

**BAZI GIDA
KATKI MADDELERİNİN
GENOTOKSİK ETKİLERİNİN
CBMN YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Filiz Boğar
Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Şubat, 2012



JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Filiz Boğar'ın "**Bazı gıda katkı maddelerinin genotoksik etkilerinin CBMN yöntemi ile araştırılması**" başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki Yüksek Lisans tezi 27/10/2011 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	: Yar. Doç. Dr. Emel ERGENE
Üye	: Yar. Doç. Dr. Rana ASLAN

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

Enstitü Müdürü

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

**BAZI GIDA KATKI MADDELERİNİN GENOTOKSİK
ETKİLERİNİN CBMN YÖNTEMİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

FİLİZ BOĞAR

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Berrin TÜYLÜ
2012, 75 sayfa

Bu tez çalışmasında gıda katkı maddeleri olan asetik asit, benzoik asit, sitrik asit ve sorbik asitin genotoksik etkileri, insan periferal kan lenfositlerinde *in vitro* Sitokinez Bloklama Mikronukleus (CBMN) tekniği ile araştırılmıştır. Periferal kan örnekleri, sağlıklı sigara içmeyen iki bireyden elde edilmiştir. Lenfosit kültürleri askorbik asit, benzoik asit, sitrik asit ve sorbik asitin 1000, 500, 250 ve 100 µg/ml lik dozlarla, 24 ve 48 saatlik sürelerde muamele edilmiştir. Preparasyonu yapılan lenfosit hücrelerinde test maddelerinin neden olduğu mikronükleus, nükleer tomurcuk ve nükleer köprü oluşumları incelenmiştir ve CPI değerleri hesaplanmıştır.

CBMN testinden elde edilen sonuçlara göre; Benzoik asit ve sitrik asitin 1000 µg/ml lik dozu ve sorbik asitin 1000 ve 500 µg/ml lik dozu toksik etkiye sahiptir. Askorbik asit, benzoik asit, sitrik asit ve sorbik asit' in diğer dozlarında toksik ve genotoksik etki gözlenmemiştir. Tüm test maddelerinin CPI değerlerinde negatif kontrole göre azalma gözlenmiştir. Ayrıca nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü oluşum değerleri negatif kontrole yakın olup, uygulanan test maddelerinin bu oluşumlara sebep olmadığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Askorbik asit, Benzoik asit, Sitrik asit, Sorbik asit,
Genotoksisite, CBMN

ABSTRACT
Master of Science Thesis

**THE GENOTOXIC EFFECTS OF SOME FOOD ADDITIVES HAVE
BEEN DETERMINED WITH CBMN TECHNIQUE**

FİLİZ BOĞAR

**Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program**

**Supervisor: Associate Prof.Dr. Berrin TÜYLÜ
2012, 75 pages**

In this thesis study, the genotoxic effects of ascorbic acid, benzoic acid, citric acid and sorbic acid has been searched *in vitro* with CBMN technique in human peripheral blood lymphocyte. Peripheral blood samples have been obtained from two-healthy, non-smoking individuals. Lymphocyte cultures have been treated in 24 and 48 hours period with 1000, 500, 250 and 100 µg/ml material doses of ascorbic acid, benzoic acid, citric acid and sorbic acid. Nuclear proliferation and nuclear bridge formations, micronucleus which were caused by test materials in lymphocyte cells of which preparation was made, have been analyzed and CPI values have been calculated.

According to the results that have been obtained from CBMN, doses of 1000 benzoic acid and citric acid and 1000 and 500 doses of sorbic acid are of toxic effect. In other doses of ascorbic acid, benzoic acid, citric acid and sorbic acid have been observed no toxic and genotoxic effect. There has been a reduction in CPI values of all test materials compared to the negative control. Also, it has been reached to inference that nuclear proliferation and nucleoplasmic bridge formation values are close to the negative control and test materials which have been applied, didn't cause these formations.

Keywords: Ascorbic acid, Benzoic acid, Citric acid, Sorbic acid, Genotoxicity,
CBMN

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve çalışmalarım boyunca ilgi ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Berrin TÜYLÜ' ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans süresince dersime girmiş veya girmemiş Anadolu Üniversitesi, Biyoloji bölümü hocalarıma çok teşekkür ederim.

Deney çalışmalarımın donör olan arkadaşlarıma ve deneysel çalışmalarımın katkılarından dolayı Devrim GÜZEL' e teşekkür ederim.

Ayrıca; her zaman yanımda olan, benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen canım annem Cemile BOĞAR ve canım babam Mevlüt BOĞAR' a, manevi destekleriyle sürekli yanımda olan ablam Yurdağül ve kardeşlerim Eşref ve Merve BOĞAR' a sonsuz teşekkür ederim.

Filiz BOĞAR

Şubat, 2012

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Mutasyonlar	3
1.1.1. Kromozom mutasyonları	4
1.1.1.1. Yapısal mutasyonlar	5
1.1.1.2. Sayısal mutasyonlar	9
1.1.2. Gen mutasyonları	11
1.2. Genotoksik etkili ajanlar	13
1.2.1. Fiziksel mutajenler	13
1.2.1.1. İyonize radyasyon	13
1.2.1.2. İyonize olmayan radyasyon	14
1.2.2. Kimyasal mutajenler	14
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	18
1.2.2.6. Klastojenik ajanlar	18
1.2.2.7. Metabolik aktivasyon ile aktive olan ajanlar	19
1.3. Genotoksisite Testleri	20
1.3.1. Bakteriyal yöntemler	21
1.3.1.1. Ames (salmonella/mikrozom) testi	22
1.3.1.2. SOS (umu) testi	23



1.3.1.3. E.coli lac I mutasyon test sistemi	23
1.3.2. Sitogenetik yöntemler	23
1.3.2.1. Yapısal kromozom bozulma (CA) testi.....	24
1.3.2.2. Kardeş kromatid değişimi (SCE) testi.....	25
1.3.2.3. Mikronükleus (MN) testi	25
1.3.3. DNA' daki hasarı saptayan diğer yöntemler	29
1.3.3.1. Comet (single cell gel electrophoresis) testi	31
1.3.3.2. Mouse lymphoma testi	32
1.3.3.3. HPRT gen mutasyon testi	33
1.3.3.4. Muta mouse / Big blue yöntemi	33
2. MATERYAL VE METOD	34
2.1. Materyal	34
2.1.1. Test maddeleri	34
2.1.2. Test maddelerinin genel kimyasal formülleri	34
2.1.3. Test maddelerinin dozları ve hazırlanışı	36
2.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler.....	37
2.2. Metod	37
2.2.1. Lenfosit kültürü	36
2.2.2. Test maddelerinin uygulanması	37
2.2.3. Lenfositlerin izolasyonu	38
2.2.4. Preparatların hazırlanması	38
2.2.5. Preparatların boyanması	39
2.3. İstatistiksel Analiz	39
2.4. CPI'nın (Hücre Proliferasyon İndeksi) Saptanması	39
3. BULGULAR	40
4.TARTIŞMA SONUÇ	57
KAYNAKLAR	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

1.1. Delesyon.....	6
1.2. İnversiyon.....	7
1.3. Duplikasyon.....	8
1.4. Translakasyon.....	8
1.5. Sitokine baskılanmış mikronukleus yöntemi (<i>cytokinesis block</i> <i>micronucleu: CBMN assay</i>) sitokalazin B ekleme zamanı	28
2.1. Askorbik asit yapısal formülü.....	34
2.2. Benzoik asit yapısal formülü.....	35
2.3. Sitrik asit yapısal formülü.....	35
2.4. Sorbik asit yapısal formülü.....	36
3. 1. Askorbik asit ile muamele edilmiş (24 saat) insan lenfositlerinde oluşan tek, üç ve dört çekirdekli hücreler x400.....	50
3.2. Sitrik asit ile muamele edilmiş (48 saat) insan lenfositlerinde oluşan genel görünüm (Tek, çift ve çok çekirdekli hücreler) x400.....	50
3.3. Benzoik asit ile muamele edilmiş (48 saat) insan lenfositlerinde bir mikronükleuslu binükleat hücre x1000.....	51
3.4. Sorbik asit ile muamele edilmiş (24 saat) insan lenfositlerinde bir mikronükleuslu binükleat hücre x1000.....	51
3.5. Benzoik asit ile muamele edilmiş (24 saat) insan lenfositlerinde bir mikronükleuslu binükleat hücre x1000.....	52
3.6. Distile su ile muamele edilmiş (24 saat) insan lenfositlerinde bir mikronükleuslu binükleat hücre x1000	52
3.7. Mitomycin-C (MMC) ile muamele edilmiş (48 saat) insan lenfositlerinde altı mikronükleuslu binükleat hücre x1000	53
3.8. DMSO ile muamele edilmiş (24 saat) insan lenfositlerinde bir mikronükleuslu binükleat hücre x1000	53
3.9. Sorbik asit ile muamele edilmiş (24 saat) insan lenfositlerinde nükleer tomurcuklanma (NBUD: nuclear budding) oluşumu x1000.....	54

3.10. Sitrik asit ile muamele edilmiş (24 saat) insan lenfositlerinde nükleer tomurcuklanma (NBUD: nuclear budding) oluşumu x1000	54
3.11. Sitrik asit ile muamele edilmiş (24 saat) insan lenfositlerinde nükleoplazmik köprü oluşumu x1000.....	55
3.12. Sitrik asit ile muamele edilmiş (24 saat) insan lenfositlerinde nükleoplazmik köprü oluşumu x1000	55
3.13. Mitomycin-C (MMC) ile muamele edilmiş (24 saat) insan lenfositlerinde Nükleer tomurcuklanma (NBUD: nuclear budding) ve Nükleoplazmik köprülerin (nucleoplasmic bridges; NPB) görünüşü x400.....	56
3.14. Askorbik asit ile muamele edilmiş (48 saat) insan lenfositlerinde oluşan genel görünüm (Tek, çift ve çok çekirdekli hücreler) x400.....	56

ÇİZELGELER DİZİNİ**Sayfa**

3. 1. Askorbik asit' in CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN frekansı ve CPI sonuçları.....	42
3. 2. Benzoik asit' in CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN frekansı ve CPI sonuçları.....	43
3. 3. Sitrik asit ' in CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN frekansı ve CPI sonuçları.....	44
3. 4 . Sorbik asit ' in CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN frekansı ve CPI sonuçları.....	45
3. 5. Askorbik asit' in 24 ve 48 saatlik NBUD ve NPB sonuçları.....	46
3. 6. Benzoik asit' in 24 ve 48 saatlik NBUD ve NPB sonuçları.....	47
3. 7. Sitrik asit' in 24 ve 48 saatlik NBUD ve NPB sonuçları.....	48
3. 8. Sorbik asit' in 24 ve 48 saatlik NBUD ve NPB sonuçları.....	49

KISALTMALAR DİZİNİ

Bn : Binüklead hücre

CA : Kromozom aberasyonu

Cyt-B : Sitokalsin B

MMC : Mitomisin C

MN : Mikronükleus

SCE : Kardeş kromatid değişimi

CPI: Hücre proliferasyon indeksi

1.GİRİŞ

Tüketime sunulan veya sunulacak olan gıdaların görünüm ve lezzetlerini tüketicinin arzu ettiği duruma getirmek, bozulmalarını önleyerek raf ömrünü uzatmak amacıyla, tüketime sunulmadan önce bilinçli ve amaçlı olarak gıdalara ilave edilen maddelere “gıda katkı maddeleri” denilmektedir. Gıda katkı maddeleri, gıdalarda mikrobiyolojik bozulmayı önleme ve dayanıklılığı artırma, besleyici değeri koruma, teknolojik işlemlere yardımcı olma, renk, görünüş, lezzet, koku gibi duyuşal özellikleri düzeltme gibi pek çok amaçla kullanılan maddelerdir (Altuğ, 1999).

Çeşitli gıda katkı maddeleri; antimikrobiyal ve antioksidanlar, asitliğı düzenleyiciler, boyalar, emülgatörler, stabilizatörler, gamlar, yapay tatlandırıcılar, emülsifiye edici tuzlar ve lezzet artırıcılar olarak sınıflandırılmaktadır (Altuğ, 1999).

Gıda katkı maddelerinin kullanımındaki tarihsel sürece bakıldığında; M.Ö. 3000 yıllarında et ürünlerini kürelemede tuzdan yararlanıldığı, M.Ö. 900 yıllarında ise tuz ve odun tütsüsünün gıda saklama yöntemleri olarak kullanıldıkları görülmektedir. Ortaçağlarda etlere koruyucu amaçla tuz ve tütsünün yanısıra katılan nitratin etin rengini olumlu yönde değıştirmek ve bozulmayı önlemek amacıyla da kullanıldığı bilinmektedir. M.Ö. 50’li yıllarda baharatlardan lezzet verici olarak yararlanmış, gıda boyaları ise günümüzden yaklaşık 3500 yıl kadar önce Mısırlılar tarafından renklendirici olarak kullanılmışlardır. 19. yüzyıldaki hızlı şehirleşmenin paralelinde katkı maddelerinin kullanımında da artış başlamıştır. Gıda katkı maddelerinin dünyadaki pazarı 1900’ lü yıllarda 10 milyar dolara ulaşmış olup, 21. yüzyılda bu pazarın daha da büyümesi beklenmektedir (Altuğ, 1999).

İnsanların toplu halde yaşamaya başlamaları ile birlikte gıdaların korunması amacıyla güvenilir yöntemlerin kullanılması gereksinimi ortaya çıkmıştır. Tarımsal uygulamalardaki değışiklikler, dayanıksız gıdaların diyetle fazlaca yer alması, gelişmiş dağıtım sistemlerindeki kontaminasyon olasılığının artması, kolay ve pratik gıdalara yönelme gibi nedenler gıdaları koruma tekniklerinin gelişmesini zorunlu kılmıştır. Endüstride kullanılan koruma yöntemlerinin başlıcaları ısıtma, dondurma, kurutma ve ışınlamadır. Ancak bunların

uygulanamadığı ya da yetersiz kaldığı durumlarda gıdalara koruyucu madde katılımı söz konusu olmaktadır. Koruyucu maddeler, gıdayı mikroorganizmaların sebep olduğu bozulmalara karşı koruyarak, gıdanın raf ömrünü uzatan kimyasal maddeler olarak tanımlanmaktadır. Tuz, şeker ve sirke yüzyıllar boyunca gıdalardaki mikrobiyal bozulmaları önlemek amacıyla kullanılan maddeler olmakla birlikte, günümüzde katkı maddesi olarak nitelendirilmemektedirler (Altuğ, 1999).

Koruyucuların antimikrobiyal özellikleri; maddenin antimikrobiyal spektrumu, kimyasal ve fiziksel özellikleri, konsantrasyonu, etki şekli, gıdanın bileşimi, işlem şartları, pH'sı ve depolama sıcaklığı gibi faktörlere bağlıdır. Kimyasal koruyucular mikroorganizmaları birçok mekanizma ile etkilemektedir. Bunlar; proteinlerin denatürasyonu, enzimlerin inhibisyonu, DNA'nın, hücre çeperinin ya da sitoplazmik membranın tahrip edilmesi veya değiştirilmesi, hücre duvarı sentezinin baskılanması ya da esansiyel metabolitlerle rekabet şeklinde olabilmektedir (Altuğ ve Elmacı, 2001).

Koruyucular meyve-sebze, et ve et ürünlerinde, süt ve süt ürünlerinde, margarinlerde, hububat ürünlerinde ve alkollü içecekler gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Bu alanlardan meyve sebze teknolojisi, reçel ve marmelat üretiminden kurutulmuş meyve sebze üretimine uzanan geniş bir uygulama alanını kapsamakta olup, kullanılan koruyucular da geniş spektrum göstermektedirler. Taze meyvelerin korunmasında kullanılan fungusitler, meyvelerin çürümesini engellemek amacıyla, genellikle ambalaj materyallerine uygulanarak kullanılmaktadır (Altuğ ve Elmacı, 2001).

Son 30 yıldır gelişmiş ülkeler başta olmak üzere, yiyecek maddelerinde kullanılan katkı maddelerinde tam bir patlama olmuştur. Örneğin sadece İngiltere' de bir yıl içinde kullanılan katkı maddelerinin iki yüz bin tonu geçtiği sanılmaktadır (Altuğ, 1999).

Gıda katkı maddeleri; tavsiye edilen dozlardan daha yüksek miktarlarda kullanıldıklarında toksik etki oluşturmaları söz konusu olabilmektedir (Altuğ, 1999). Günümüzde birçok gıda katkı maddesinin çeşitli test sistemleriyle mutajen oldukları hatta bazılarının kanser oluşumuna da sebep oldukları bildirilmiştir (Munzer ve ark., 1990; Akın ve Sümer, 1991; Chlopkiwicz ve ark., 1995; Matsui ve ark., 1996; Mukherjee ve Chakrabarti, 1997; Rencüzogulları ve ark., 2001a; Rencüzogulları ve ark., 2001b; Sasaki ve ark., 2002).

Gıda katkı maddelerin pek çok amaçla yaygın olarak kullanılmaları nedeniyle bunların insan genomunda mutasyonlara sebep olup olmadıklarının ortaya çıkarılması da son derece önemlidir. Bir kimyasal maddenin böyle bir etkisinin olup olmadığının belirlenmesi, çeşitli genotoksisite testleri ile mümkün olabilmektedir. Bunlar içinde, kardeş kromatid değişimi (Sister Chromatid Exchange=SCE), kromozom aberasyonu (Chromosome Aberration=CA) ve mikronükleus (MN) testleri yaygın olarak kullanılan sitogenetik yöntemlerdir.

Bilinen mutajen ve kanserojenlerin Chinese hamster (*Cricetulus griseus* = Çin kemiricisi) yumurta (CHO) hücrelerinde SCE ve CA'yı uyardığının saptanmasından sonra, bu testler mutajen ve kanserojenlerin belirlenmesinde kullanılmaya başlanmıştır (Perry ve Evans, 1975). Aynı zamanda, mutajen ve kanserojenlerin toksik dozlarının altında meydana getirdikleri genetik hasarın süratle gösterilmesinin SCE ve CA analizleri ile mümkün olabileceği, ayrıca bir maddenin mutasyon meydana getirmesi ile SCE oluşumunun artırması arasında doğrusal bir ilişkinin olduğu da belirtilmiştir (Carrano ve ark., 1978).

1.1.Mutasyonlar

Bir çok genetik kavramın geliştirilmesinde, kalıtsal materyalin yapı ve içeriğinin dölden döle geçerken değişmediği kabul edilir. Her ne kadar, genler dikkati çekecek kadar kararlı ve yeni döllere bütün özelliklerini koruyarak katılıyorsa da zaman zaman doğal ve yapay koşullar altında mutasyon denilen değişikliklere uğrarlar. Mutasyon kalıtsal materyalin türe özgü normal kombinasyonunu değiştirmeyen, kalıtsal yapıdaki herhangi bir değişikliktir (Bağcı, 1985; Temizkan, 1996; Akman, 1983). Genotipte meydana gelen bu olay bir ya da daha fazla karakterdeki değişimle kendini belli eder. Böyle bir değişikliğin ürünü “mutant” olarak adlandırılır. Bu terim bir gen, bir hücre veya birey için kullanılabilir (Temizkan, 1996).

Mutasyon olayı çok eski yıllardan beri bilinmekte, yetiştiriciler ve ıslahçılar tarafından bitki ve hayvan ırklarının ıslahında kullanılmaktadır. Darwin çalışmalarında bu olayın önemine eğilmiş, Mendel de ünlü deneylerinde çeşitli mutantları kullanmıştır. 1980 yılında *Oenothera lamarckiana* (eşek çiçeği) üzerinde inceleme yapmaya başlayan Vries, bu bitkiler arasında, seyrek olarak

yeni ve farklı tiplerin meydana geldiğini görmüş ve böylece değişimler için ilk defa mutasyon terimini kullanmıştır (Bilge, 1981; Şahin, 1995; Temizkan, 1996).

Mutasyonlar doğada kendiliğinden meydana gelebildiği gibi “mutajen” adı verilen fiziksel ve kimyasal dış etkenler tarafından da meydana gelebilirler. Mutasyonlar genellikle organizma için öldürücü, ender olarak da değişen çevre koşullarında bir seleksiyon avantajı olarak yararlı olur. Mutasyon popülasyonlardaki çeşitliliğin oluşmasından sorumlu etkenlerden biri olması ve sonuçta türlerin evriminde rol oynaması nedeni ile, genetik ve biyolojik açıdan çok önemli bir olaydır (Bağcı, 1989; Saleh, 1997; Temizkan, 1996; Murray ve ark., 1993; Şahin, 1995; Tortoro, 1992; Erkan, 1992).

Mutasyon vücut (somatik) hücrelerinde ya da üreme (germ) hücrelerinde görülebilir. Vücut hücrelerinde olan mutasyona “somatik mutasyonlar” denir. Bu mutasyonlar hastalıklara, dejenerasyonlara yol açarak gelişmeyi ve metabolizmayı olumsuz etkileyebilirler. Birçok kanser türünün somatik hücrelerde genellikle bir mutasyon nedeni ile ortaya çıktığı bilinmektedir. Somatik dokulara ait hücrelerdeki mutasyonların etkisi meydana geldiği bireyin genotipinde gözlenebilir, fakat döle geçemediği için ortadan kalkar. Üreme hücrelerinde görülen mutasyona ise “germinal mutasyonlar” denir. Üreme hücrelerinin DNA’sında görülen değişimler genetik içeriğin farklılığına yol açar ve bu mutasyon kalıtsal olarak yeni nesillere aktarılır (Temizkan, 1996; Erkan, 1992; Griffiths ve ark., 1996; Strachan, 1996).

Mutasyon kapsamına giren değişimler kolay anlaşılması için iki grup altında toplanabilir. Bunları “kromozom mutasyonları” ve “gen mutasyonları” olarak sıralayabiliriz (Sambamurty, 2005; Pai, 1985; Russel, 1998). Kromozom mutasyonları da “kromozom sayı değişimleri” ve “kromozom yapı değişimleri” şeklinde 2 gruba ayrılır (Strachan ve ark., 1996; Monarca, 2000).

1.1.1. Kromozom Mutasyonları

Kromozomun büyük parçalarını ilgilendiren mutasyonlara kromozom mutasyonları denir. Kromozom mutasyonları, kromozom sayısı değişimleri ve kromozom yapısı değişimleri olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Başaran ve ark., 1995; Ateş, 2002; Bahçeci, 2002).

