112] Gupta, R.C., Earley, K., Sharma, S., “Use of peripheral human lymphocytes to measure DNA binding capacity of chemical carcinogens” *PNAS*, **85**, 3513-3517, 1988.
- [113] Maccarati, A., Soucek, P., Stetina, R., Haufroid, V., Kumar, R., Vodickova, L., Trtkova, K., Dusinka, M., Hemminki, K., Vodicka, P., “Genetic

- polimorphisms and possible gene-gene interactions in metabolic and DNA repair genes: Effects on DNA damage” *Mutation Research*, **593**, 22-31, 2006.
- [114] Norppa, H., “Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms”, *Toxicology Letters*, **149**, 309–334, 2004.
- [115] Korkmaz, M. ve Çolak, A., “N-Nitrosopirolidin (NPYR)’in Farelerde Sitogenetik Etkileri”, *Turkish Journal of Biology*, **24**, 1-12, 2000.
- [116] Hoshi, M., Morimura, K., Wanibuchi, H., Wei, M., Okochi, E., Ushijima, T., Takaoka, K. ve Fukushima, S., “No-observed Effect Levels for Carcinogenicity and for in vivo Mutagenicity of a Genotoxic Carcinogen”, *Toxicological Sciences*, **81**, 273–279, 2004.
- [117] Akay, C., “Biyomarkörlerin Toksikolojide Kullanımı”, *Gülhane Tıp Dergisi*, **46**, **1**, 73-83, 2004.
- [118] Bonassi, S., Ugolini, D., Kirsch-Volders, M., Strömberg, U., Vermeulen, R. ve Tucker, J.D., “Human Population Studies With Cytogenetic Biomarkers: Review of the Literature and Future Perspectives”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **45**, 258-270, 2005.
- [119] Kulaksız, G. ve Sancar, A., “Nükleotid Eksizyon Onarımı ve Kanseri”, *Türk Biyokimya Dergisi*, **3**, 104 -111, 2007.
- [120] U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry <http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html>
- [121] Franke, R. I. S., Prá, D., Giulian, R., “Influence of orange juice in the levels and in the genotoxicity of iron and copper” *Food and Chemical Toxicology*, **44**, 425-435, 2006.
- [122] Kašuba, V., Rozgaj, R., “Micronucleus distribution in human peripheral blood lymphocytes treated in vitro with cadmium chloride in G₀ and S phase of the cell cycle” *Chemosphere*, **49**, 91-95, 2002.
- [123] Şaplakoğlu, U., İşcan, M., “Sister chromatid exchanges in human lymphocytes treated in vitro with cadmium in G₀ and S phase of their cell cycles” *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **412**, 109-114, 1998.

- [124] Dayangaç, A., Yılmaz, M., Konar, V., Yılmaz, Ö., “Sıçanların bazı dokularındaki yağ asidi kompozisyonuna kadmiyumun etkileri”, *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları*, 2006.
- [125] W. Au, W., Heo, M. ve Chiewchanwit, T., “Toxicological interactions between nickel and radiation on chromosome damage and repair” *Environmental Health Perspectives*, **102**, **9**, 73-77, 1994.
- [126] Gordon, T., Bowser, D., “Berillium: genotoxicity and carcinogenicity”, *Mutation Research*, **533**, 99-105, 2003.
- [127] Seoane, A. I., Dulout, F. N., “Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay” *Mutation Research*, **490**, 99-106, 2001.
- [128] M’Bemba-Meka, P., Lemieux, N., Chakrabarti, S. K., “Nickel compound-induced DNA single-strand breaks in chromosomal and nuclear chromatin in human blood lymphocytes in vitro: Role of oxidative stress and intracellular calcium” *Mutation Research*, **582**, 124-137, 2005.
- [129] Kaya, F. F. ve Topaktaş, M., “Genotoxic effects of potassium bromate on human peripheral lymphocytes in vitro”, *Mutation Research*, **26**, 48–52, 2007.
- [130] Vaglenov, A., Creus, A., Laltchev, S., Petkova, V., Pavlova, S. e Marcos, R., “Occupational Exposure to Lead and Induction of Genetic Damage”, *Environmental Health Perspective*, **109**, 295–298, 2001.