1.1.1.1. Yapısal mutasyonlar

Genetik bilgide değişmelere yol açan olaylar kromozom yapılarındaki değişmeler sonucunda da meydana gelebilirler. Bu olaylarda kromozom sayısı aynı kalır fakat kromozomlarda bazı parçaların kaybolması, fazlalaşması veya yer değiştirmesi yoluyla kalıtsal materyal değişime uğrar (Temizkan, 1994; Topaktaş ve Rencüzoğulları, 1995; Kuru ve Gözükkara, 2001).

Yapı değişmelerinin hepsinde önce kromozomda veya kromozomu oluşturan kromatidlerden birinde bir veya birden fazla noktada kırılmalar olur. Kırılma kendiliğinden meydana gelebildiği gibi çeşitli dış etkenler (X, gamma ışınları, UV-ışık, çeşitli kimyasal maddeler vb.) tarafından da meydana getirilebilir. Kromozom kırıklarına yol açan etkenlere **klastrojenik etkenler** adı verilir (Temizkan, 1994; Topaktaş ve Rencüzoğulları, 1995; Kuru ve Gözükkara, 2001).

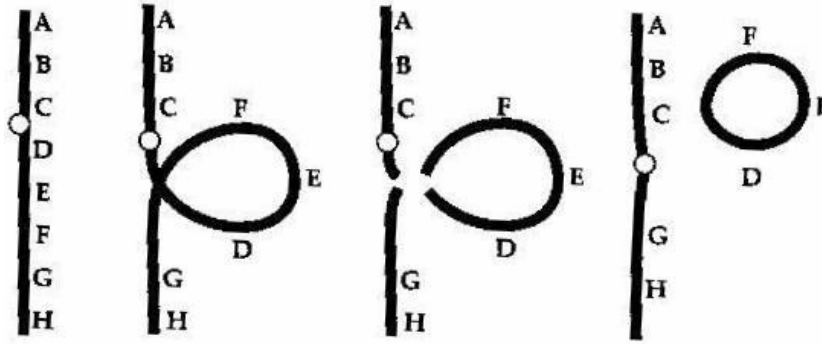
Fiziksel veya kimyasal mutajenlerden birisiyle karşılaşan hücrelerde kromozom enine olarak bir veya birkaç noktadan kopar. Kopmalar genellikle kromozomların tek iplik halinde görüldükleri interfaz veya erken profaz safhalarında meydana gelir. Bu durumda her bir kromatidinde de kopma olan kromozomun serbest kalan uçları birleşir (sister union). Sonuçta disentrik (iki sentromer içeren) ve asentrik (sentromer içermeyen) yapılar meydana gelir. Asentrik kromatid parçası hücrede varlığını sürdüremez kaybolur. Anafaz safhasında disentrik kromatid iki kutup arasında bir köprü gibi gerilir ve uygun bir yerden kopar (Temizkan, 1994; Topaktaş ve Rencüzoğulları, 1995; Kuru ve Gözükkara, 2001).

Metafaz evresinde ise; genellikle kardeş kromatidlerden birinde kopma görülür. Bu kopmalar kromozomlarda farklı tipte yapısal değişmelere neden olur (Temizkan, 1994; Topaktaş ve Rencüzoğulları, 1995; Kuru ve Gözükkara, 2001).

a) Delesyon

Kromozomun bir segmentinin kaybı şeklinde meydana gelen mutasyonlardır. Delesyon, bir veya birkaç gende kırıklar sonucu oluşan kromozomdan kayıp şeklinde olmaktadır. Bu kırıklar; sıcaklık, radyasyon,

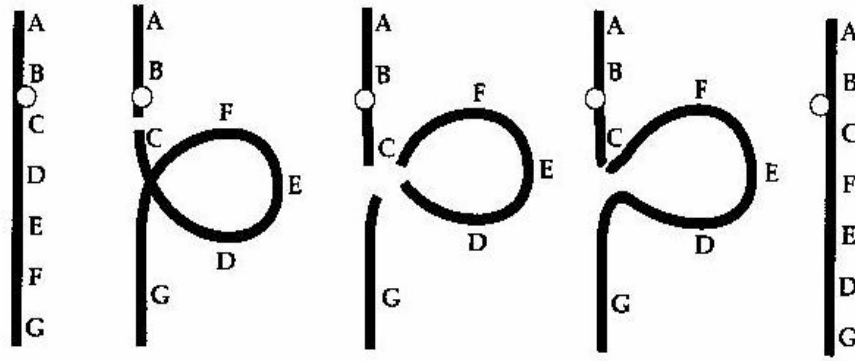
virüsler, kimyasallar, transposibil elementler gibi ajanlarca oluşabilmektedir. İnsanda 5. kromozomun kısa kolundaki delesyon sonucu oluşan “cri du chat” sendromu, bireyde fiziksel kusur ve zekâ geriliğine sebep olmaktadır. Terminal ve interkalar delesyonlar bulunmaktadır. Aktarılan tip mutasyonlardır.



Şekil 1.1. Delesyon (Kuru ve Gözükkara, 2001).

b) İnversiyon

İnversiyon, bir kromozomun iki defa kırılması ve kopan parçanın 180° ters dönerek tekrar aynı kromozoma bağlanması şeklindedir (Öner 2003, Falakalı 1993). İnversiyona uğramış kromozomlar normal homologları ile sinapsis oluştururken düzensizliklerinin ortaya çıkmasına nedenidir. Çünkü böyle heterozigotik homologlarda allel genler aynı noktalarda karşılıklı gelmek durumundadır. Kırılmadan önce kromozomda halkaya benzer bir yapı oluşur. Kırılmayla ortaya çıkan yapışkan uçlar birbirine yaklaşır ve tekrar birleşir. Bu durumda gen sayısı ve özelliği aynı olmasına rağmen diziliş sırası değişir. Ters çevrilen parça eğer sentromer içeriyorsa perisentrik inversiyon, içermiyorsa parasentrik inversiyon olarak isimlendirilir. Parasentrik inversiyonda, gen dizilisi ters çevrildiği halde sentromerden uzanan kolların boy oranı değişmezken perisentrik inversiyonda değişir (Öner 2003).



Şekil 1.2. İnverson (Kuru ve Gözükara, 2001).

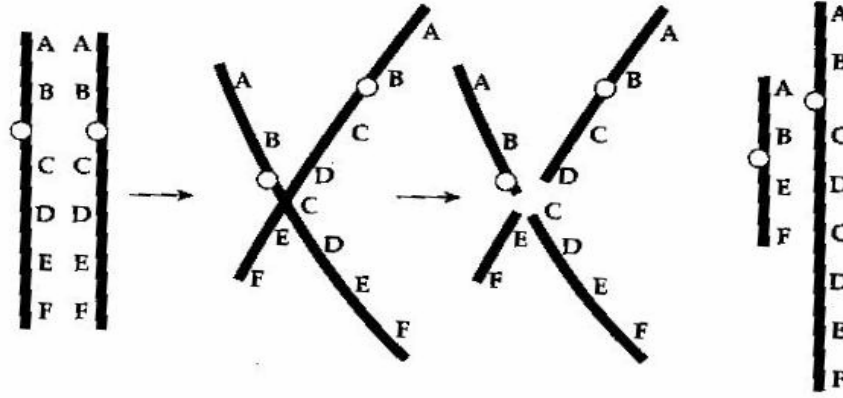
c) Duplikasyon

Duplikasyon, bir kromozomun bir parçasının o kromozom üzerinde iki veya daha fazla sayıda tekrar etmesi şeklindeki kromozom anomalisidir. Yani kromozomun bir kısmının kendi kendini eşlemesi olarak da tanımlanabilir.

Duplikasyonlu bir parça sentromerli serbest bir parça veya tamamlayıcı bir kromozom parçası olabilir. Eğer sentromere sahip yani sentrik bir kromozom parçası ise bu parça küçük, ekstra bir kromozom olarak kabul edilir.

Bir kromozom parça değişimi sırasında karşısındakine belirli genleri vermez, sadece alırsa o gen bakımından diploid olur. Bu çoğunlukla düzenli işlemeyen bir krossingover de meydana gelir. Normal olarak mayozun ilk evrelerinde eş genler sinapsis yapar. Ayrılırken normal bir bölünme olmazsa kromatidlerden biri o gen bakımından diploid olur diğeri ise o genlerden yoksun kalır.

Duplikasyonun değişik özelliği bulunur. Birincisi, duplikasyon geninin birden fazla kopyasının bulunmasını sağlayabilir. İkincisi, delesyonlarda olduğu gibi, duplikasyon sonucu fenotipik çeşitlilik oluşabilir (Öner 2003).

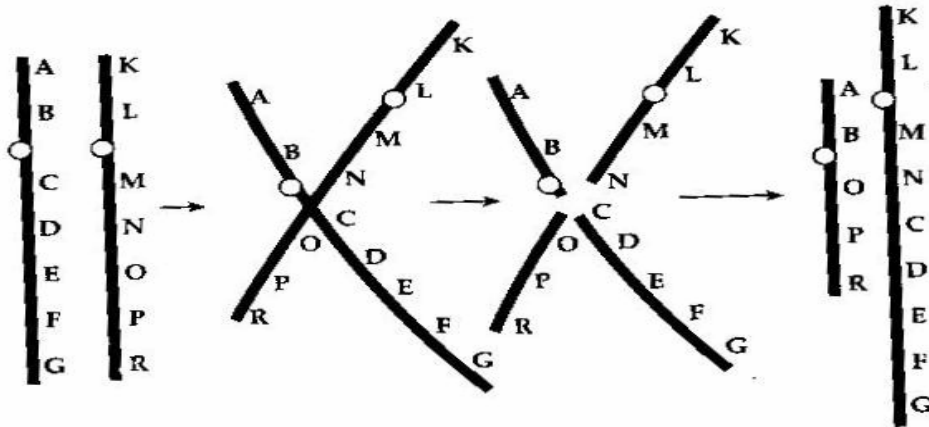


Şekil 1.3. Duplikasyon (Kuru ve Gözükara, 2001).

d) Translokasyon

Translokasyon, bir kromozomun kaybolan parçasının ya da kopan bir parçasının homolog olmayan başka bir kromozoma yapışması şeklinde görülen kromozom anomalileridir.

Translokasyonlar, her zaman homolog olmayan parça değişimleridir. Gen sayısının ve niteliğinin aynı kaldığı translokasyonlara "dengeli translokasyon"lar denir. Gen sayısının ve niteliğinin değiştiği, çoğunlukla anomalilere neden olan translokasyonlara ise "Dengesiz translokasyon"lar adı verilir.



Şekil 1.4. Translokasyon (Resiprok) (Kuru ve Gözükara, 2001).

1.1.1.2. Sayısal mutasyonlar

Organizmanın kromozom sayıları türlere göre farklılık gösterir, ancak her tür için sabittir. Bir bireyin her hücresi onun ait olduğu türe özgü sayıda kromozom taşır. Eşeyli üreme gösteren canlılarda, gametlerde bulunan kromozomlara “takım” ya da “genom” adı verilir ve “n” sembolüyle gösterilir. Eukaryotların çoğu diploiddir, yani somatik hücrelerinde iki takım kromozom bulunur. Kromozomlar bazen mitoz veya mayoz sırasında düzenli olarak ayrılmayabilir ve farklı kromozom sayısına sahip hücreler oluşabilir. Bu şekilde birçok genin oranı değişeceğinden kalıtsal açıdan birçok sorun (Mongolizm, Turner sendromu, Klinefelter sendromu vb.) oluşur. Bu olayda kromozomun bir parçası değil tümü yok olur ya da sayıca artar. Euploidi ve aneuploidi olarak 2 şekli vardır (Şahin, 1995).

A. Euploidi

Euploidi kromozom takımı sayısındaki değişimlerdir. Bir takımdaki kromozomların hepsinin birden sayısının tam katlar halinde yükselmesi veya organizmada tek takım kromozom bulunması biçiminde olabilir (Temizkan, 1996; Demirsoy, 1992; Şahin, 1995).

Değişik şekilleri vardır:

1) Monoploidi: Normalde diploid olan hayvan ve bitki hücrelerinde ender olarak bazı bireylerin hücrelerinde sadece bir takım yani n sayıda kromozom bulunur. Bu olaya monoploidi, böyle bireylere monoploid denir. Monoploidler genellikle döllenmemiş yumurtanın gelişmesiyle oluşurlar. Bu olay kendiliğinden olabileceği gibi dış etkenlerle de gerçekleşebilir (Temizkan, 1996).

2) Poliploidi: Bir takımdaki kromozom sayısının hepsinin birden ikiden fazla kata, yükselmesidir. Bu olay sonunda 3n, 4n, 5n ve daha yüksek katsayılı kromozomlara sahip bireyler meydana gelir. İnsanda poliploidi ender bir olaydır. Çünkü düşüklere ve ölü doğumlara neden olmaktadır. Daha çok bitkilerde bulunan birkaç tipi vardır:

a) Autopoliploidi: Bir poliploidin sahip olduğu kromozom takımlarının hepsi aynı türe ait ise olaya “Autopoliploidi”(otopoliploidi) adı verilir. Diploid bir bitki örneğin AA genomuna sahipse burada 4A ya da daha farklı sayıda olur.

b) Allopoliploidi: Bir poliploidin sahip olduğu genomlar birden fazla türe ait ise olaya “Allopoliploidi” denir. Burada bir tür ya da cinsin genomu AA, diğeri de BB ise AABB poliploidisi görülür.

c) Endopoliploidi: Hücre genelde bölünme yeteneğini kaybetmesine rağmen kromozomlar mitoz olayında olduğu gibi sürekli bölünerek çoğalır. Çekirdek zarı parçalanmadığı için, kromozomlar birlikte kalacakları için kromozom takımı sayısı $2n'$ in üzerine çıkacaktır (Temizkan, 1996; Demirsoy, 1992; Şahin, 1995).

B. Aneuploidi

Bir takımdaki kromozomlardan birinin veya birkaçının sayısının değişmesi olayına “Aneuploidi” denir (Temizkan, 1996; Demirsoy, 1992; Şahin, 1995). Çeşitli tipleri vardır:

1) Monosomi: Diploid bir bireyde tek bir kromozomun eksik olması durumudur. Böyle bir birey, mayoz sırasında kromozomların ayrılması nedeniyle oluşmuş ve bir kromozomu eksik ($n-1$) olan bir gametle, normal (n) bir gametin birleşmesi sonucu meydana gelir ve kromozom sayısı $2n-1$ olur.

2) Nullisomi: Bir takımda bir kromozom homoluğu ile birlikte eksik olması yani bir kromozom çeşidinin hiç bulunmamasıdır. Bu tip diploid bireyler $2n-2$ formülü ile gösterilirler.

3) Polisomi: Bir takımdaki kromozomların birinin veya birkaçının artmasıdır. Trisomik fertlerde kromozom sayısı $2n+1$, tetrasomiklerde $2n+2$, polisomiklerde ise $2n+3$ şeklindedir.

4) Somatik aneuploidi: Vücut hücrelerinin mitozu sırasında bazı kromozomlar birbirinden ayrılmayabilir. Yavru hücrelerin birinde monosomi, diğesinde trisomi ortaya çıkar. Eğer bu bozukluk erken embriyo evrelerinde meydana gelirse, hücrelerin mozaik gelişiminden dolayı erginde büyük bir bölgeyi kapsayacak şekilde anormal kromozom sayısı görülür. Eğer embriyonun geç evrelerinde ya da doğumdan sonra bu anormallik ortaya çıkarsa, etkilediği vücut bölgesi daha küçük olacağından dolayı ya görülmez ya da önemsiz bir şekilde kendini gösterir. Ancak kanser ayrıcalık gösterir. Bu hastalığın bazı çeşitleri aneuploididir ve geç evrelerde çıkarsa etkisini gösterir (Temizkan, 1996; Demirsoy, 1992; Şahin, 1995).

Aneuploidinin bütün formları mayoz sonrası ciddi sonuçlar doğurur. Memelilerde X kromozomunun aktivasyonundan dolayı gametik

kromozomlarındaki aneuplodizasyon, otozomlarda olandan çok daha sık görülmektedir. İnsanda otozomal monosomi ($2n-1$) çok nadir olarak, gelişmeden ölen embriyolarda görülmektedir. Buna karşın fetal ölümlere sebep olan aneuploidi anomalinin yarısını, otozomal trisomi ($2n+1$) oluşturmaktadır. Sadece birkaç otozomal trisomi tipinde canlı doğumlar görülür, ancak bunların çoğunda erken ölüm meydana gelmektedir. Sadece 21. kromozomun trisomisi olan Down sendromunda bireyler yetişkinlik çağına gelebilmektedir (Griffiths ve ark., 1996).

1.1.2. Gen mutasyonları

Bir genin, genomdaki sayısı veya kromozom üzerindeki yeri değişmeksizin, yapısının değişmesi olayına “Gen Mutasyonu” olayı adı verilir. Genomda çok küçük bir bölgedeki değişimi kapsadığı için gen mutasyonuna “Nokta Mutasyonu” da denir. Gen mutasyon mekanizmasının esasını, dış etkilerle AT / GC oranında veya bazların diziliş sırasında meydana gelen değişiklik oluşturur (Temizkan, 1996; Bilge, 1981).

Genlerde değişiklik, nükleotidin kazanılması, kaybedilmesi ya da yer değiştirmesi kadar basit olabileceği gibi, normal DNA dizisi içinde birkaç nükleotidin eklenme ya da çıkarılması gibi karmaşık da olabilir.

Bir gen, binlerce baz çiftinden meydana gelmiş bir birim olduğundan ve kuramsal olarak her bazda mutasyon olabileceğinden dolayı, bir genin en azından baz çifti kadar mutasyon çeşidi olur. Spontan (kendiliğinden) ve indüklenmiş / uyarılmış (bir ajan tarafından) mutasyon olarak sınıflandırılır (Russel, 1998). Spontan mutasyon nedenleri içinde DNA replikasyon hataları, tautomerik değişim, metilasyon, gen kırılması, transposibil 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 (Temizkan, 1994; Sambamurty, 2005). 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 değiştiremeyebilir. Böyle bir durumda bu gendeki bir mutasyon sessiz (silent) mutasyon olarak adlandırılır (Yıldırım, 2007; Brown, 1992). Örneğin; UAC tripletinin UAU'ya dönüşmesi bir nokta mutasyonu olmasına karşın, her iki triplet de aynı aminoasiti (tirozin) kodladığından protein ürününde bir değişme olmaz. Eğer tripletlerin yapısının değişimi yeni bir amino asitin oluşumuna sebep olursa bu nokta mutasyonuna “Yanlış anlamlı (missense) mutasyon” 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 (Yıldırım, 2007; Friedberg ve ark., 1995).

Gen mutasyonlarını iki ana grupta toplanabilir:

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 (Yıldırım, 2007). Transversiyon sadece DNA replikasyonu safhasında gözlenir. $AT \rightarrow GC$, $GC \rightarrow AT$, $TA \rightarrow CG$, $CG \rightarrow TA$ şeklinde transisyon ve $AT \rightarrow TA$, $GC \rightarrow CG$, $AT \rightarrow CG$, $GC \rightarrow TA$ şeklinde de transversiyon mutasyonları meydana gelebilmektedir (Russel, 1998; Brown, 1992). Yapılan bir çalışmada $GC \rightarrow TA$ ve $GC \rightarrow CG$ tipi transversiyon mutasyonun oksidatif koşullarda ortaya çıktığı görülmüştür (Kino ve Sugiyama, 2001).

b) Çerçeve kayması (Frame-Shift) mutasyonları

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 (Friedberg ve ark., 1995).

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

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 ile alkilleyici, hidroksile edici, çapraz bağlayıcı, klastojenik, psoralen, nitroz asidi ve 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 (Sen ve Kar, 2005; Friedberg ve ark., 1995). Günümüzde ve gelecekte kullanımı kaçınılmaz olan radyasyonun zararlı etkilerinden korunmanın ve biyomonitöring çalışmalarının önemini ele alındığı, biyolojik dozimetride kromozom aberasyonlarının yerinin tanımlandığı çalışmalar yapılmıştır (Coşkun, 2003).

1.2.1.1. İyonize radyasyon

X, gama, beta ışınları ve nötronlar mutasyona yol açtığı bilinen iyonize radyasyonlardır. İyonize radyasyon suyun serbest radikallerini oluşturarak organizma ve hücrelerde bir dizi hasara yol açmaktadır. Serbest radikaller çok

aktif olan elektronlar ile DNA'ya, proteinlere ve hücre lipidlerine bağlanarak bunlarda hasar oluşturabilirler. Hücre bölünmesini bloke ederek hücrenin ölümüne sebep olabilirler (Friedberg ve ark., 1995). 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. İyonize 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 (Bolsover ve ark., 1997). UV ışınları pirimidin dimerlerini etkileyerek çift sarmal yapısını bozarlar.

1.2.2. Kimyasal mutajenler

Birçok gruba ayrılabilen kimyasal mutajenler DNA bazları ile kovalent olarak bağlanabilmektedir. Bunlar ya elektrofilik (elektron kaybetmiş) gruplara sahiptir veya metabolik olarak elektrofilik özellikte türevlere dönüştürülürler. Elektrofilik özellikteki bu gruplar diğer moleküllerin yapılarında bulunan nükleofilik (elektronca zengin) amino, sülfidril ve hidroksil grupları ile kovalent bağlar oluştururlar. Nükleofilik gruplar proteinlerin, RNA ve DNA yapılarında bulunurlar. Elektrofilik özellikteki kimyasal maddeler, bu hedef moleküllerin tümü ile etkileşirler, ancak bunların bağlanarak zarar verdikleri en önemli hedef, DNA molekülüdür (Petek, 1999).

Aynı zamanda birçok eksojen mutajen insan vücudunda reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu artırmak suretiyle aktivite göstermektedir. ROS'un oluşumu çevre kirliliği, UV, radyasyon gibi birçok metabolik prosesle bağlantılıdır. ROS; kanser, kalp hastalığı, yaşlanma ile bağlantılı olan mutasyon ve DNA zararı gibi dejeneratif hastalıkların endojen başlangıcı olarak büyük rol oynar (Negi *et al.* 2003). İnsan vücudundaki sayısız fizyolojik ve biyokimyasal proseste oksijen merkezli serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri

oluşabilir (Chai *et al.* 2004). Örneğin; vücuda alınan besin maddesinin su ve karbondioksite kadar yıkılması reaksiyonunda oksijenin dört elektron vererek indirgenmesi gerekir. I. elektron superoksit anyon radikalini, II. elektron peroksit anyonu, III.'sü hidroksi radikalini ve sonuncusu suyu meydana getirir.

Bu proses bölmelere ayrıldığında ve sürekli gerçekleştiğinde zararlı sonuçlar ortaya çıkmaz. Ancak bu serbest radikal türlerinden herhangi biri zincirden ayrıldığında, ayrılan radikal; lipit membranlara, DNA'ya, proteinlere v.b. zarar veren reaktif oksijen türlerinin oluşmasını sağlayan diğer radikal zincir reaksiyonunu (lipid peroksidasyonu) başlatabilme yeteneğindedir (Murray, 2004). Bu tür serbest radikallerin aşırı üretimi biyomoleküller üzerinde oksidatif hasara sebep olur ve sonunda insanlarda arterioskleroz, kanser, yaşlanma, diabet, diğer dejeneratif hastalıklar gibi kronik hastalıkları oluşturabilirler (Chai *et al.* 2004).

Genotoksik özellikteki kimyasal maddelerin birçoğu da sitokrom P-450 enzimleri ile epoksit ve hidroksil türevlerine (ileri derecede mutajenik veya karsinojenik) dönüşür. Bu dönüşümden önce karsinojen veya mutajen özellikte olmayan kimyasal maddeler, vucutta metabolizma sonucu aktif karsinojen haline dönüşür ve çok kuvvetli elektrofilik özellik göstermelerinden dolayı nükleofilik olan DNA molekülüne kolayca saldırıp çok sayıda mutasyonun oluşmasına neden olurlar (Petek, 1999; Murray, 2004).

Örneğin; aflatoksin β 1, benzoaminopirin, bromobenzen gibi ksenobiyotik maddeler karaciğerde glutasyonu kendine bağlar ve yapısındaki aromatik halkalar epoksidasyona uğrar. Onların epoksitleri ve ara ürünleri elektrofilik özelliklerinden dolayı hücre membranlarında lipit peroksidasyonunu indükler. Bununla birlikte bu bileşenler DNA zincirlerinde mutajeniteye sebep olacak şekilde onunla reaksiyona girer. Bu yüzden birçok ksenobiyotik madde karsinojen olarak fonksiyon gösterir (Park *et al.* 2004).

Proliferasyon fazında olmayan, durağan hücrelerde, çift sarmalı oluşturan iki DNA zincirinin bu tür kimyasal maddelerle bağlanma eğilimi yoktur. Ancak DNA sentezi sırasında iki zincir birbirinden ayrıldığında, DNA; karsinojenik ve mutajenik saldırılara özellikle çok duyarlı hale gelir (Petek, 1999).

Çoğu endüstriyel aktivitelerin yan ürünleri olarak doğal ortama verilen, mutasyona sebep olduğu bilinen genotoksik kimyasal maddelerin belli başlı grupları aşağıdakilerden oluşmaktadır.

1.2.2.1. Baz analogları

Hücrede DNA' nın yapısını oluşturan pürin ve pirimidin bazlarına benzeyen ve replikasyon sırasında bu bazların yerine geçebilen moleküllere baz analogları denir. Baz analogları mutajenik kimyasallardır ve DNA'nın bir zincirine yerleştiklerinde bu DNA' dan kopyalanan yeni DNA moleküllerinde yanlış baz çiftlerinin yer almasına sebep olurlar (Yıldırım, 2007).

En yaygın olarak çalışılan baz analogları arasında holojenlenmiş 5-bromourasil 5-fuourasil ve 5-iyodourasil gibi urasil türevleri yer almaktadır (Friedberg ve ark., 1995).

5.Bromurasil; bu baz timine çok benzediğinden DNA eşleşmesi sırasında timin yerine kullanılabilir. Timinden tek farkı 5. karbona bağlı metil grubunun yerine brom atomu bulunmasıdır. Urasilde ise aynı yerde bir hidrojen atomu bulunur. Hidrojenin bromla yer değiştirmesinden meydana geldiği için 5.bromurasil olarak adlandırılır. Aynı şekilde adenin analogu 2-aminopürin de mutajenik özelliğe sahiptir (Sowers ve ark., 1987). 2 Aminopürin; bu madde adenine çok benzer. Bu molekül amino formunda iken timinle çift oluşturur (2AP-T). 2AP, nadiren bir "İmino"formunda bulunabilir ve bu durumda iken sitozinle arasında tek hidrojen bağı olacak şekilde çift oluşturabilir (2AP-C). Bunun sonucunda, gen üzerinde A-T çiftleri yerine 2AP-C oluşur. Böylece A-T yerine G-C geçmiş olur (Petek, 1999).

1.2.2.2. Alkileyici ajanlar

İçinde karsinojenliği kanıtlanmış ya da şüpheli olan çok sayıda kimyasal çeşidi bulunan alkileyici ajanlar, organik makro moleküllerin nükleofilik merkezlerine affinite gösteren elektrofilik bileşiklerdir (Lawley, 1989). Dimetlnitrosamin, N-metil-N-nitrosourea, 1,2-dimetilhidrazin, Metil metan-sülfonat, Dietil-nitrosamin, N-etil-Nitrosourea gibi monofonksiyonel alkileyici ajanlar, deneylerde mutajen olarak sıklıkla kullanılırlar (Gollapudi ve ark., 1998). Bu ajanlar monofonksiyonel ya da bifonksiyoneldir. Monofonksiyonel olanlar tek bir reaktif gruba sahiptir ve DNA'daki tek nükleofilik merkezle kovalent bağ yaparlar. Bifonksiyonel ajanlar ise 2 reaktif grup taşımakta ve DNA ile 2 ayrı bölgede reaksiyona girebilmektedir. Potansiyel alkilleme bölgeleri 4 baz içinde

belirlenmiş ve herbirinin farklı reaktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Örneğin etil grubu bağlanan 7-etil guanin, timinle eşleşir. (yanlış baz eşleşmesi olur) Genelde bazların halkasal nitrojenleri, oksijenlerinden daha nükleofiliktir. Fosfodiester bağlarındaki oksijenin alkilasyonu fosfotriesterlerin oluşumu ile sonuçlanır (Roberts, 1978). Diğer yandan alkilasyonla değişime uğrayan bazlarda N-glikosilik bağları zayıflatmakta ve çok sayıda alkilleyici ajan bazlarda depurinasyon-depirimidinasyona yol açarak, abazik bölgelerin oluşumuna neden olmaktadır (Loeb ve Preston, 1986). Alkilleyici ajanlar, nokta mutasyonların 3 tipini de indükler. DNA ipliğinde çapraz bağlanma yaparak kromozom kırıklarına yol açabilirler.

1.2.2.3. İnterkale ajanlar

Akridinler (proflavine, acriflavine, acridin orange), labratuvar çalışmalarında boya olarak kullanılan etidyum bromid gibi kimyasallar örnek olarak verilebilir (Fairbanks ve Anderson, 1999; Brown, 1992; Yıldırım, 2007). Akridin boyaları C-G→A-T veya A-T→T-A şeklinde transversiyonlara yol açarlar. Ayrıca çift sarmal DNA'nın bazları arasına girerek (interkalasyon) şeker-fosfat omurgasını bozabilmektedirler. Bu bileşikler DNA'da nükleotit eksilmesine ya da artmasına böylece DNA diziliminde çerçeve kaymasına neden olabilen mutajenlerdir. Bunlar rekombinasyon esnasında bir zinciri kopan DNA molekülüne bağlanarak, zincirlerin onarılması sırasında da yanlışlıklara neden olurlar (Petek, 1999).

1.1.2.4. Hidroksile edici ajanlar

Bazları hidroksilleme etkileri vardır. Yanlış baz eşleşmelerine yol açarlar. Örneğin hidroksilamin ile reaksiyona giren sitozin, hidroksilaminositozin formunda, adeninle eşleşir (Gupta ve ark., 1995). Bir diğer örnekte aflotoksin B dir. Aflotoksin B, nükleotid den guanin bazını çıkaran bir mutajendir (Fairbanks ve Andersen, 1999).

1.2.2.5. Diğer kimyasal ajanlar

Nitröz asitin (HNO₂), 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 (Migłani, 2000).

Hidrojen peroksit (H₂O₂), hidroksi radikaller (.OH) ve süperoksit (O₂.) gibi reaktif oksijen türlerinin de DNA'da mutasyona sebep olan diğer önemli kimyasal ajanlar olduğu bilinmektedir (Yıldırım, 2007).

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

1.2.2.6. Klastojenik ajanlar

Genetik materyale kromatit ve kromozom kırıkları ve dolayısıyla meydana gelen yapısal kromozom anomalileri şeklinde zarar veren ajanlardır (Emerit ve ark., 1985). İyonize radyasyon, nitro furan, benzen, benzo (a) pren, siklofosamid, vinil klorit gibi ajanlar klastojenik etkilidir. Klastojenik etki bazen, memelilerdeki hücrel metabolizma sonucu da meydana gelmektedir. Yapılan bir araştırmada atom bombası sonrası hayatta kalanların hücrelerinde bu etkinin 31 yıl boyunca sürdüğü ortaya konulmuştur (Porter ve Coon, 1991). Diğer yandan *in vitro* koşullarda herhangi bir fiziksel ya da kimyasal etken ile muamele edilen kan hücrelerinde klastojenik etki meydana gelebilmektedir (Sivikova ve Dianovsky, 1999). Bir başka şekilde tümör promotörleri de tıpkı radikal üreten kimyasallar gibi klastojenik etkiyi uyarabilmektedir (Emerit ve ark., 1985). Genel olarak süperoksit dismutas gibi radikal-koruyucu enzimlerin varlığı klastojenik aktivitenin oluşumunu önlemektedir (Emerit, 1994).

1.2.2.7. Metabolik aktivasyon ile aktif olan kimyasallar ajanlar

DNA'daki kimyasal hasara ilişkin çalışmalarda, kimyasal olarak reaktif olmayan, nonpolar gruplar taşıyan çeşitli tipte kimyasal bileşiğin canlı vücudundaki metabolik aktivasyon tepkimeleri ile daha reaktif formlara dönüşerek, tıpkı alkilleyici ajanlar gibi, DNA'daki nükleofilik merkezle etkileşime girdiği tesbit edilmiştir. Bu özellikte olan çok sayıda bileşik potansiyel mutajen ve karsinojendir. Bu grupta bulunan karsinojenlerin metabolizması hassas türler üzerinde çalışılarak aydınlatılmıştır. Bazı karsinojenik aromatik aminlerin tümöre neden olduğu yıllardır bilinmektedir. Örneğin N,N-dimetil-4-aminoazobenzen sıçanlarda (rat) etkili bir karaciğer karsinojenidir, kendisi sıçan karaciğer proteinlerine bağlanamazken, metaboliti bağlanabilmektedir. Bu bileşiklerin ve pek çok diğer karsinojenin genotoksik aktivitesi metabolik enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir (Anders ve Dekant, 1994).

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

Çeşitli endüstriyel ürünlerde ve kömür katranında bulunan benzo [a] pyrene günümüzde çok etkili karsinojenik bileşiklerden biri olarak bilinmektedir ve çevresel olarak sigara dumanı ve otomobil eksoz gazı gibi benzo [a] pyrene kaynağı olan bileşiklerde çok yaygın olarak bulunmaktadır. Benzo [a] pyrene metabolize edilmemiş doğal yapısıyla reaktif olmayan nonpolar bir bileşik olup, bu yapısı nedeniyle DNA çift ipliğindeki bazlar arasına hidrojen bağları kurarak girmektedir. Bu durum DNA hasarına giden yolda bir başlangıç oluşturur. Vücutta P450 enzim sisteminin bileşiklerinden arilhidrokarbon hidroksilaz enzimi benzo [a] pyrene ve diğer polisiklik aromatik hidrokarbonları, onların ester konjugatları olan fenollere ve dihidrodiollere metabolize etmektedir (Hall ve Grover, 1990).

Diğer yandan benzo [a] pyrenin bazı metabolizma ürünleri olarak elektrofilik epoksitler oluşmaktadır ki bunlar çok iyi bilinen karsinojenik formlardır ve anti diol-epoksitler olarak adlandırılırlar (Friedberg ve ark., 1995).

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

1.3.Genotoksisite Testleri

Genetik toksikoloji çalışmalarıyla belirlenen potansiyel genotoksik etkiler, kanser gibi hastalıkların nedenlerinin belirlenmesinde kullanılabilmektedirler (Jacobson-Kram ve Keller, 2001). Bu testler, canlıların maruz kaldığı potansiyel riskin hızlı bir şekilde tayin edilmesi, geliştirilmekte olan ilaçların insanlarda neden olabileceği riskin ölçülmesi ve yapılabilecek ek testlerin belirlenmesine yardımcı olmak için kullanılmaktadır (Gad, 2000). Toksik olan materyallerin *in vitro* daki genetik etkilerini ölçmek için kullanılan *in vitro* genetik toksikoloji testleri, diğer tüm *in vitro* toksikoloji testlerinin öncülüdür (Gad, 2000). Çevresel koruma programı olan EPA mesleki ve çevresel maruziyet risklerini belirleyen pek çok laboratuvar tarafından kabul gören sitotoksisite testlerinden elde edilen verileri toplayarak veri tabanı oluşturmaktadır (Kent, 1998).

In vivo olarak başlayan genotoksisite test çalışmaları daha sonraki dönemlerde S9 aktivasyonunun geliştirilmesiyle *in vitro*ya kaymıştır (Gad, 2000; Lu ve Kacew, 2002) .

Mesleki ve çevresel maruziyetten kanser gelişimine, katkı maddelerinden dental dolgu maddelerine, bitki ekstratlarından yeni sentezlenen ilaçlara insan kullanımında olan tüm madde ve etkenlerin araştırılmasında standart testler haline gelen mutajenite ve genotoksisite çalışmaları; *in vitro* olarak yapılabilmesi, pratik, güvenilir, standartlara uygun, kriterleri belli, sonuca yönelik çalışmalar olması sebebiyle uluslararası düzeyde etkin bir şekilde çalışılmaktadır (Gad, 2000; Canımoğlu ve Rencüzoğulları, 2006; Sarıkaya ve Solak, 2003; Zhang ve ark., 2007; Munro ve ark., 2006; Başaran, 2002; Guzman ve ark., 2007; Synder ve Gren, 2001)

1.3.1. Bakteriyal yöntemler

Kimyasal maddelerin karsinojenik risklerini ortaya çıkarmak için en akılcı yaklaşım, deney hayvanlarında tümör indikasyonudur. Ancak bu testlerin sonuçlanması uzun zaman almakta ve maliyetleri yüksek olmaktadır (IARC 1980). Bu sebeple araştırmacılar karsinojenite taramalarında esas olabilecek kısa zamanda sonuç verebilen ve düşük maliyetli ve hassasiyeti yüksek birçok kısa zamanlı mutajenite test sistem geliştirmişlerdir (Maron and Ames, 1983; Quillardet and Hofnung, 1985; Hofnung and Quillardet, 1986).

Kısa zamanlı test sistemlerinden en yaygın olarak kullanılanı bakteriyel testlerdir. Bakteriler, basit üreme ortamlarında hızla ürediklerinden, bakteriyel testler; basit, çabuk ve ucuz uygulanabilir olmaları sebebiyle tercih edilmektedirler (Hofnung and Quillardet, 1986; Gatehouse ve ark., 1990).

Bakteriler gecelik kültürlerinde çok sayıda gelişirler ve nadir mutasyonel olayların saptanmasına olanak tanırırlar. Ayrıca bakteriyel genetik bilgi ve deneyimlerin artışı, çeşitli ajanlara karşı yabancı tiplerinden daha hassas olan özel bakteri mutanlarının oluşturulmasına olanak sağlamıştır (Gatehouse ve ark., 1990).

Bakteriyel test sistemlerinin kullanım amaçlarından bazılarını şöyle sıralayabiliriz;

- Çeşitli kimyasalların potansiyel karsinojenitelerinin incelenmesinde,
- Kompleks karışımlardan, biyolojik olarak etkin bileşiklerin belirlenmesinde,
- Prokarsinojenlerin öncül ya da son metabolitlerinin saptanmasında,
- Vücut sıvılarının ve atıklarının test edilmesiyle, insanların mutajen ve karsinojenlere maruz kalma düzeylerinin izlenmesinde,
- Kimyasalların mutajenik etki mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalarda,
- Konakçılar üzerinde yapılan deneylerde,
- Karsinojen ve mutajenlerin neden olduğu özgül DNA hasarlarının tiplerini saptamada yaygın olarak kullanılmaktadır (Öksüzoğlu, 2000).

1.3.1.1 Ames (Salmonella/Mikrozom) testi

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

Salmonella/mikrozom testi, bakteriyal mutasyon testleri içinde detayları en iyi bilinen ve karakterize edilen, geçerliliği, uygulanma kolaylığı ve hassaslığı nedeniyle en fazla kabul görerek tercih edilen ve günümüzde de sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Gatehouse ve ark., 1990; Russell, 1998; Friedberg ve ark., 1995). Test organizması olarak kullanılan *Salmonella typhimurium*, histidin geninde oluşturulan farklı mutasyonlarla (*hisG*, *his C*, ya da *his D*), gelişmek için histidin gereksinimi duyan değişik tipte oksotrofik mutantlara dönüştürülmüştür. Ayrıca histidin mutantlarına ek olarak bu mutantlara bazı diğer mutasyonlar ilave edilir (Erkan 1992).

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

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

1.3.1.2. SOS (umu) testi

Umu test sistemi, kimyasal ajanların genotoksik etkilerini saptamak amacıyla kullanılan kolorimetrik, bakteriyel bir test sistemidir (Quillardet ve Hofnurng, 1985). SOS-cevap esas alınarak geliştirilmiştir. Regülatör bir sistem olan SOS sistemi, DNA hasarı ile indüklenebilen sistemler içinde ilk olarak karakterize edilmiş olan en kapsamlı, en kompleks ve en iyi anlaşılmiş sistemdir (Oda ve ark., 1985). Umu test sistemi, diğer SOS-cevap genlerinden çok daha dolaysız bir şekilde mutagenesisle ilgili olduğu düşünülen *umu* operonunun ifade edilme düzeyini saptamaya dayanır. *Umu* operonunun ifade edilme düzeyi *umuC-lacZ* füzyonu aracılığıyla oluşturulan β -galaktosidaz aktivitesinin ölçülmesiyle saptanır (Oda ve ark., 1985). β -Galaktosidaz aktivitesinde kontrole göre en az 2 katlık bir artışın gözlenmesi, umu test sisteminde, kimyasalın mutajenite açısından pozitif olarak değerlendirilebileceğini göstermektedir (Quillardet ve Hofnurng, 1985).

1.3.1.3 *E.coli* lac I mutasyon test sistemi

Bakterilerde meydana gelen mutasyonların genetik ve moleküler analizinde kullanılan bir ileri mutasyon yöntemi olup ilk kez 1983'de Miller ve arkadaşları tarafından *E. coli* de geliştirilmiştir. Bu sistemde laktoz operonundaki repressörü kodlayan lac I geninde oluşan mutasyon fenotip üzerindeki yansıması belirlenerek değerlendirilmektedir. Lac I mutasyonlarını içeren gen bölgesi bakteriden alınarak bir plazmite ya da M13 fajı klonlama vektörüne aktararak, vektörler çoğaltılarak çok sayıda mutant DNA kopyası elde edilerek, dizi analizi yapılmaktadır (Güven, 1999).

1.3.2. Sitogenetik yöntemler

Sitogenetik testler, kromozom sayısındaki ve yapısındaki değişimlerin belirlenmesinde kullanılan testlerdir (Barile, 1994).

Sitogenetik çalışmaları popülasyonun maruz kaldığı genotoksik ajanların etkisinin belirlenmesinde (Neri ve ark., 2003; Ulupınar ve ark., 2002; Ocak ve

ark., 2002), radyasyona maruz kalan belirli populasyonlar için, bireysel olarak etkilenme dozunu saptamak için kullanılabilir (Friedberg ve ark., 1995) .

Kimyasalların mutajenliğini araştırmada kullanılan en yaygın sitogenetik yöntemler, yapısal kromozom bozukluğu (CA), kardeş kromatid değişimi (SCE) ve mikronükleus (MN) testleridir. Bu testler *in vivo* olarak laboratuvar hayvanlarında, *in vitro* olarak da insan kan lökositleri, mesane, yanak, mide, nasal ve sperm hücreleri ile çeşitli kültür hücrelerinde uygulanabilmektedir (Barile, 1994; Kirkland, 1990) .

1.3.2.1. Yapısal kromozom bozulma analizi (CA=Chromosome Aberration)

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 (Savage, 1999) .

Bu test, insan periferik lenfositlerinin *in vitro*' da önce fitohemaglutinin ile bölünmeye teşvik edilmesi, belirli zamanda kolçisin ve kolsemid gibi iplik inhibitörlerince hücrelerin metafazda tutulması esasına dayanmaktadır. *In vitro* CA testinde genellikle memeli somatik hücreleri, insanda ise lenfositler kullanılmaktadır (Mateuca ve ark., 2006; Kirkland, 1990).

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

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

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 edilmesi sağlanır. Kanser gibi hastalıklarda, SCE frekansında artış olduğu bilindiği için, mutajenlere maruziyet sonucu oluşabilecek hasarların belirlenmesinde sıklıkla tercih edilen bir tekniktir. Çeşitli mutajenik maddeler alkilleyici özellikleri ile (mitomisin C, nitrojen mustard gibi) kromatid kırıklarını ve değişimlerini indüklemektedirler (Sen ve Kar, 2005).

Benzin istasyonunda çalışan ve sigara kullananlarla yapılan bir çalışmada, 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 benzene maruziyette ise önemli derecede SCE frekansı artışı olduğu, kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak anlaşılmıştır (Çelik ve Akbaş, 2005).

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 gösterilmiştir (Aydemir ve ark., 2005).

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

1.3.2.3. Mikronükleus testi (MN)

Mikronükleus, hücre çekirdeğinin dışında sitoplazmada yer alan, çekirdek orijinli küçük küresel bir oluşumdur. Mikronükleus mitotik hücrelerde kromozom fragmentlerinden ya da anafazda geç kalarak her iki kardeş çekirdeğe dahil olmayan kromozomlardan kaynaklanır. Mikronükleus içeren hücre sayısındaki

artış, maruz kalınan klastojenik (DNA'yı hedefler, kromozom kırılmalarına neden olur) veya aneujenik (kromozom sayısının değişimine etkilidir, genellikle DNA'yı hedef almaz) ajanların genetoksik etkilerini yansıtan bir biomarkerdir. Mikronükleus testi bölünme yeteneğine sahip tüm hücrelerde yapılabilen bir testtir. Temel prensibi, bazı mitoz anomalileri ve kromozom kaybı gibi durumların ortaya çıkarılmasına yöneliktir. Çekirdek boyanması ile incelenir. Bu amaçla en çok memelilerin polikromotofil (PCE) ve normokromotofil (NCE) eritrositlerinde çalışmalar yapılmaktadır.

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

Mikronükleus, esas olarak kromozom segregasyonundan sorumlu mekanizmalardaki kusurlardan oluşur; hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki kusurlar, iğ ipliğindeki bozukluk, kinetokor ve diğer mitotik aparatlardaki fonksiyon kaybından ve mekanik parçalanmalardan kaynaklanmaktadır (Fenech, 2000; Fenech, 2007; Mateuca, 2006).

Mikronükleus oluşum mekanizmaları (Mateuca, 2006);

- DNA kırıkları sonucu oluşan asentrik kromozom/ kromatid fragmanları
- Tüm kromozomun/kromatidin kinetokorları üzerindeki tubulin fiberlerinin tutunmasında bozukluk sonucu nükleus dışında kalması
- Sentromerik DNA'da kusurlar sonucu kromozom/kromatidlerin nükleus dışında kalması
- Kinetokor proteinlerinde kusurlar sonucu kromozom/kromatidlerin nükleus dışında kalması
- Histon modifikasyonları ve geç replikasyon
- Nükleoplazmik köprü oluşumu ve kırılması sonucu mikronükleus oluşması
- BFB (*bridge-fusion-break*)(kırık-füzyon-kırık) döngüleri sonucu oluşan gen amplifikasyonları nedeniyle nükleer tomurcuklanma

MN sıklığını değerlendirmek için hücre seçim kriterleri (Fenech, 2007; Fenech ve ark., 2003)

1. Hücreler iki çekirdekli(binükleer (BN)) olmalı,
2. BN hücrelerdeki iki nükleusun sağlam nükleer membranları olmalı ve aynı sitoplazmik sınırdaki yerleşmeli,
3. BN hücre içindeki iki nükleus yaklaşık aynı boyutta, aynı boyanma paterni ve aynı boyanma yoğunluğunda olmalı,
4. BN hücredeki iki nükleus bir nükleoplazmik köprü ile birleşebilir, ancak bu köprü nükleus çapının $\frac{1}{4}$ 'ünden fazla olmamalı,
5. BN hücrede iki hücre birbirine temas edebilir ancak birbiri üzerine binmemelidir. İki nükleus birbiri üzerine biniyorsa sadece nükleuslar birbirinden ayrılabilirse değerlendirilmeli,
6. BN hücrelerin stoplazmik sınırı veya membranı sağlam olmalı ve komşu hücrelerin stoplazmik sınırından ayırt edilebilmeli,
7. MN (mononükleer), BN(binükleer), TriN(trinükleer) ve multiN(multinükleer) hücreler ile nekrotik ve apoptotik hücreler MN frekansı yönünden skorlanmamalıdır.

Değerlendirme (Fenech, 2007):

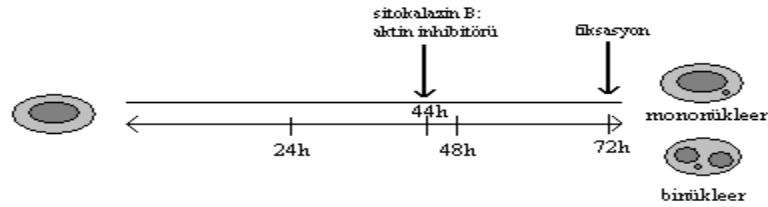
- * MN, nükleusa morfolojik olarak benzer, ancak küçük, çapı ortalama asıl nükleus çapının $\frac{1}{16}$ - $\frac{1}{3}$.ü arasında olmalı, BN hücrede bir asıl nükleusun kapladığı alanın $\frac{1}{256}$ - $\frac{1}{9}$ 'una karşılık gelmektedir.
- * MN nin asıl nükleus ile ilişkisi olmamalı,
- * MN asıl nükleus ile benzer boyanma yoğunluğunda olmalı,
- * Hücreler sağlam nükleer membranlı, binükleer olmalı ve aynı stoplazma sınırı içine yerleşmeli,
- * Her lam için 1000 binükleer MN sayılmalıdır.

CBMN yöntemi kültüre insan ve/veya memeli hücrelerinde mikronükleus ölçümü için önerilen bir yöntemdir. Skorelama özellikle mikronükleus gösterme potansiyeline sahip bir kez bölünen binükleer hücrelerle sınırlıdır. Geçen 17 yıl boyunca CBMN assay kromozom kırıkları, DNA hatalı onarımı, kromozom

kayı, nekroz, apopitozis ve sitostazis incelemelerinde kullanılabilirdi için kapsamlı bir yöntem haline gelmiştir. Bu metod aynı zamanda nükleoplazmik köprü oluşumu, telomer veya DNA sonucu oluşan disentrik kromozomların da bir göstergesidir. Gen amplifikasyonunun bir göstergesi olan nükleer tomurcuklanmalar da bu yöntemle ölçülebilir.

Son yıllarda bu test *cytome assay* olarak kabul edilmektedir. Bunun temeli, sistemdeki her hücrenin canlılık durumuna göre sitolojik olarak skorlanabilmesi (nekroz, apopitozis), mitotik duruma göre (mononükleer, binükleer, multinükleer hücreler), kromozomal hasar veya instabilite durumuna göre (MN, NPB, NBUD), mikronükleus veya nükleus içindeki sentromerik prob sinyal pozitifliğine göre değerlendirilebilmesidir.

Ex vivo ve *in vivo* lenfosit analizinde inkübasyondan 44 saat sonra sitokalazin B eklenmesi ile sitokinez durdurulur. Böylece mononükleer (bölünmeyen) ve binükleer hücreler (*in vitro* kültürde bir kez bölünen) ayırddedilebilir. Sitokalazin B, sitokinezin tamamlanması için gerekli mikroflaman halkasının birleşmesini engeller. Bu koşullar altında mononükleer hücreler, *in vivo* biriken kromozomal/genomik mutasyonların seviyesini gösterirken, binükleer hücreler, *in vitro* mitoz sırasında ve daha öncesinde biriken hasarın derecesini gösterir.



Şekil 1.5. Sitokine baskılanmış mikronükleus yöntemi (*cytokinesis block micronucleus: CBMN assay*) sitokalazin B ekleme zamanı

CBMN yöntemi yapısal ve sayısal kromozom anomalilere neden olan klastojenik ve anojenik olayları tarayabilir. FISH ile sentromer ve kinetokor antikollarının kullanılması sonucunda kromozom tanımlanarak yöntemin duyarlılığını ve özgünlüğü artırabilir. Kinetokor proteini içermeyen veya sentromer probu ile işaretlenmeyen mikronükleuslar, asentrik kromozom fragmanları olarak tanımlanır (Catalan, 1995; Hando, 1994; Thierens, 2000).

Nükleoplazmik köprü oluşumu:

Nükleoplazmik köprülerin (*NPB*), anafaz sırasında disentrik kromozomların sentromerlerinin hücrenin farklı kutuplarına atılması sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Kromozom yeniden düzenlenmelerini değerlendirmek için kullanılmaktadır.

Nükleer membran oluşmadan, disentrik anafaz köprülerini nadiren de olsa görmek olasıdır. Çünkü, hücreler hızla anafaz ve telofaza gireceklerinden, sitokinez tamamlanacak ve nükleoplazmik köprüler kırılacaktır. Ancak Sitokinezin blokla mikronükleus yöntemi (*CBMN*: cytokinesis blocked micronucleus assay) ile sitokinez baskılanacağı için, *NPB* gözlenen hücreler birikecektir ve sonunda nükleer membran oluşsa da *NPB* lerin gözlenmesine olanak verecektir.

Nükleer tomurcuklanma:

Nükleer tomurcuklanma (*NBUD*: nuclear budding) gen amplifikasyonunun bir belirteçidir. Memeli hücrelerinde yapılan *in vitro* deneylerde amplifiye DNA'nın nükleusun periferindeki özgün alanlara yerleşmiş olduğu ve mitozun S fazında *NBUD* (nükleer tomurcuklanma) oluşturarak mikronükleusun giderildiği gösterilmiştir (Shimizu ve ark., 1998, 2000). Gen amplifikasyonunu uyaran seçici koşullar altında nükleer promotor meydana gelmektedir.

Nükleer promotor S fazı sırasında ortaya çıkar ve mikronükleus ile benzer morfolojidedir, ancak bunlar nükleusa dar veya geniş nükleoplazmik materyalden oluşan bir sap ile bağlanmaktadır. *MN* ekspresyonu, DNA hipometilasyonunun bir belirteci olarak da kullanılmaktadır. *DNMT3B* geninde mutasyon sonucu

oluşan *ICF* (*Chromosome instability and immunodeficiency syndrome*) sendromunda 1., 9., 16. kromozomların heterokromatinlerinde dekonpensasyon ve bunun sonucunda da bu kromozomların mikronükleus veya nükleer tomurcuklanma ile kayıpları gözlenmiştir. Mikronükleus ekspresyonu satellit DNA hipometilasyonunun bir belirteci olsa da aynı zamanda DNA tamiri veya hücre siklusunda görev alan *housekeeping* genlerdeki veya komşuluğundaki CpG adacıklarının hipermetilasyonu ile gen ifadesinin ortadan kalkmasıyla da ortaya çıkmaktadır. Örneğin mitotik içcik kontrol genleri APC, BUBR1 ve hCDC4 genlerinin hipermetilasyonu bunların ekspresyonunu azaltarak MN oluşumuna yol açan kromozom yanlış segregasyonlarına neden olur. BRCA1 ve BRCA2, ATM gibi DNA tamir genlerinin fonksiyon kaybı veya susturulması MN frekansında artışa yol açmaktadır (Fenech, 2006).

Mikronükleus içindeki kromozomların, tüm kromozom veya asentrik fragman olup olmadığı kinetokor antikolları kullanılarak değerlendirilebilmektedir. Kromozomların sentromerik bölgeleri, sentromerlerde bulunan kinetokor proteinlerine karşı olan antikolların kullanımı ile taranabilmektedir. Ancak bu yöntem kromozomların birbirinden ayırılmasına izin vermez ve hasarlı kromozomlardaki kinetokor yokluğuna bağlı kromozom kaybını tarayamaz. Bu nedenle kromozomların tanımlanmasını sağlayan *in situ* hibridizasyon yöntemi ile mikronükleus yöntemi birleştirilerek, mikronükleus içindeki kromozomların kökeni doğru şekilde ortaya konmuş olur (Camps, 2005).

Mikronükleus mitozdan sonra farklı yollara girebilir;

- Apoptozis ile uzaklaştırılabilir,
- Asıl nükleus içine tekrar girebilir,
- Hücreden çıkarılabilir,
- Hücre sitoplazması içinde nükleus dışı bir yapı olarak kalabilir.

Mikronükleus çalışması lenfositler, fibroblastlar ve dökülmüş epitelyal hücrelerle yapılabilmektedir.

Mikronükleus Değerlendirmesinin Kullanım alanları;

- *In vivo* genotoksin maruziyetinin değerlendirilmesi,
- *In vitro* genotoksisite testleri,
- Nütrigenomiks çalışmaları,
- Farmakogenomik,
- Kanser riskinin değerlendirilmesi olarak sıralanabilir.

1.3.3. DNA' daki hasarı saptayan diğer yöntemler

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

Comet testi veya tek hücre jel elektroforez (SCGE) testi olarak bilinen yöntem, 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 (Tice ve ark., 2000; Collins ve ark., 1997; Collins ve ark., 2001; Collins, 2008). 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 karsinojeniteyi 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 popülasyonlarında *in vivo* ve *in vitro* çalışmalara olanak sağlaması, maruziyet durumundaki insan popülasyonlarında ve çevresel monitoring çalışmalarında kullanılması, ekogenotoksisite çalışmalarında yarar sağlamasıdır. Oksidatif DNA hasarı, farklı beslenme faktörlerinin koruyucu etkisi bu yöntem ile çalışılmıştır (Danadevi ve ark., 2004; Rozgaj, 2002; Tice ve

ark., 2000; Collins ve ark., 1997; Collins ve ark., 2001; Rothfuss, 2006; Henderson, 1998).

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 katotdan anoda doğru taşınır (Collins ve ark., 2001). 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 yapılabilir (Albetini ve ark., 2000). 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 (Shama ve ark., 2003). Comet testinin çapraz bağlayıcı ajanların oluşturduğu hasarı belirlemede negatif sonuç verdiği bir çalışmayla tespit edilmiştir (Henderson ve ark., 1998).

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 (Soriano ve ark., 2007). Kimyasallarca indüklenen gen mutasyonu, kromozomal hasarı belirlemede faydalı ama pahalı bir testtir. Bu testte kullanılan hücreler timidin kinaz lokusu heterozigot olan hücrelerdir (Clements, 2000) .

1.3.3.3. HPRT mutasyon yöntemi

HPRT geni X kromozomu üzerinde bulunur ve pürin bazı biyosenteziyle ilgili enzimi kodlar. Bu gende meydana gelen mutasyon ile HPRT enzimi kaybolmaktadır. Bu durumda hücreler ancak 6-tioguanin (6-TG) muamelesi ile hayatta kalabilmektedirler. HPRT yöntemi, somatik gen mutasyonlarının *in vivo* ya da *in vitro* ortamlarda farklı memeli kültür hücrelerinde, pozitif olarak seçilmesi prensibine dayanır. DNA baz çifti değişimlerini, büyük ya da küçük çaptaki delesyonları, inversiyonları ve heterolog kromozom rekombinasyonları gibi genetik değişimleri büyük ölçüde yansıtmaya yeteneğine sahiptir. Çok yaygın olarak kullanılmaktadır (Albertini ve ark., 2000).

1.3.3.4. Muta mouse / Big blue yöntemi

Temelde transgenik (TG) mouse sistemleri big blue, mutamouse ve gpt deltidir. 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 (Nohmi, 2000).

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Test maddeleri

Bu çalışmada kullanılan maddeler gıdalarda yaygın olarak kullanılan askorbik asit, benzoik asit, sitrik asit ve sorbik asittir.

2.1.2. Test maddelerinin genel kimyasal formülleri

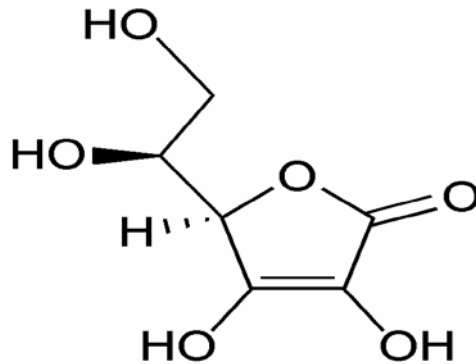
Deneyde kullandığımız test maddelerinin adları ve açık formülleri aşağıda verilmiştir.

Askorbik asit: Askorbik asit oksijen tutma özelliğine sahip olması nedeniyle, antioksidan olarak kullanılır. Yağların ve yağlı besinlerin uzun süre saklanabilmesi, beyaz renkteki sebze ve meyvelerin kararmasının önlenmesi amacıyla kullanılır.

Molekül formülü: $C_6H_8O_7$

Moleküler ağırlığı: 192.123 g/mol'dür

Yapısal formülü:



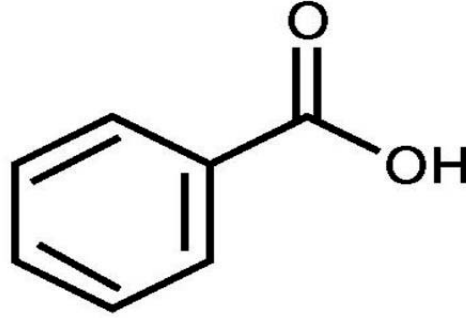
Şekil 2.1. Askorbik asit yapısal formülü

Benzoik asit: Benzoik asit antimikrobiyal olarak kullanılan zayıf bir organik asittir. Katı beyaz kristal yapısında bir maddedir.

Molekül formülü: $C_7H_6O_2$

Moleküler ağırlığı: 122,13 gr' dır

Yapısal formülü:



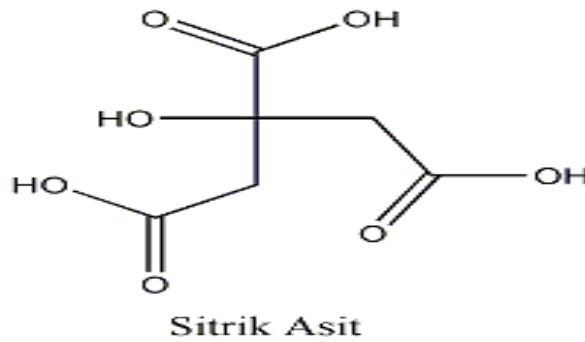
Şekil 2.2. Benzoik asitin yapısal formülü

Sitrik asit: Sitrik asit (2-hidroksi-1,2,3 propan tri karboksilik asit) gıdalarda antioksidan asitleştirici olarak kullanılan zayıf organik bir asittir. Suda çözünebilir, yarı şeffaf, renksiz veya beyaz kristal tozlar halindedir.

Molekül formülü: $C_6H_8O_7-H_2O$

Molekül ağırlığı: 210,14 gr' dır

Yapısal formülü:



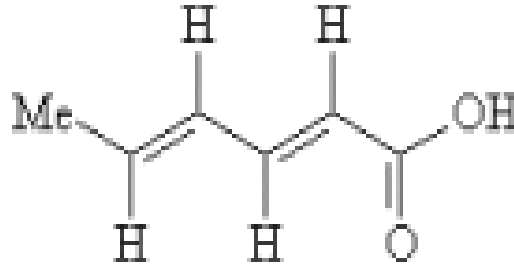
Şekil 2.3. Sitrik asit yapısal formülü

Sorbik asit: Polimer yapıda beyaz veya sarı beyaz renkte, toz veya granüller halde kendine has hafif bir kokusu olan tadıldığında ekşilik hissi uyandıran doymamış bir yağ asididir.

Molekül formülü: $C_6 H_7 K O_2$

Molekül ağırlığı: 150,22 g/mol.

Yapısal formülü:



Şekil 2.4. Sorbik asit yapısal formülü

2.1.3. Test maddelerinin dozları ve hazırlanışı

Çalışmada kullanılan test maddelerinin suda çözülüp çözülmediği denenmiştir, askorbik asit ve sitrik asit' in suda çözülebildikleri görüldüğü için çözücü olarak steril distile su kullanılmıştır. Benzoik asit ve sorbik asit suda çözünemedikleri için çözücü olarak DMSO kullanılmıştır. Askorbik asit, Benzoik asit, Sitrik asit ve Sorbik asit' in 1000, 500, 250 ve 100 $\mu\text{g/ml}$ dozlarında çalışılmıştır. Askorbik asitten 0.176 gr hassas terazi ile tartılmış 2000 μl steril distile suda çözülmüştür. Benzoik asit 0.122 gr hassas terazi ile tartılmış 2000 μl DMSO da çözülmüştür. Sitrik asit 0.192 gr hassas terazi ile tartılmış 2000 μl steril distile suda çözülmüştür. Sorbik asit 0.108 gr hassas terazi ile tartılmış 2000 μl DMSO da çözülmüştür. İkinci doz hazırlanırken askorbik asit ve sitrik asitte ilk doz yarı yarıya steril distile su ile benzoik asit ve sorbik asit ise DMSO da seyreltilmiştir. Sonuçta 1000 $\mu\text{g/ml}$ ve 500 $\mu\text{g/ml}$ olmak üzere iki doz elde edilmiştir. 500 $\mu\text{g/ml}$ olan iki nolu çözelti %50 oranında seyreltilerek üç nolu 250 $\mu\text{g/ml}$ lik doz ve son olarak da 100 $\mu\text{g/ml}$ 'lik doz elde edilmiştir. Bu işlemler steril

şartlar altında hücre kültür kabininde yapılmıştır. Deney sırasında içinde besiyeri ve kan bulunan tüplere her bir dozdan 50 µl ilave edilmiştir.

2.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler

Kromozom Medyum B (Biochrom' dan), Mitomycin C (0.3 µg/ml, Sigma' dan), Cyt-B (6 µg/ml), Giemsa (Fluka' dan), KCL (%0.1),1 Fiksatif (1:3 metanol: glasiyel asetik asit).

2.2. Metod

Bu çalışmada *in vitro* insan periferel kan lenfosit kültüründe, CBMN (Sitokinez bloklama mikronukleus) tekniği kullanılmıştır.

2.2.1. Lenfosit kültürü

Sigara içmeyen, ilaç kullanmayan, 20-30 yaşları arasında sağlıklı erkek ve bayan 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.

2.2.2. Test maddelerinin uygulanması

İnsan periferel lenfositlerine, belirli dozlarda hazırlanmış maddeler 24 ve 48 saatlik süreçlerde uygulanmıştır. 24 saatlik uygulama için, kan ekimi yapıldıktan sonra kültür süresinin 48. saatinde, 48 saatlik uygulama için kültür süresinin başlangıcından itibaren 24 saat sonra 2,5 ml Kromozom Medyum B içeren kültür ortamına test maddelerinin hazırlanmış olan dozları eklenmiştir. Maddelerin tüplere eklenmesinin ardından, tüpler tekrar inkübatöre konularak, toplam kültür süresi olan 72 saat bitimine kadar 37 °C' lik CO₂ li inkübatörde bekletilmiştir. Kültür süresinin başlangıcından sonraki 44. saatte her tüpe sitokinez inhibitörü

olan cyt-B (6µg/ml) ilave edilmiş ve tüpler hafifçe sallanarak karışmaları sağlanmıştır.

2.2.3. Lenfositlerin izolasyonu

72 saatlik kültür süresinin bitiminde, tüpler 1200 rpm de 15 dakika santrifüj edilmiş, santrifüjden sonra, tüplerdeki süpernatant kısımlar atılmıştır. Tüplerin dibinde kalan ve hücrelerin olduğu 0,7-1 ml lik sıvı iyice karıştırılarak hücrelerin homojen olarak dağılması sağlanmıştır. Bu işlemin ardından deney günü 2 saat önceden hazırlanmış olan ve 37 °C sıcaklıktaki hipotonik solüsyon (% 0,4 KCL) damla damla ilave edildikten sonra tüpler oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Süre bitiminde 1200 rpm' de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Tüpün dibindeki 0,7-1 ml lik kısım pastör pipetiyle homojenize edildikten sonra, tüpler fiksasyon işlemi için hazır hale gelmiştir. Deneyden birkaç saat önce hazırlanarak buzdolabında bekletilen soğutulmuş metanol glasiyel asetik asit karışımı olan fiksatif damla damla ve karıştırılarak her tüpe 6 ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Fiksatifin eklenmesi süresi de içinde olacak şekilde toplam 20 dakika tüpler oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 1200 rpm de tekrar santrifüj uygulamasına geçilmiştir. Santrifüj bitiminin ardından tüplerdeki süpernatant atıldıktan ve çökelti homojenize edildikten sonra tüplere aynı şekilde fiksatif ilavesi yapılmıştır. Bu fiksasyon işlemi 3 defa tekrarlanmıştır. Son fiksasyon işleminin ardından tüpteki sıvının berraklaştığı ve lenfosit hücrelerinin dipte beyaz bir şekilde toplandığı görülmüştür. Üstteki süpernatant kısım dipte 0,5-0,7 ml sıvı kalacak şekilde atılmış, dipteki hücrelerin olduğu sıvı karıştırılarak preparat yapma işlemine hazır hale getirilmiştir.

2.2.4. Preparatların hazırlanması

Tüpün dibinde toplanan hücreler pastör pipetiyle homojen olacak şekilde karıştırılmıştır. Pastör pipetine 4-5 damla olacak şekilde hücre süspansiyonu çekilmiştir. Pastör pipeti, önceden hazırlanmış özel bir düzeneğe tutturularak deney gününden önce temizlenip, saf su içinde buzdolabında saklanan lamaların üzerine belirli bir yükseklikten, farklı alanlara birer damla düşecek şekilde hücre

süspansiyonu damlatılmış, hücrelerin lam üzerine dağılması sağlanmıştır. Damlatma işleminin ardından preparatlar oda sıcaklığında kurumaları için 24 saat bekletilmiştir.

2.2.5. Preparatların boyanması

Lamlar, hazırlanmış olan %5lik Giemsa boyasında 12 dakika bekletilerek boyanmıştır. Boyama süresi bitiminde distile sudan geçirilmiş ve dik olacak şekilde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiş, mikroskopik incelemeler yapılmış ve olympus marka mikroskoba bağlı fotoğraf makinasıyla 40X ve 100X' lik objektifle fotoğraf çekimi yapılmıştır.

2.3. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda her iki donörün lenfosit kültüründe meydana gelen iki çekirdekli 1000' er hücredeki mikronükleuslar sayılmış; çözücü kontrol ile diğer uygulama verileri SPSS programında, ANOVA Dunnett's test ve Student T test ile değerlendirilmiştir.

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.

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

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 tekniği kullanılmıştır. Uygun kültür koşulları altında, 24 ve 48 saatlik sürelerde test maddelerinin farklı dört dozu uygulanarak; kan lenfositleri üzerinde bu maddelerin genotoksik etkisi tespit edilmeye çalışılmıştır. Test maddeleri 1000 µg/ml birinci doz, 500 µg/ml ikinci doz, 250 µg/ml üçüncü doz ve 100 µg/ml dördüncü doz olmak üzere 24. ve 48. saatlerde uygulanmış, pozitif mutajen olarak MMC (Mitomisin- C), negatif kontrol olarak DMSO ve distile su kullanılmıştır. Deney sonucu elde edilen preparatlardaki 1000 binüklead (iki çekirdekli) hücre içindeki MN sayısı hesaplanmıştır.

Standart istatistiksel veriler Dunnet T çoklu karşılaştırma testi 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. Ayrıca NBUD, NPB değerleride standart sapmalara bağlı olarak çizelge oluşturulmuştur. CPI' nin (hücre proliferasyon indeksi) istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucu elde edilen verilerin ANOVA' ya göre anlamlı sonuçlar verdiği gözlenmiştir.

Askorbik asit verileri (çizelge 3.1) de gösterildiği üzere pozitif kontrol olarak kullanılan MMC ile 24 ve 48 saatlik muamele sonucunda elde edilen veriler negatif kontrol verilerine göre anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$). 24 saatlik muamelede doz azalırken MN sayısında belli bir etki yapmamıştır. 48 saatlik uygulamada doza bağlı olarak MN azalmıştır. Askorbik asitin 48 saatinde CPI değerleri azalmıştır. Askorbik asitin 24 ve 48 saatlerinde mükleer tomurcuk oluşumu negatif kontrolle yakın iken pozitif kontrolde yüksek değerde bulunmuştur.

Benzoik asit verileri (çizelge 3.2) de gösterildiği üzere pozitif kontrol olarak kullanılan MMC ile 24 ve 48 saatlik muamele sonucunda elde edilen veriler negatif kontrol verilerine göre anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$). Benzoik asit' in 1000 µg/ml

lik dozu 24 ve 48 saat sonucunda toksik etkiye sahipken diğer dozlarda MN sayısında birbirine yakındır.

Sitrik asit verileri (çizelge 3.3) de gösterildiği üzere, pozitif kontrol olarak kullanılan MMC ile 24 ve 48 saatlik muamele sonucunda elde edilen veriler negatif kontrol verilerine göre anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$). Sitrik asit' in 1000 µg/ml lik dozu 24 ve 48 saat muamele sonucunda toksik etkiye sahiptir. 24 saat lik uygulamada dozun azalmasıyla MN sayısında azalma görülmüştür. CPI sayısında ise azalma gözlenmiştir.

Sorbik asit verileri (çizelge 3.4) de gösterildiği üzere, pozitif kontrol olarak kullanılan MMC ile 24 ve 48 saatlik muamele sonucunda elde edilen veriler negatif kontrol verilerine göre anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$). Sorbik asit' in 1000 µg/ml ve 500 µg/ml' lik dozu 24 ve 48 saat muamele sonucunda toksik etkiye sahiptir. 24 ve 48 saat lik uygulamada dozun azalmasıyla MN sayısında azalma görülmüştür. CPI sayısında ise azalma gözlenmiştir.

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

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	MN sayısı \pm SS	CPI
24 saat	Negatif kontrol (su)	50 μ l	1000	9.0 \pm 0.00	0.79
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3 μ g/ml	1000	15.5 \pm 7.00*	0.27
	Askorbik asit	1000 μ g/ml	1000	10.0 \pm 1.50	0.56
		500 μ g/ml	1000	10.5 \pm 2.00	0.59
		250 μ g /ml	1000	10.0 \pm 1.50	0.68
		100 μ g/ml	1000	3.5 \pm 5.00	0.83
48 saat	Negatif kontrol (su)	50 μ l	1000	9.5 \pm 0.00	0.81
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3 μ g/ml	1000	17.5 \pm 8.00*	0.24
	Askorbik asit	1000 μ g/ml	1000	11.0 \pm 1.50	0.62
		500 μ g/ml	1000	8.5 \pm 1.00	0.64
		250 μ g /ml	1000	8.0 \pm 1.50	0.72
		100 μ g/ml	1000	5.0 \pm 4.50	0.77

MMC: Mitomisin-c, \pm SS: Standart sapma değerleri

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

Askorbik asit ile yapılan çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan MMC ile 24 ve 48 saatlik muamele sonucunda elde edilen veriler negatif kontrol verilerine göre anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$).

24 saatlik muamelede doz azalırken MN sayısında belli bir etki yapmamıştır. 48 saatlik uygulamada doza bağlı olarak MN azalmıştır. Askorbik asitin 48 saatinde CPI değerleri azalmıştır.

Çizelge 3. 2. Benzoik asit' in CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN frekansı ve CPI sonuçları

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	MN sayısı ±SS	CPI
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	1000	9.0±0.00	0.84
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	15.5±6.50*	0.27
	Benzoik asit	1000µg/ml	1000	Toksik	Toksik
		500 µg/ml	1000	11.0±2.00	0.55
		250 µg /ml	1000	9.0±0.00	0.68
		100 µg/ml	1000	11.5±2.50	0.63
48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	1000	8.5±0.00	0.75
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	17.5±9.00*	0.24
	Benzoik asit	1000µg/ml	1000	Toksik	Toksik
		500 µg/ml	1000	10.5±1.00	0.24
		250 µg /ml	1000	11.0±2.00	0.40
		100 µg/ml	1000	12.5±2.50	0.38

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

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

Benzoik asit ile yapılan çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan MMC ile 24 ve 48 saatlik muamele sonucunda elde edilen veriler negatif kontrol verilerine göre anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$).

Benzoik asit' in 1000 µg/ml lik dozu 24 ve 48 saat sonucunda toksik etkiye sahipken diğer dozlarda MN sayısında birbirine yakındır. CPI sayısında ise azalış gözlenmiştir.

Çizelge 3. 3. Sitrik asit' in CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN frekansı ve CPI sonuçları

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	MN sayısı ±SS	CPI
24 saat	Negatif kontrol (su)	50µl	1000	9.0±0.00	0.79
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	15.5±6.50*	0.27
	Sitrik asit	1000µg/ml	1000	Toksik	Toksik
		500 µg/ml	1000	11.0±2.00	0.41
		250 µg /ml	1000	8.5±0.50	0.78
		100 µg/ml	1000	6.5±2.50	0.92
48 saat	Negatif kontrol (su)	50µl	1000	9.5±0.00	0.81
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	17.5±8.00*	0.24
	Sitrik asit	1000µg/ml	1000	Toksik	Toksik
		500 µg/ml	1000	12.5±3.00	0.49
		250 µg /ml	1000	13.0±3.50	0.51
		100 µg/ml	1000	12.0±2.00	0.63

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

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

Sitrik asit ile yapılan çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan MMC ile 24 ve 48 saatlik muamele sonucunda elde edilen veriler negatif kontrol verilerine göre anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$).

Sitrik asit' in 1000 µg/ml lik dozu 24 ve 48 saat muamele sonucunda toksik etkiye sahiptir. 24 saat lik uygulamada dozun azalmasıyla MN sayısında azalma görülmüştür. CPI sayısında ise azalış gözlenmiştir.

Çizelge 3. 4. Sorbik asit' in CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik MN frekansı ve CPI sonuçları

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	MN sayısı ±SS	CPI
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	1000	9.0±0.00	0.84
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	15.5±6.50*	0.27
	Sorbik asit	1000µg/ml	1000	Toksik	Toksik
		500 µg/ml	1000	Toksik	Toksik
		250 µg /ml	1000	8.5±0.50	0.60
		100 µg/ml	1000	5.0±4.00	0.84
48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	1000	8.5±0.00	0.75
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	17.5±9.00*	0.24
	Sorbik asit	1000µg/ml	1000	Toksik	Toksik
		500 µg/ml	1000	Toksik	Toksik
		250 µg /ml	1000	12.0±3.50	0.42
		100 µg/ml	1000	6.5±2.00	0.44

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

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

Sorbik asit ile yapılan çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılan MMC ile 24 ve 48 saatlik muamele sonucunda elde edilen veriler negatif kontrol verilerine göre anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$).

Sorbik asit' in 1000 µg/ml ve 500 µg/ml' lik dozu 24 ve 48 saat muamele sonucunda toksik etkiye sahiptir. 24 ve 48 saat lik uygulamada dozun azalmasıyla MN sayısında azalma görülmüştür. CPI sayısında ise azalış gözlenmiştir.

Çizelge 3. 5. Askorbik asit' in 24 ve 48 saatlik NBUD ve NPB sonuçları

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	NBUD sayısı ±SS	NPB sayısı ±SS
24 saat	Negatif kontrol (su)	50µl	1000	8.0±0.00	1.5±0.00
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	17.0±0.035*	5.5±0.001*
	Askorbik asit	1000µg/ml	1000	6.5±0.95	1.0±0.77
		500 µg/ml	1000	6.5±0.95	1.0±0.77
		250 µg /ml	1000	11±0.99	1.5±1.00
		100 µg/ml	1000	6.5±0.95	1.0±0.77
48 saat	Negatif kontrol (su)	50µl	1000	6.0 ±0.00	1.0±0.00
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	18.0±0.00*	6.0±0.00*
	Askorbik asit	1000µg/ml	1000	5.5±0.99	1.0±1.00
		500 µg/ml	1000	5.0±0.98	1.0±1.00
		250 µg /ml	1000	7.5±0.93	1.0±0.37
		100 µg/ml	1000	8.0±0.84	2.0±1.00

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

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

Askorbik asit ile yapılan çalışmada nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü oluşumları incelendiğinde pozitif kontrol olarak kullanılan MMC ile 24 ve 48 saatlik muamele sonucunda elde edilen veriler negatif kontrol verilerine göre anlamlı bulunmuştur (p≤0,05).

Çizelge 3. 6. Benzoik asit' in 24 ve 48 saatlik NBUD ve NPB sonuçları

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	NBUD sayısı ±SS	NPB sayısı ±SS
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	1000	7.5±0.00	1.5±0.00
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	17.0±0.004*	5.5±0.06*
	Benzoik asit	1000µg/ml	1000	Toksik	Toksik
		500 µg/ml	1000	6.5±0.89	1.0±0.90
		250 µg /ml	1000	5.0±0.36	1.5±1.00
		100 µg/ml	1000	8.0±0.17	1.0±0.90
48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	1000	6.0±0.00	1±0.00
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	18±0.017*	6±0.003*
	Benzoik asit	1000µg/ml	1000	Toksik	Toksik
		500 µg/ml	1000	5.0±0.98	1.0±1.00
		250 µg /ml	1000	9.0±0.63	1.5±0.88
		100 µg/ml	1000	10.0±0.4	1.0±1.00

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

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

Benzoik asit ile yapılan çalışmada nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü oluşumları incelendiğinde pozitif kontrol olarak kullanılan MMC ile 24 ve 48 saatlik muamele sonucunda elde edilen veriler negatif kontrol verilerine göre anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$).

Çizelge 3. 7. Sitrik asit' in 24 ve 48 saatlik NBUD ve NPB sonuçları

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	NBUD sayısı ±SS	NPB sayısı ±SS
24 saat	Negatif kontrol (su)	50µl	1000	7.0±0.00	1.0±0.00
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	17.0±0.040*	5.5±0.00*
	Sitrik asit	1000µg/ml	1000	Toksik	Toksik
		500 µg/ml	1000	7.5±0.99	2.0±0.07
		250 µg /ml	1000	7.0±1.00	1.0±1.00
		100 µg/ml	1000	7.0±1.00	1.0±1.00
48 saat	Negatif kontrol (su)	50µl	1000	6.0±0.00	1.0±0.00
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	18.0±0.14*	6.0±0.00*
	Sitrik asit	1000µg/ml	1000	Toksik	Toksik
		500 µg/ml	1000	7.0±0.98	1.0±1.00
		250 µg /ml	1000	8.5±0.71	1.5±0.90
		100 µg/ml	1000	8.0±0.83	1.5±0.90

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

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

Sitrik asit ile yapılan çalışmada nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü oluşumları incelendiğinde pozitif kontrol olarak kullanılan MMC ile 24 ve 48 saatlik muamele sonucunda elde edilen veriler negatif kontrol verilerine göre anlamlı bulunmuştur ($p \leq 0,05$).

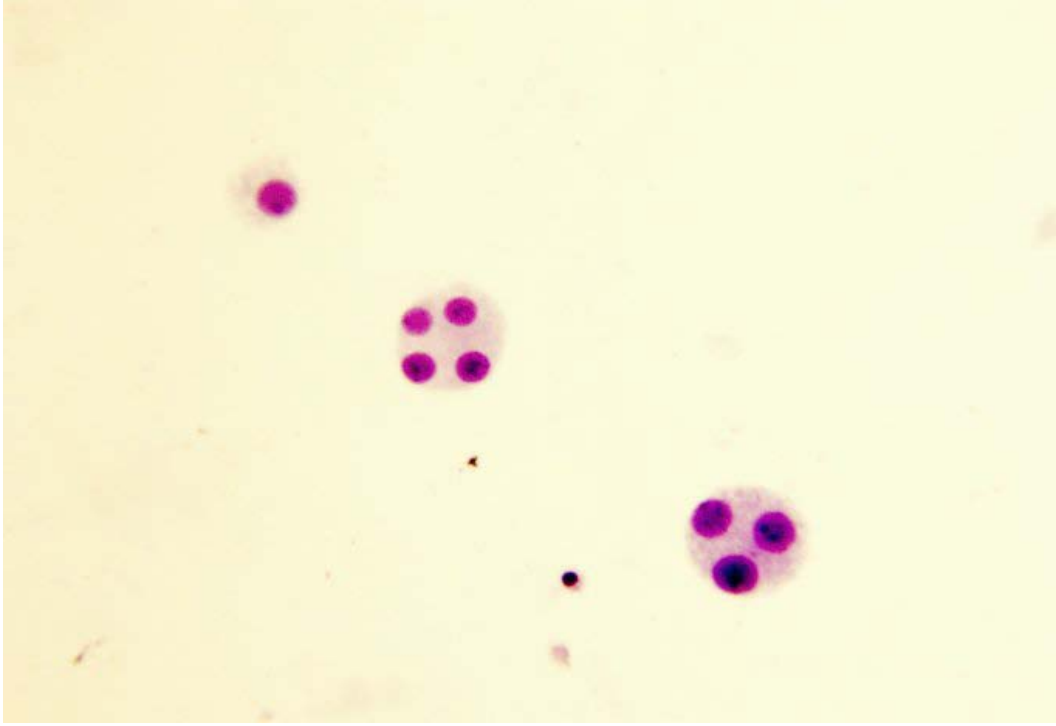
Çizelge 3. 8. Sorbik asit' 24 ve 48 saatlik NBUD ve NPB sonuçları

Süre	Madde	Doz	Sayılan hücre	NBUD sayısı ±SS	NPB sayısı ±SS
24 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	1000	7.5±0.00	1.0±0.00
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	17.0±0.018*	5.5±0.002*
	Sorbik asit	1000µg/ml	1000	Toksik	Toksik
		500 µg/ml	1000	Toksik	Toksik
		250 µg /ml	1000	7.0±0.98	1.5±0.66
100 µg/ml		1000	4.5±0.38	1.0±1.00	
48 saat	Negatif kontrol (DMSO)	50µl	1000	5.0±0.00	1.5±0.00
	Pozitif kontrol (MMC)	0,3µg/ml	1000	18±0.003*	6.0±0.01*
	Sorbik asit	1000µg/ml	1000	Toksik	Toksik
		500 µg/ml	1000	Toksik	Toksik
		250 µg /ml	1000	7.0±0.53	1.5±1.5
100 µg/ml		1000	4.5±0.97	1.0±1.00	

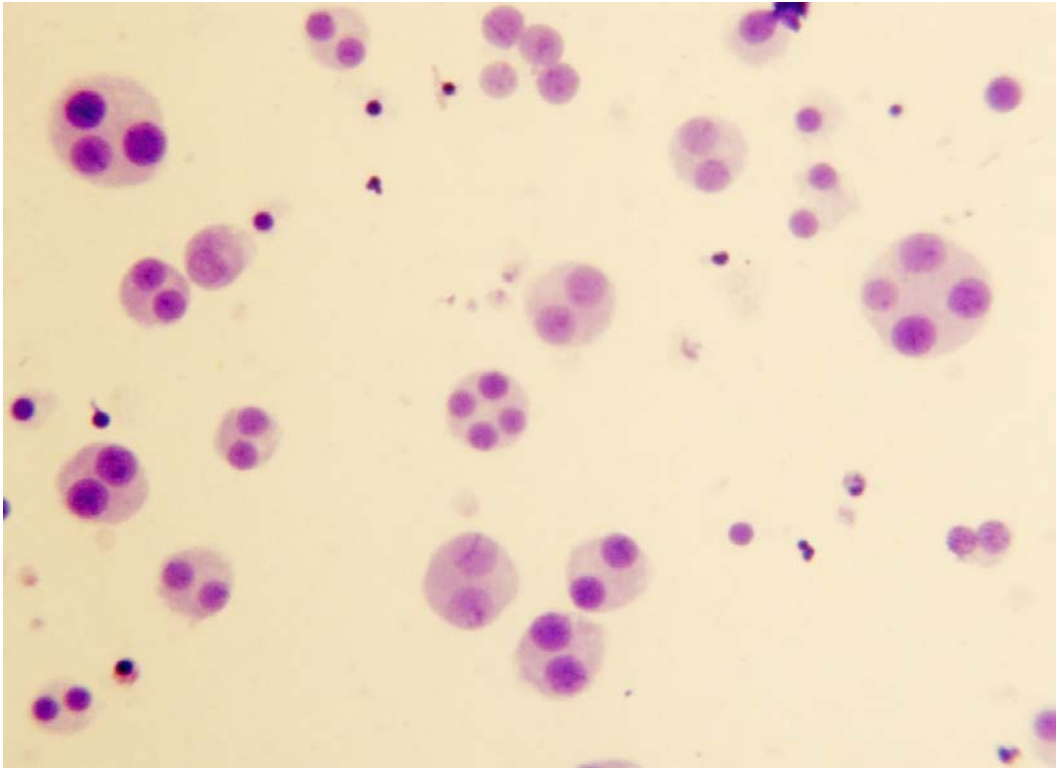
MMC: Mitomisin-c, ± SS: Standart sapma değerleri

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

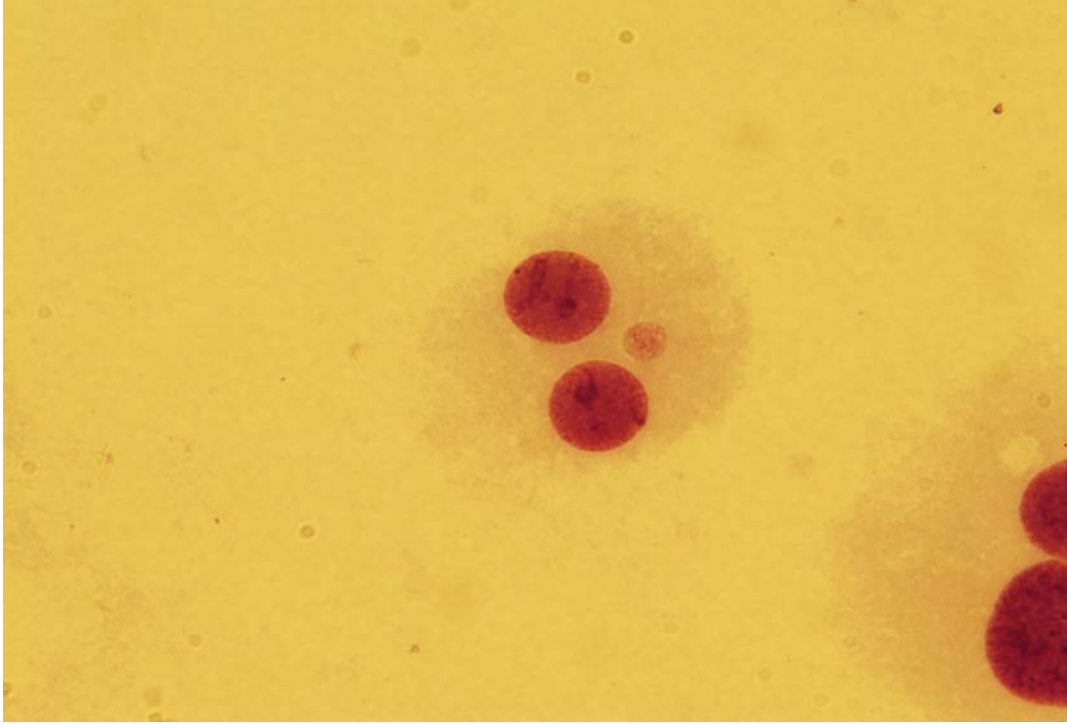
Sorbik asit ile yapılan çalışmada nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü oluşumları incelendiğinde pozitif kontrol olarak kullanılan MMC ile 24 ve 48 saatlik muamele sonucunda elde edilen veriler negatif kontrol verilerine göre anlamlı bulunmuştur (p≤0,05).



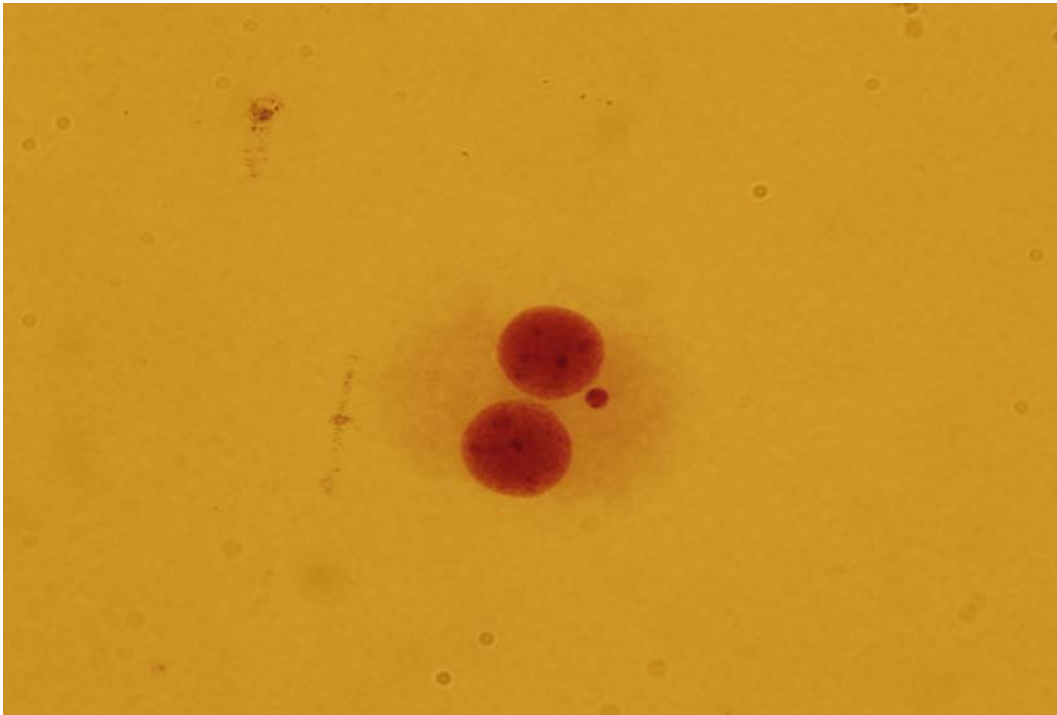
Şekil 3. 1. Askorbik asit ile muamele edilmiş (24 saat) insan lenfositlerinde oluşan tek, üç ve dört çekirdekli hücreler x400



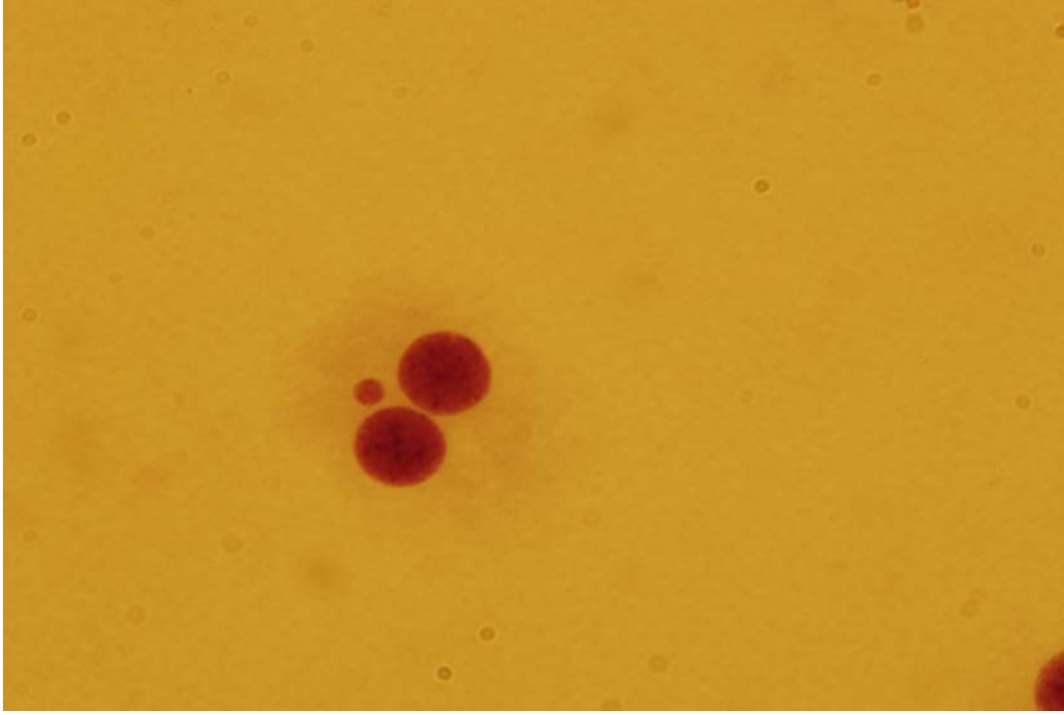
Şekil 3.2. Sitrik asit ile muamele edilmiş (48 saat) insan lenfositlerinde oluşan genel görünüm (Tek, çift ve çok çekirdekli hücreler) x400



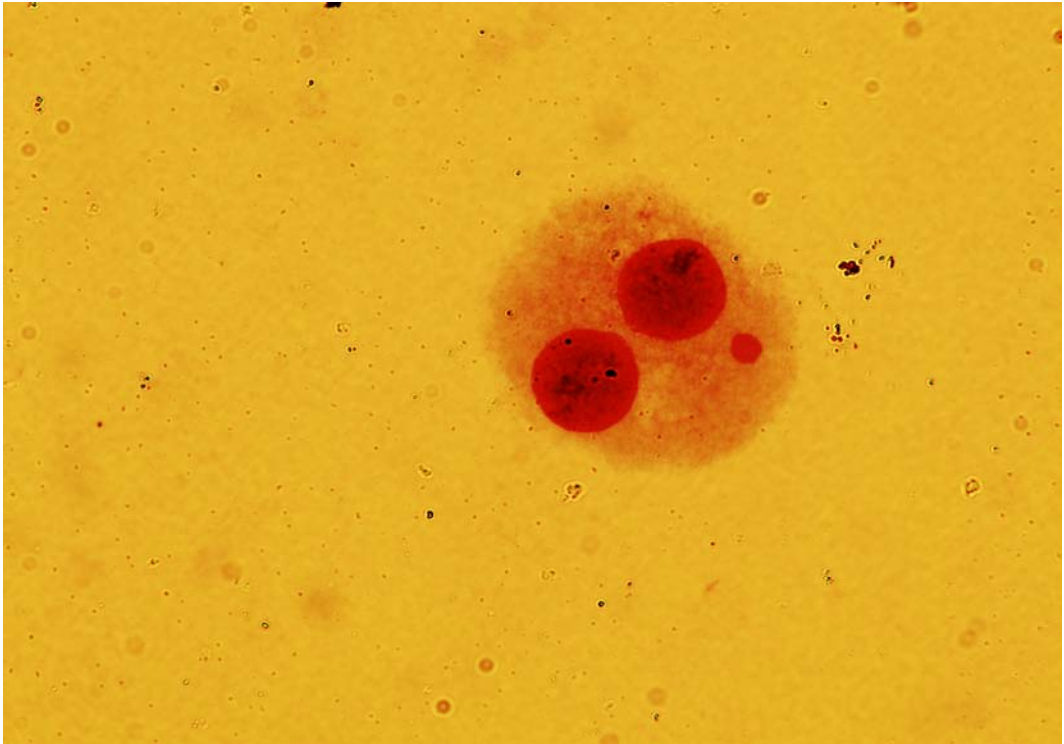
Şekil 3.3. Benzoik asit ile muamele edilmiş (48 saat) insan lenfositlerinde bir mikronükleuslu binükleat hücre x1000



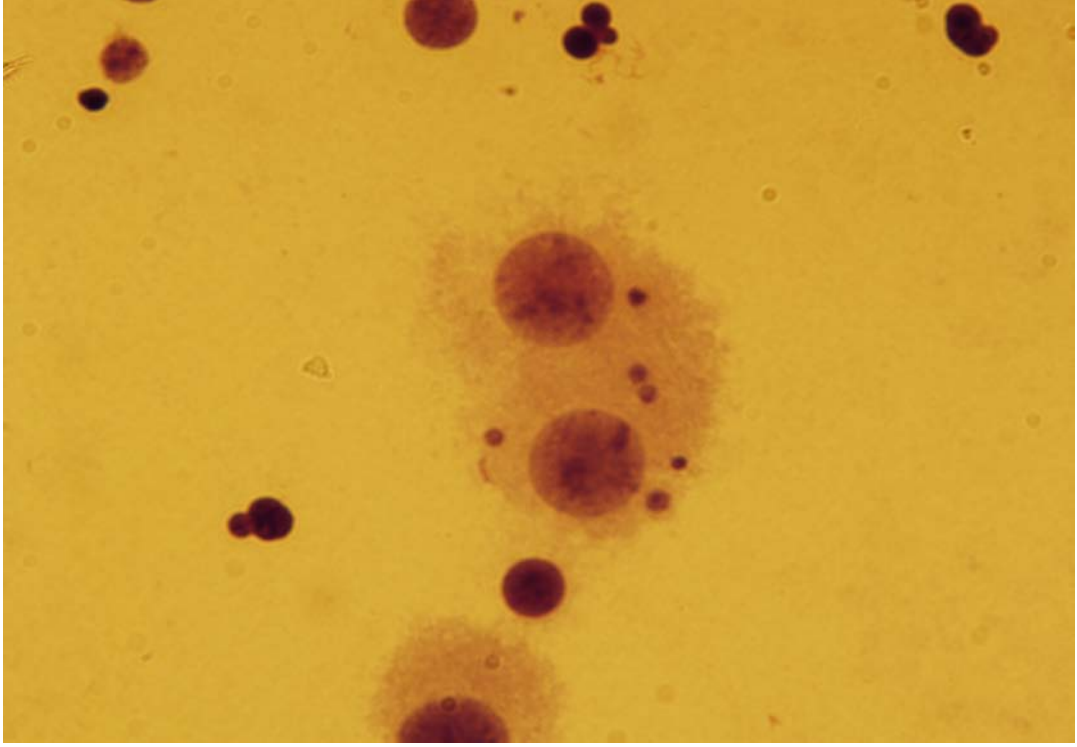
Şekil 3.4. Sorbik asit ile muamele edilmiş (24 saat) insan lenfositlerinde bir mikronükleuslu binükleat hücre x1000



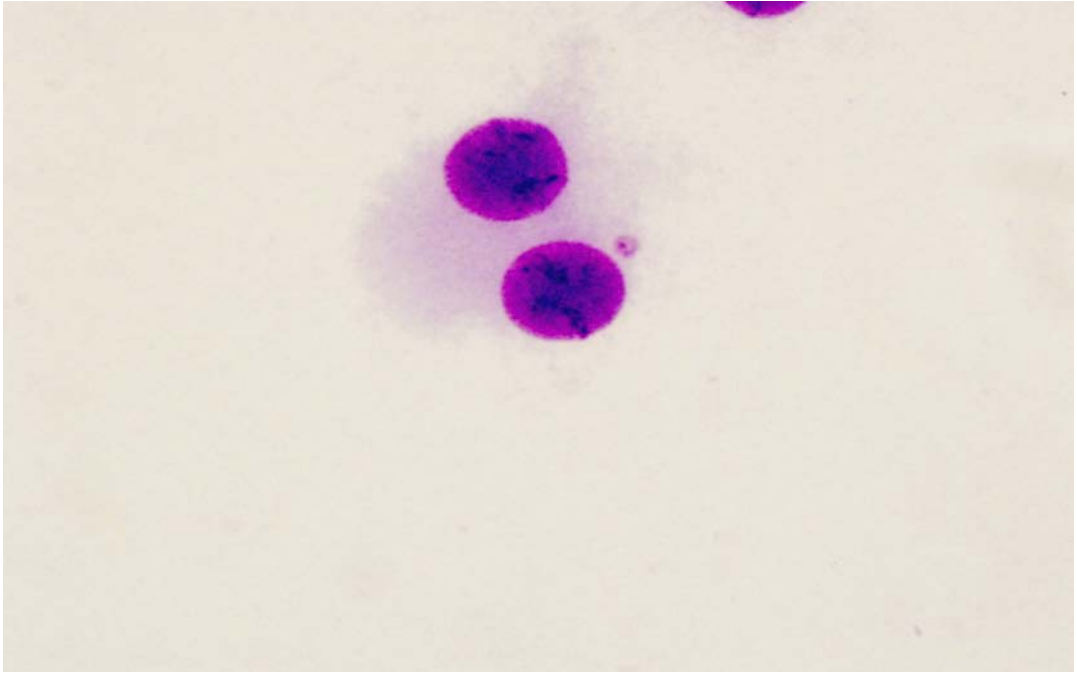
Şekil 3.5. Benzoik asit ile muamele edilmiş (24 saat) insan lenfositlerinde bir mikronükleuslu binükleat hücre x1000



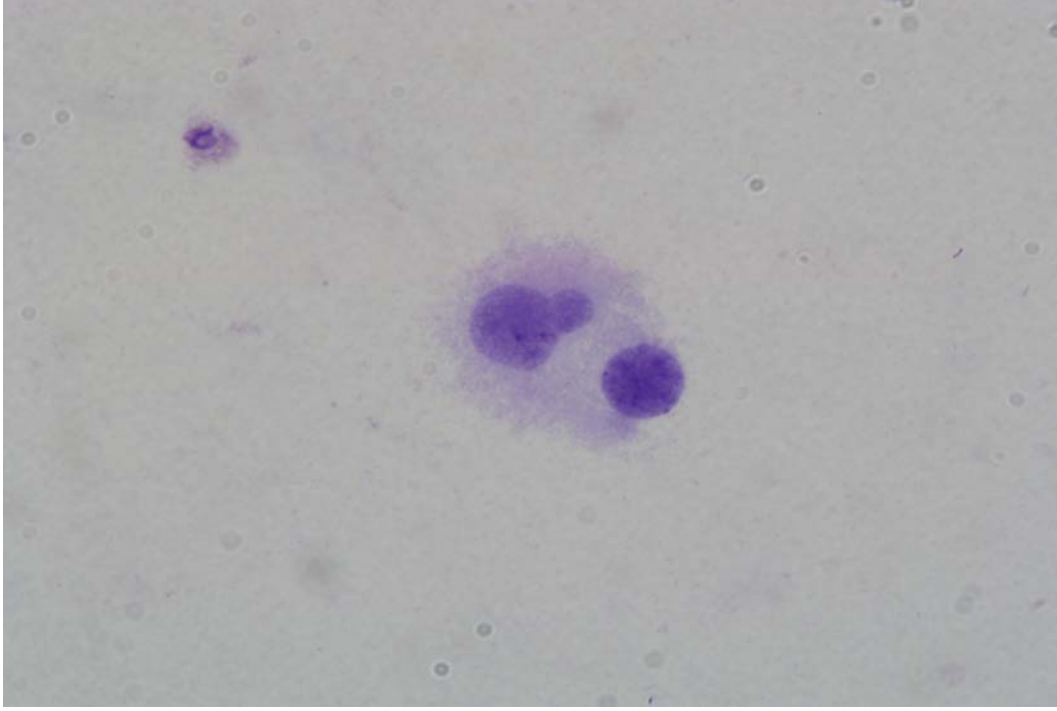
Şekil 3.6. Distile su ile muamele edilmiş (24 saat) insan lenfositlerinde bir mikronükleuslu binükleat hücre x1000



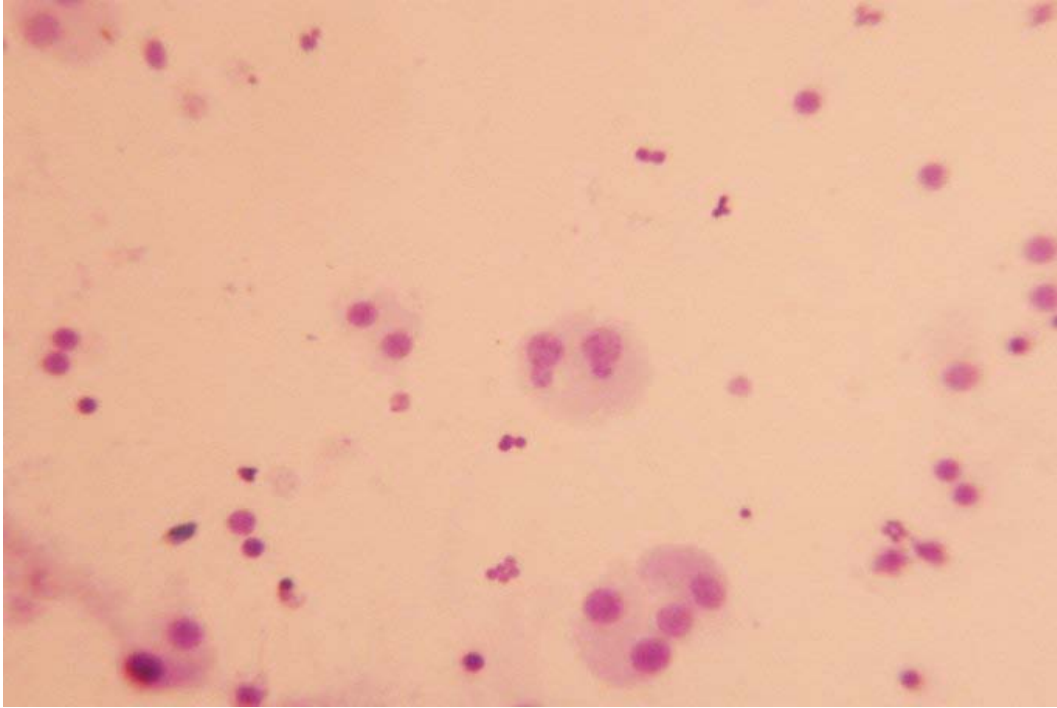
Şekil 3.7. Mitomycin-C (MMC) ile muamele edilmiş (48 saat) insan lenfositlerinde altı mikronükleuslu binükleat hücre x1000



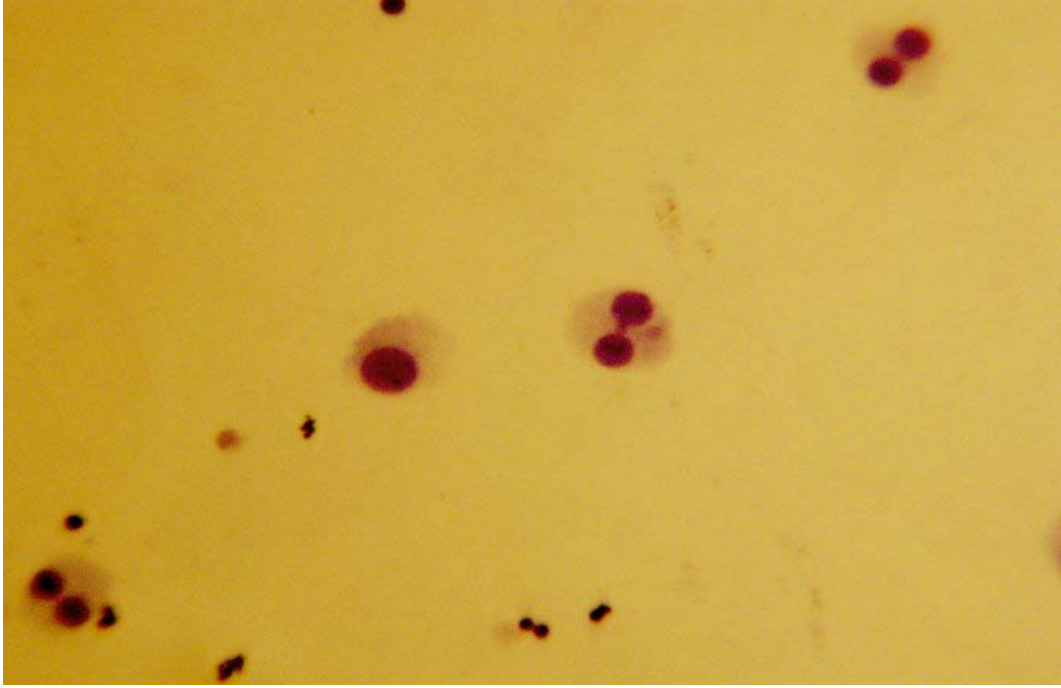
Şekil 3.8. DMSO ile muamele edilmiş (24 saat) insan lenfositlerinde bir mikronükleuslu binükleat hücre x1000



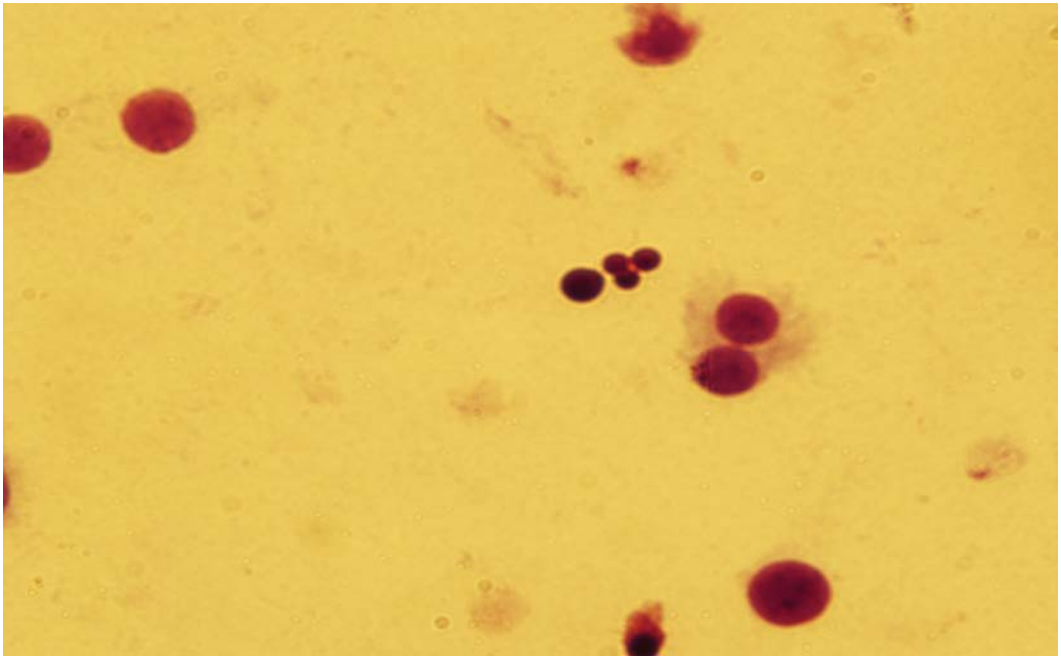
Şekil 3.9. Sorbik asit ile muamele edilmiş (24 saat) insan lenfositlerinde nükleer tomurcuklanma (NBUD: nuclear budding) oluşumu x1000



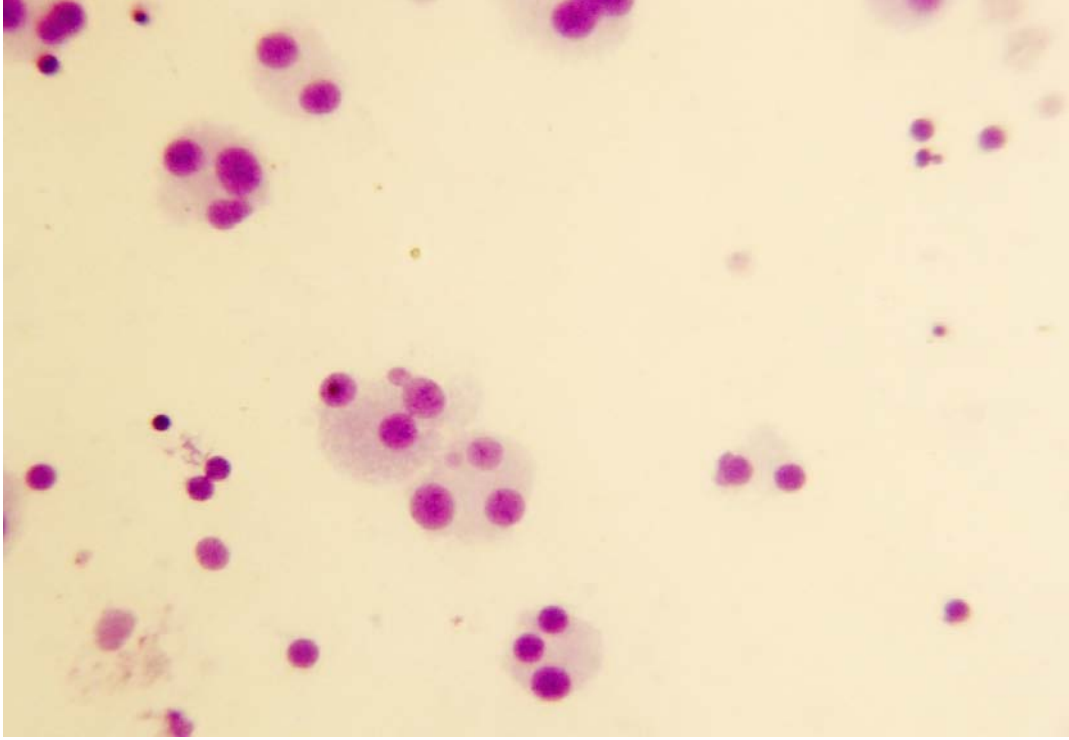
Şekil 3.10. Sitrik asit ile muamele edilmiş (24 saat) insan lenfositlerinde nükleer tomurcuklanma (NBUD: nuclear budding) oluşumu x1000



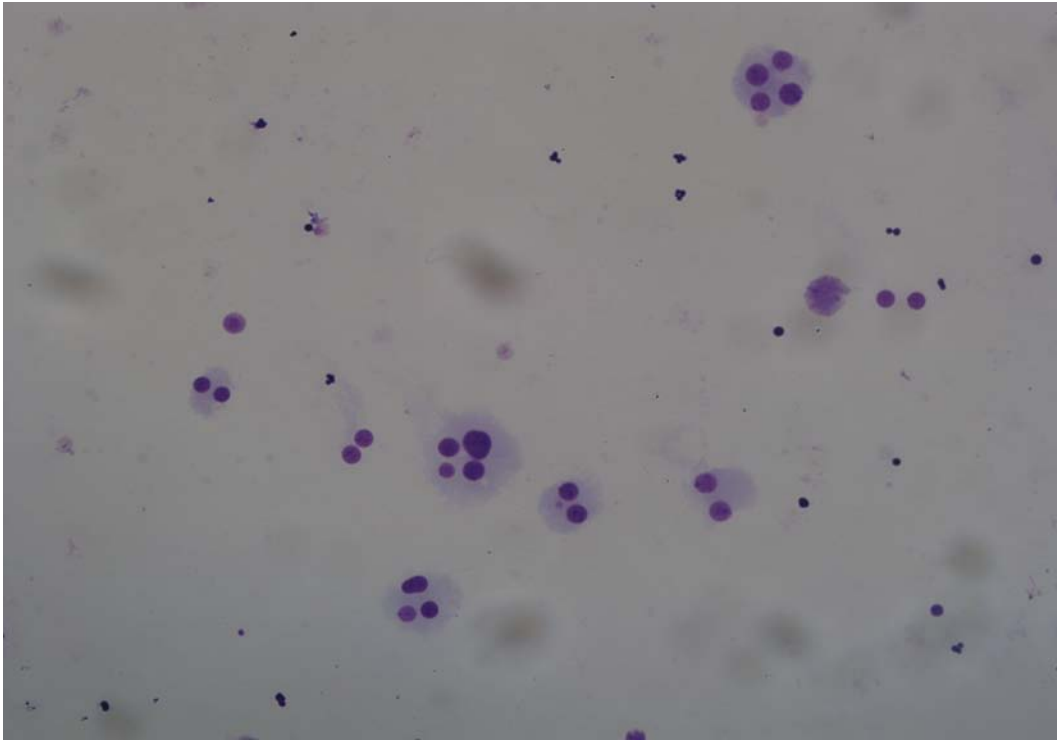
Şekil 3.11. Sitrik asit ile muamele edilmiş (24 saat) insan lenfositlerinde Nükleoplazmik köprü oluşumu x1000



Şekil 3.12. Sitrik asit ile muamele edilmiş (24 saat) insan lenfositlerinde nükleoplazmik köprü oluşumu x1000



Şekil 3.13. Mitomycin-C (MMC) ile muamele edilmiş (24 saat) insan lenfositlerinde Nükleer tomurcuklanma (NBUD: nuclear budding) ve Nükleoplazmik köprülerin (nucleoplasmic bridges; NPB) görünüşü x400



Şekil 3.14. Askorbik asit ile muamele edilmiş (48 saat) insan lenfositlerinde oluşan genel görünüm (Tek, çift ve çok çekirdekli hücreler) x400

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gıda katkı maddeleri, son yıllarda ev yapımı olmayan hazır gıdalarda yoğun olarak kullanılan maddelerdir. Gıdalarda antioksidan, antimikrobiyal ya da buna benzer birçok amaç için kullanılması ve günümüz insanının hazır yiyeceğe olan ilgisi nedeniyle maruz kalınan bu maddelerin, insanlarda uzun süreli tüketime bağlı olarak oluşturabileceği yan etkiler oldukça önem kazanmıştır. Öyle ki bazı katkı maddelerinin kullanımı, toksik ve karsinojenik özellikleri nedeniyle çeşitli ülkelerde yasaklanmıştır. Örneğin AF-2 (2-[2-furyl]-3-[5-nitro-2-furyl] acrylamide), yapılan çalışmalar sonucunda, bakteri ve insan hücrelerinde DNA hasarına ve yine bakteri, mantar, böcek ve insan hücrelerinde mutasyonlara ve memeli hücrelerinde kromozomal anomalilere neden olduğu için, 1965 yılında Japonya’da, son zamanlarda da tüm dünyada kullanımı yasaklanmış olan bir maddedir (IARC, 1983). Yine butter yellow (p-dimethylamino-azobenzene-azo bileşiği), deney hayvanlarında göstermiş olduğu karsinojenik özellikleri nedeniyle önce ABD’de ardından da Avrupa’da yasaklanmış olan bir gıda katkı maddesidir (IARC, 1975). Çeşitli kimyasalların karsinojenik özelliklerinin belirlenmesinde genotoksisite çalışmaları çok fazla tercih edilmektedir. DNA’da hasar oluşturan etki olarak da isimlendirilen genotoksik etki, kanser başlatıcı bir mekanizma olarak kabul edilmekte, bu nedenle de geliştirilen çeşitli yöntemler ile DNA’daki hasarın saptanması kanser riskinin belirlenmesinde yardımcı olabilmektedir (Salama ve ark., 1999).

Mikronükleuslar, asentrik fragment ve/veya mitozda kutuplara çekilememiş tam bir kromozomdan oluşurlar. Telofazda ayrı kalmış kromozomlar ve fragmentlerin etrafında çekirdek zarı teşekkül eder ve böylece ana nükleusdan daha küçük yapıda olan mikronükleuslar oluşur. Bu metod sadece bölünme özelliği gösterebilen hücrelerde kullanılabilir. Kromozom kayıplarının tam olarak belirlenebilmesi açısından MN metodu oldukça kullanışlıdır (Fenech, 2000).

Mikronükleus metodu, çeşitli gıda katkı maddelerinin genotoksik özelliklerinin belirlenmesinde, başka araştırmacılar tarafından da kullanılmıştır. Tatlandırıcı olarak kullanılan bir gıda katkı maddesi olan aspartamın sadece en yüksek dozda MN frekansını anlamlı seviyede artırdığı belirlenmiştir. Aspartamın

genotoksik etkisini, AMES test yöntemi kullanarak belirlemişlerdir. Aspartamın herhangi bir mutajenik etkisine rastlanamamıştır (Rencüzoğulları ve ark., 2004).

Gıdalarda antimikrobiyal ajan olarak kullanılan 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene'in ise mikronükleus oluşumunu indüklediği ortaya konmuştur (Borroto ve ark., 2004). Gıdalarda renklendirici olarak kullanılan quinoline sarısı ve brilliant siyahının insan lenfositlerinde kontrole göre tüm uygulamalarda MN frekansını artırdığını, bu iki maddeden Brilliant siyahının quinoline sarısına göre daha fazla MN oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir (Macioszek ve Kononowicz, 2004). Yapay tatlandırıcı olan maltitol, mikronükleus frekansını 24 saatlik uygulamada 1,25 ve 5 µg/ml'lik dozlarda, 48 saatlik uygulamada ise tüm dozlarda kontrole göre önemli oranda artmıştır (Canımoğlu ve Rencüzoğulları, 2006). Ağartıcı olarak kullanılan potasyum bromatın, 24 saatlik uygulamasında sadece 500 ve 550 µg/ml'de, 48 saatlik uygulamada ise tüm dozlarda mikroçekerdek oluşumunun anlamlı olarak indüklediği saptanmıştır (Kaya ve Topaktaş, 2007).

Antimikrobiyal bir madde olan bifenil, insan lenfositlerinde mikronükleus frekansını kontrol ve çözücü kontrole göre tüm dozlarda (10, 30, 50 ve 70 µg/ml) önemli oranda artırmıştır (Rencüzoğulları ve ark., 2008). Antimikrobiyal bir madde olan potasyum metabisülfid ise insan lenfositlerinde 25, 50, 100 ve 200 µg/ml'lik konsantrasyonlarda mikronükleus frekansını kontrole göre önemli oranda indükleyerek genotoksik etkili olmuştur (Yavuz-Kocaman ve ark., 2008).

Bir başka çalışmada, sodyum propiyonat, kalsiyum propiyonat ve potasyum propiyonatın genotoksik etkileri *A. cepa* kromozomlarında incelemiştir. Maddelerin 1000, 1500, 2000, 2500 ve 3000 µg/mL'lik konsantrasyonları, 24, 48 ve 72 saat süre ile uygulanmıştır. Maddelerin üçünün de mitotik indeksi önemli oranda düşürdüğü ve mikroskopik incelemelerde kromozomal aberasyon frekansını da önemli oranda artırdığı belirlenmiştir. Bu maddelerin etkisiyle c-mitoz, anafaz köprüleri, mikronükleus, yapışıklık, kalgın kromozomlar ve kromozom kırıklarına rastlandığı (Türkoğlu, 2007,2008) rapor edilmiştir.

Propionik asit ile yapılan bir çalışmada, bu maddenin *E. coli*'de DNA tamir testleri hariç, SOS chromo testi, *Salmonella*/mikrozom testi, *in vitro* kardeş kromatid değişimi testi ve *in vivo* mikronükleus testinde negatif etki gösterdiği sonucuna varılmıştır (Basler ve ark. 1987). Ames testi ile yapılan bir çalışmada Propionik asitin 160 µg/petri konsantrasyonunda, mutasyon frekansını artırdığı

belirtmiştir (Ohara ve ark., 1988). Bu maddenin *Drosophila*'da mitotik rekombinasyonlara neden olduğuda (Surjan, 1989) gösterilmiştir.

Gıdalarda koruyucu madde olarak kullanılan sodyum benzoatın, çin hamsteri hücrelerinde özellikle yüksek konsantrasyonlarda, kromozomal aberasyonu, kardeş kromatit değişimini (Abe ve Sasaki, 1977) ve mitotik indeksi (Ishidate ve Odashima, 1977) artırdığı, *Vicia faba* kök ucu hücrelerinde ise doza bağlı olarak mitotik indekste azalmaya, kromatin erezyonu ve anafaz köprülerine neden olduğu (Njagi ve Gopalan, 1982) bildirilmiştir.

Hasegawa ve ark., (1984) Sorbik asit, sodyum sorbat ve potasyum sorbatı, Çin Hamsteri V79 hücrelerinde *in vitro* olarak SCE, CA testi ile çalışmışlardır. Araştırmacılar, sodyum sorbatın SCE ve CA şeklinde mutasyonlarda artışa neden olduğunu belirlemişlerdir. Sorbik asit ve potasyum sorbatın en yüksek dozlarda (1000 ve 2000 µg/ml) aberasyonlara neden olduğu ve sodyum sorbatın, potasyum sorbat ve sorbik asite oranla daha fazla klastojenik etkili bir madde olduğu tespit edilmiştir. Tez çalışmamızda, Sorbik asit' in MN testinde 24 ve 48 saat muamelesinde 1000 ve 500 µg/ml'lik dozunda toksik etki gözlenmiştir, pozitif kontrol olarak kullanılan MMC ile 24 ve 48 saatlik muamelesi sonucunda elde ettiğimiz veriler negatif kontrol verilerine göre anlamlı bulunmuştur. Sorbik asit' in CPI sayısında azalma gözlenmiştir (Çizelge 3.4).

Sodyum nitritin mutajenik etkileri *in vivo* ve *in vitro* test yöntemleriyle araştırılmıştır. *In vivo* deneylerde, sodyum nitritin 1.72, 5.18, 15.55 ve 46.66 mg/kg'lık dozları rat, fare ve tavşana uygulanmıştır. Uygulama yapılan canlıların tamamında sodyum nitrit, kromozom aberasyon frekansını önemli oranda artırmıştır. Ayrıca farede mikronükleus oluşumunu da önemli oranda indüklemiştir. *In vitro* testler, BSC-1 ve HeLa hücrelerinde sodyum nitritin 265 ve 530 µg/ml'lik dozları kullanılarak yapılmıştır ve bu çalışmalarda da bu madde kromozom aberasyon frekansının önemli oranda arttığı görülmüştür (Luca ve ark., 1987).

Gıdalarda koruyucu olarak kullanılan sodyum nitrit, *in vitro* hamster embriyonik hücrelerinde 50 ve 100 mM'lık konsantrasyonlarda kromozomal aberasyonlara sebep olmuş, fare kemik iliği hücrelerinde SCE ve MN frekanslarını arttırmıştır (Tsuda ve ark., 1976; Ishidate ve Odashima, 1977).

Potasyum sorbat ve sodyum sorbatın genotoksik etkileri, Ames testiyle, Çin hamsteri ovaryum hücrelerinde HGPRT ve SCE testleriyle, fare ve Çin hamsteri

kemik iliği hücrelerinde MN metoduyla ve Çin hamsterinde CA ve SCE test yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmada kullanılan maddeler, *in vitro* yöntemlerde herhangi bir etki göstermemiştir. Potasyum sorbatın taze hazırlanmış ve bekletilmiş çözeltileri *in vivo* çalışmalarda herhangi bir etki göstermezken, sodyum sorbatın bekletilmiş solüsyonu zayıf klastojenik etki göstermiştir (Münzner ve ark., 1990).

Tatlandırıcı olarak kullanılan acesulfame-K'nın fare kemik iliği hücrelerinde 15, 30, 60, 450, 1500 and 2250 mg/kg dozlarda, doza bağlı olarak klastojenik etkide önemli bir artışa neden olduğu belirlenmiştir (Mukherjee ve Chakrabarti, 1997). Birçok gıdada renklendirici olarak kullanılan titanyum dioksidin Çin hamsteri ovaryum hücrelerinde SCE ve MN frekanslarını önemli oranda artırdığı saptanmıştır (Lu ve ark., 1998).

Gıdalarda sıklıkla kullanılan bir madde olan monosodyum glutamatın, rat hücrelerindeki genotoksik etkileri ile C vitamini, E vitamini ve quercetin'in koruyucu rolünü *in vivo* olarak araştıran bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada, Monosodyum glutamat 4 mg/g dozda karaciğer, böbrek ve beyinde oksidatif hasara neden olur iken, C ve E vitaminleri ile quercetin, bu hasarın oluşumunu inhibe etmiştir. Yine bu madde kemik iliğinde mikronükleus frekansını önemli oranda artırmış, ancak C vitamini ve quercetin bu oluşumu inhibe etmiştir. Ancak E vitamini, monosodyum glutamat etkisiyle oluşan genotoksik etkiyi inhibe edememiştir (Farombi ve Onyema, 2006). Tez çalışmamızda, Askorbik asit'in MN testinde 24 saatlik muamelede doz azalmasıyla MN sayısında belli azalama ya da artma gözlenmemiştir, 48 saatlik muamelede ise doza bağlı olarak MN sayısı azalmıştır. Askorbik asit' in CPI değerleri negatif kontrole göre azalmıştır (Çizelge 3.1).

Un ağartıcısı olan potasyum bromatın *in vitro* genotoksik etkileri, insan limfoblastoid TK6 hücrelerinde comet, mikronükleus ve timidin kinaz (TK) gen mutasyon testleri kullanılarak araştırılmıştır. Araştırmacılar, 4 saatlik uygulama sonucunda, alkali ve nötral comet testlerinde bu maddenin DNA'da tek ve çift zincir kırıklarına neden olduğunu, ayrıca mikronükleus oluşumunu ve TK mutasyonlarını doza bağlı olarak artırdığını bildirmişlerdir (Luan ve ark., 2007).

Genotoksik etkileri incelenen sitrik asit, organizmada birçok metabolik işlemde görev alan bir maddedir. Glikolizisde görev alan temel enzim olan fosfofruktokinazın inhibitörüdür. Yine yüksek yapılı organizmalarda, gıdalarda

bulunan kalsiyumun etkin şekilde kullanımında da görev almaktadır. Sitrik asit, kan plazmasında submilimolar düzeyde bulunur ve hemoglobine bağlı olmayan demirin biyolojik olarak aktivasyonunu kontrol eder. Nonheme demir ile birleşerek, demir sitrat komplekslerini oluşturur. Demir sitrat kompleksi, canlı organizmalarda demir metabolizmasında oldukça önemli bir rol oynamaktadır (Gautier-luneau ve ark., 2007). Kan plazmasında serbest olarak bulunan demirin aktifleştirilmesi, her ne kadar organizma için gerekli ise de bu işlem oldukça toksik olan serbest hidrojen radikallerinin oluşmasına neden olmaktadır (Pierre ve Fontecave, 1999). Demir sitrat kompleksi ile birlikte, H_2O_2 bulunan ortamda oldukça fazla oranda OH^- radikalleri oluştuğunu rapor edilmiştir (Gautier-luneau ve ark., 2007). Yine demir-sitrat kompleksi, mitokondriyal lipid peroksidasyonuna neden olabilmekte (Castilho ve ark., 1999; Santos ve ark., 2001), ferrik sitratın oto indirgenmesi sırasında OH^- radikalleri oluşabilmektedir (Gutteridge, 1991). Serbest radikaller, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküllerdir (Mercan, 2004). Serbest radikallerin yüksek düzeyde reaktif bileşikler olmaları, en dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektron taşımalarından ve bu nedenle kolayca diğer organik ve anorganik moleküllerle reaksiyona girmelerinden kaynaklanmaktadır. Serbest radikaller kararsız bir yapıda oldukları için, hücrede DNA gibi birçok organik moleküle reaksiyona girip, çeşitli anormalliklere neden olabilirler (Saraç, 2005).

Demirin aktifleştirilmesinde ve aynı zamanda çözünür hale gelmesinde önemli rolü olan sitrik asidin, bu kompleks etkileşimler sırasında serbest radikal oluşumuna sebep olması, bu maddenin gerçekten, uluslararası otoritelerin belirttiği gibi güvenli bir katkı maddesi olup olmadığı konusunu düşündürücü boyutlara ulaştırmaktadır (Gautier-luneau ve ark., 2007). Sitrik asitin göstermiş olduğu genotoksik etki, büyük bir olasılıkla demir sitrat kompleksleri nedeniyle oluşan serbest hidroksil radikalleri nedeniyledir (Gautier-luneau ve ark., 2007). Tez çalışmamızda, Sitrik asit' in CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik muamelesi sonucunda 1000 $\mu g/ml$ lik dozu toksik etkiye sahipken diğer dozlarda MN sayısı birbirine yakındır. CPI sayısı negatif kontrole göre azalmıştır (Çizelge 3.3). Benzoik asit' in CBMN tekniğine göre 24 ve 48 saatlik muamelesi sonucunda 1000 $\mu g/ml$ lik dozu toksik etkiye sahiptir, 24 saatlik muamelede doz azalırken MN sayısında azalma olmuştur. 48 saatlik muamelede dozlara bağlı

MN sayısı birbirine yakındır. CPI sayısı negatif kontrole göre azalmıştır (Çizelge 3.2).

Sonuç olarak, benzoik asit ve sitrik asitin 1000 µg/ml lik dozu ve sorbik asitin 1000 ve 500 µg/ml lik dozu toksik etkiye sahiptir. Askorbik asit, benzoik asit, sitrik asit ve sorbik asit' in diğer dozlarında insan kan lenfosit kültüründe mikronukleus sayısı incelendiğinde toksik ve genotoksik etki gözlenmemiştir. CPI sonuçları değerlendirildiğinde negatif kontrole göre azalma gözlenmiştir. Ayrıca nükleer tomurcuk ve nükleoplazmik köprü oluşum değerleri negatif kontrole verilerine göre anlamlı bulunmuştur.

KAYNAKLAR

- Abe, S. ve Sasaki, M., (1977). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals. *J. Natl. Cancer Inst.* **58**, 1635-1643.
- Akın, A. ve Sümer, S., (1991). The mutagenic effects of sodium nitrite and monosodium glutamate used as food additives demonstrated by the *Salmonella* microsome test system. *Microbiol. Bul.* **25**, 94-107
- Akman, M., (1983), *Bakteri Genetiği*, Cumhuriyet Üniversitesi Yayını, 2.Baskı, Sivas.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan ,A.T.,Norpha, H., Shuker, D.E.G., Tice, R.,Waters, M. D. ve Aitio, A.(2000), *IPCS guidelines for the monitoring ofgenotoxic effects of carcinogensin humans*, *Mutation Research*, **463**, 111-172
- Altıntaş, N., Örenay, S., Asçı, M., Reyhan, E., Türk, M., Yolasıgmaz,A.ve Altıntaş, N., (2005), “Karaciğer Kist Hidatiği Tedavisinde Albendazol Kullanan Hastalarda Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Çalışması”, *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, **4**, 235-237.
- Altuğ, T.,(1999), Gıda katkı maddeleri, genel başlıklar. Hekim ve Yaşam, 29-31.
- Altuğ, T., ve Elmacı, Y., (2001) Gıda katkı maddeleri. Tatlandırıcılar (T. Altuğ editör) Meta Basım, İzmir, 286.
- Anders, M.W. ve Dekant, W. (1994), *Conjugation-dependent carcinogenicity and toxicity of foreing compounds*, *Adv. Pharmacol*, **27**, 511-519.
- Ateş, A. (2002), “Moleküler Biyoloji”, 9. Bölüm, Selçuk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Konya, 113–121.
- Aydemir, N., Çelikler, S. ve Bilaloğlu, R. , (2005), “ In vitro genotoxic effects of the anticancer drug gemcitabine in human lymphocytes”, *Mutation Research*, **582** , 35–41.
- Bağcı, H. , (1985) *Yaz Okulu Moleküler Biyoloji Ders Notları*, Ortadoğu Teknik Üniversitesi, 25–55.
- Bağcı, H. , (1989) *Comparions of the Promutajen-Actwaty Capacity of S9 Liver Preperation From Rat and Fish, Using the in Vitro Salmonella Mutagenicity Test*, *Mutation Research*, 195–201.

- Bahçeci, Z., (2002), Moleküler Biyoloji. Öğrenci Kitabevi Yayınları, 323 s, Kırşehir.
- Barile, F.A., (1994), *Introduction to in vitro cytotoxicology mechanisms and methods*, CRC Pres., USA, 150-153.
- Basler, A., Von der Hude, W., Scheutwinkel, M., (1987), “Screening of the food additive propionic acid for genotoxic properties”, *Food Chem. Toxicol.*, **25**, 287-290.
- Başaran, A. Başaran, N., Solak, M., Güneş, H., (1995), “Tıbbi Biyoloji ve Genetik”, Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi Yayınları, 117-123.
- Başaran, A.A., (2002), “Farmakognozide tek hücre jel elektroforezi uygulamaları” *14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, Bildiriler, (Ed: K.H.C.Başer ve N.Kırimer), Ankara.
- Bilge, E., (1981), *Genetik*, Ar Yayın Dağıtım, No.4, İstanbul, 220- 231.
- Bolsover, S.R., (1997), Hyams, J.S., Jones, S., Shephard, E.A. ve White, H.A., *From genes to cell*, Willey-Liss, Inc., New York, USA ,119-130.
- Borroto, J.I.G., Perez, G., Creus, A., Marcos, R., (2004), “Genotoxicity testing of the furylethylene derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene in cultured human lymphocytes”, *Food Chem. Toxicol.*, **42**, 187-193.
- Brown, T.A., (1992), *Genetics a molecular approach*, Chapman & Hall, London, 191-213.
- Camps, J., Rribos, M., Egozcue, J., Ponsa, I., Prot, E., Peinada, M., Miro, R. (2005), Comprehensive measurements of chromosomal instability in cancer cells: Combination of fluorescence in situ hybridization and cytokinesis- block micronucleus assay, *The Faseb Journal*, 828-831
- Canımoğlu, S., Rencüzoğulları, E., (2006), “The Cytogenetic effects of Food Sweetener Maltitol in Human Peripheral Lymphocytes”, *Drug Chem. Toxicol.*, **29**, 269-278.
- Carrano, A.V., Thompson, L.H., Lindl, P.A., and Minkler, J.L.,(1978-2006). Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature*, 271:-553. 269-278.

- Castilho, R.F., Meinicke, A.R., Vercesi, A.E., Hermes-Lima, M., (1999), "Role of Fe(III) in Fe(II) citrate-mediated peroxidation of mitochondrial membrane lipids", *Mol. Cell Biochem.*, **196**, 163-168.
- Catalan, J., Autio, K., Wessman, M., Lindholm, C., Knuutila, S., Sorsa, M., Norppa, H. (1995), Age- associated micronuclei containing centromeres and the X chromosome in lymphocytes of women. *Cytogenetic Cell Genetics*, **68**,11.16.
- Collins, A. R., Dobson, V.L., Dusinska, M., Kennedy, G. ve Stetina, R., (1997), "The comet assay: what can it really tell us?", *Mutation Research*, **375**, 183– 193.
- Collins, A. R., Dusinska, M. ve Horska, A., (2001) "Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay", *Acta Biochimica Polonica*, **48**, 611-614.
- Collins, J. E., Ellis, P. C., White, A. T., Booth, A. E. G., Moore, C. E., Burman, M., Rees, R. W., Lynch, A. M., (2008) "Evaluation of the Litron In Vitro MicroFlow® Kit for the flow cytometric enumeration of micronuclei (MN) in mammalian cells", *Mutation Research/Genetic Toxicology Environmental Mutagenesis*, **654**, 76-81.
- Chai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H., (2004), Antioksidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Science*, **74**, 2157-2184.
- Chlopkiewicz, B., Ejchart, A. ve Marczevska, J., (1995), Studies on the mechanism of mutagenicity and genotoxicity induced by dihydralazine. *Acta Biochim. Pol.*; **42(3)**,291-5.
- Clements, J., (2000), "The Mouse Lymphoma Assay", *Mutation Research*, **455**, 97–110.
- Çelik, A. ve Akbaş, E. (2005), Evaluation of sister chromatid exchange and chromosomal aberration frequencies in peripheral blood lymphocytes of gasoline station attendants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **60**, 106-112.
- Coşkun, M., Coşkun, M., (2003), "Biyolojik dozimetri ve ilgili gelişmeler" *Cerrahpaşa J Med*, **34**, 207-218.

- Danadevi, K., Rozati. R., Saleha Banu, B. ve Grover , P., (2004), “Genotoxic evaluation of welders occupationally exposed to chromium and nickel using the comet and micronucleus assay” *Mutagenesis*, **19** (1), 35-41.
- Decordier, I. ve Kirsch-Volders, M., (2006), “The in vitro micronucleus test: From past to future”, *Mutation research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **1**, 607.
- Demirsoy, A., (1992), *Yaşamın Temel Kuralları/Genel Biyoloji*, Cilt 1, Kısım 1, Ankara.
- Emerit, I., Khan, S.H. ve Cerutti, P. (1985), *Treatment of lymphocyte cultures with hypoxanthine-xanthine oxidase system induces the formation of transferable clastogenic material*, *Free Radical Biol. Med.*, **1**, 51-57.
- Emerit, I., (1994), *Reactive oxygen species, chromosome mutation and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis*, *Free Radical Biol. Med.*, **16**, 99-109.
- Ergene, S., Çelik, A., Çavaş, T. ve Kaya, F., (2007), “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.
- Erkan, S., (1992), *Moleküler Biyoloji*, Bornova- İzmir.
- Fairbanks, D. J. ve Andersen, W. R., (1999), *Genetics the continuity of life*, ITP company, USA.
- Falakalı, B., (1993), “Genel Genetik”, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, İzmir, 84-97.
- Farombi, E.O., Onyema, O.O., (2006), “Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin”, *Hum. Exp. Toxicol.*, **25** (5), 251-259.
- Fenech, M., (2000), “The in vitro micro nucleus technique”, *Mutation Research*, **455**, 81–95.
- Fenech M., Bonassi S., Turner J., et al. (2003), “HUMAN MicroNucleus project. Intraand 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.

- Fenech, M. (2006), Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a .cytome. assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research*, **600**, 58-66.
- Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, **2(5)**, 1084-1104.
- Friedberg, E. C., Waliler, G.C.ve Siede, W., (1995), *Dna repair and mutagenesis*, ASM Pres., Washington.
- Gad, S.C., (2000), *In vitro Toxicology*, Second Edition, Taylor&Francis, New york-London, 94-128.
- Gatehouse, D.G, Rowland, I.R., Wilcox, P., Callender, R.D. ve Foster, R., (1990), *Bacterial mutation assay, Basic Mutagenicity Ukems recommended procedures* (Ed: Kirkland, D.J.), The Bath Press, Avon, Great Britain, UK.
- Gautier-luneau, I., Bertet, P., Jeunet, A., Serratrice, G., Pierre, J.L., (2007), “Iron-citrate complexes and free radicals generation: Is citric acid an innocent additive in foods and drinks?”, *Bio Metals*, **20**, 793-796.
- Gollapudi, B. B., Jackson, K. M. ve Stott, W. T. (1998), *Hepatic lac I and cII mutation in transgenic (lambdaLIZ) rats treated with dimethylnitrosamine*, *Mutat. Res.*, **419**, 131-135.
- Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C. ve Gelbart, W. M., (1996), *An introduction to genetic analysis*, W. H. Freeman and Company, New York, USA.
- Groopman, J.D. ve Cain, L.G. (1990), *Interactions of plant toxins with DNA: aflotoxins, sterigmacystin, safrole, cycasin and pyrrolizidine alkaloids, Chemical carcinogenesis and mutagenesis I* (Ed: Cooper, C.S., Grover, P.L.), Springer-Verlag, KG, Berlin.
- Gupta, R.C., Earley, K., Sharma, S., (1995), “Use of peripheral human lymphocytes to measure DNA binding capacity of chemical carcinogens” *PNAS*, **85**, 3513-3517.
- Gutteridge, J.M.C., (1991), “Hydroxyl radical formation from the auto-reduction of a ferric citrate complex”, *Free Rad. Biol. Med.*, **11**, 401-406.
- Guzman, A., de Henestrosa, A. R. F., Marin, A. P., Ho, A., Borroto, J. I. G., Carasa, I. ve Pritchard, L., (2007), “Evaluation of the genotoxic potential of the

natural neurotoxin Tetrodotoxin (TTX) in a battery of in vitro and in vivo genotoxicity assays”, *Mutation Research*, **634**, 14–24.

- Güven, K., (1999), *Biyokimyasal ve Moleküler Toksikoloji*, Dicle Üniversitesi Basımevi, Diyarbakır.
- Hall, M. Ve Grover, P.L., (1990), Polycyclic aromatic hydrocarbons: metabolism, activation and tumour initiation, Chemical carcinogenesis and mutagenesis I (Ed:Cooper, C.S., Grover, P.L.), Springer-Verlag, KG, Berlin.
- Hando, J.C., Nath, J., Tucker, J.D. (1994), Sex chromosomes, micronuclei and aging in women. *Chromosoma* **103**, 186.192.
- Hasegawa, M.M., Nishi, Y., Ohkawa, Y., Inui, N., (1984), “Effects of sorbic acid and its salts on chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and gene mutations in cultured chinese hamster cells”, *Food Chem. Toxicol.*, **22** (7), 501-507.
- Henderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bourner, C.ve Windebank, S., (1998), “The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins”, *Mutagenesis*, **13**, 89-94.
- Hofnung, M., Quillardet, P.(1986), Recent developments in bacterial short-term for the detection of genotoxic agents. *Mutagenesis*, **1**(5), 319-330.
- IARC, (1980), Monographs on the evaluation of the corcinogenic risk of chemicals to humans, Suppl.2, Long Term and Short Term Screening Assays for Carcinogens: ACritical Appraisal, IARC Monographs Supplement 2. IARC Lyon, InternationalAgency for Research on Cancer.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), (1983), “2-[2-Furyl]-3-[5-nitro-2- furyl] acrylamide [AF-2], in: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Some food additives, Feed Additives and naturally Occurring Substances”, *World Health Organization*, **31**, 47.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), (1975), “*p*-Dimethylaminoazobenzene, in: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Some aromatic azo compounds”, *World Health Organization*, **8**, 125-139.

- Ishidate, M Jr., Odashima, S., (1977), “Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* a screening for chemical carcinogens”, *Mutat. Res.*, **48**, 337- 353.
- Jacobson-Kram, D. ve Keller, K.A., (2001), “*Toxicology testing handbook principles, applications and data interpretation*”, Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Kaya, F.F., Topaktaş, M., (2007), “Genotoxic effects of potassium bromate on human peripheral lymphocytes *in vitro*”, *Mutat. Res.*, 626: 48-52.
- Kent, C., (1998), *Basic of Toxicology*, John Wiley & Sons, Inc., USA, 229-286.
- Kino, K. ve Sugiyama, H., (2001), “Possible cause of G-C→C-G transversion mutation by guanine oxidation product, imidazolone”, *Chemistry & Biology*, **8**, 369-378.
- Kirkland, D.J., (1990), *Basic mutagenicity tests ukems recommended procedures*, Cambridge university Pres., New York, USA.
- Kuru, M., Gözükara, S.E. (2001), *Genetik*. Palme Yayıncılık, Ankara, 360.
- Lawley, P.D., (1989), *Mutagens as carcinogens: development of current concepts*, *Mutat. Res.*, **213**, 3-25.
- Lee, H., Bian, S.S. ve Chen, Y.L., (1994), *Genotoxicity of 1, 3- dithiane and 1,4- dithiane in the CHO/SEC Assay and the Salmonella / Mikrosomal Test*, *Mutat. Res.*, **312**, 213- 218.
- Loeb, L.A. ve Preston, B.D. (1986), *Mutagenesis by apurinic/aprimidinic sites*, *Annu. Rev.Genet.*, **20**, 201-230.
- Lu, P., Ho, I., Lee, T., (1998), “Induction of sister chromatid exchanges and micronuclei by titanium dioxide in Chinese hamster ovary-K1 cells”, *Mutat. Res.*, **414**, 15-20.
- Lu, F.C. ve Kacew, S., (2002), *Lu’s Basic Toxicology*, Taylor&Francis.
- Luan, Y., Suzuki, T., Palanisamy, R., Takashima, Y., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Saito, M., Matsufuji, H., Yamagata, K., Yamaguchi, T., Hayashi, M., Honma, M., (2007), “Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC > TA transversion in human cells” *Mutat. Res.*, **619 (1-2)**, 113-123.
- Luca, D., Luca, V., Cotor, Fl., Răileanu, L., (1987), “*In vivo* and *in vitro* cytogenetic damage induced by sodium nitrite”, *Mutat. Res.*, **189**, 333-339.

- Macioszek, V.K., Kononowicz, A.K., (2004), “The evaluation of the genotoxicity of two commonly used food colors: Quinoline yellow (E 104) and Brilliant black BN (E151)”, *Cell. Mol. Biol. Let.*, **9**, 107-122.
- Maron, D.M., Ames, B.N., (1983), “Revised methods for the mutagenicity test”, *Mutation Research*, Vol.113, pp.173-215.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Descordier, I.ve Kirsch-Volders, M., (2006), “Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring”, *Biochimie*, **88** , 1515–1531.
- Matsui, M., Matsui, K., Kawasaki, Y., Oda, Y., Noguchi, T., Kitagawa, Y., Sawada, M., Hayashi, M., Nohmi, T., Yoshihira, K., Ishidate, M. ve Ssofuni, T., (1996), Evolution of the genotoxicity of stevioside and steviol using six *in vitro* and *in vivo* mutagenicity assay. *Mutagenesis*. **11(6)**, 573-579.
- Mercan, U., (2004), “Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi”, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **15 (1-2)**, 91-96.
- Miglani, G. S., (2000), *Basic Genetics*, Narosa Publishing House, India, 341-382.
- Miller, J.A. ve Surh, Y.J. (1994), *Historical perspectives on conjugation dependent bioactivation of foreign compounds*, *Adv. Pharmacol.*, **27**, 1-16.
- Monarca, S., Feretti, D., Collivinarelli, C., Guzzella, L., Bertanza, G. ve Dedrazzani, R., (2000), *The Influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of Urban Wastewater*, *Water Research*, **34 (17)**, 4261-4269.
- Mukherjee, A., Chakrabarti, J., (1997), “*In vivo* cytogenetic studies on mice exposed to acesulfame-K-a non-nutritive sweetener”, *Food Chem. Toxicol.*, **35 (12)**, 1177-1179.
- Munro, I. C., Williams, G.M., Heymann, H.O. ve Kroes, R., (2006), “Tooth whitening products and the risk of oral cancer”, *Food and Chemical Toxicology* , **44** , 301–315.
- Munzer, R., Guigas, C. ve Renner, H.W., (1990), Re-examination of potassium sorbate and sodium sorbate for possible genotoxic potential, *Food. Chem. Toxicol.*; **28(6)**, 397-401.
- Murray, R.K., Mayes, P.A, Granner, D.D.K. ve Rodwell, V.W., (1993), *Haper'in Biyokimyası*, Çev. Gülriz Menteş, Barış Kitabevi, İstanbul, 811- 917.
- Murray, R. K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell, V.W., (2004) *Xenobiyotiklerin Metabolizması*, Harper Biokimya, Ed: Dikmen, N., Özgünen, T., Nobel yayınları, İstanbul, 780-786.

- Münzner, R., Guigas, C., Renner, H.W., (1990), “Re-examination of potassium sorbate and sodium sorbate for possible genotoxic potential”, *Food Chem. Toxicol.*, **28**, 397-401.
- Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K., Jena, B.S., (2003), Antioxidant ve antimutagenic activities of pomogrenate peel extracts. *Food Chemistry*, **80**, 393-397.
- Neri, M., Fucic, A., Knudsen, L. E., Lando, C. Merlo, F. ve Bonassi, S., (2003), “Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review, *Mutation Research*, **544** , 243–254.
- Njagi, G.D., Gopalan, H.N., (1982), “Cytogenetic effects of the food preservatives sodium benzoate and sodium sulphite on vicia faba root meristems”, *Mutat. Res.*, **102 (3)**, 213-219.
- Nohmi, T., Suzuki, T. ve Masumura, K., (2000), “Recent advances in the protocols of transgenic mouse mutation assays” , *Mutation Research*, **455**, 191–215.
- Ocak, A., Çiçek, A., Zeytinoğlu, H. ve Mercangöz, A., (2002), “Porsuk Çayı Suyunun Bazı Tarım Bitkileri Üzerindeki Ekotoksikolojik Etkileri”, *ÇEV-KOR*, **11**, 9-13.
- Oda, Y., Makamura, S., Oki, I., Kato, T. ve Shinagausa, H., (1985), *Evaluation of the new system (UMU test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens*, *Mut. Res.*, **147**, 219-229.
- Ohara, A., Mizuno, M., Danno, G., Kanazawa, K., Yoshioka, T., Natake, (1988), “Mutagen formed from tryptophan reacted with sodium nitrite in acidic solution” *Mutat. Res.*, **206 (1)**, 65-71.
- Öner, C., (2003), “Genetik Kavramlar”, Palme Yayıncılık, 6. baskıdan çeviri, Türkiye, 455-467.
- Öksüzoglu, E., Diril, N., Durusoy, M. (2000), Mutagenic effects of planth growth hormones with the Salmonella/microsome test and the SOS chromotest. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **65**, 691-698.
- Quillardet, P. ve Hofnung, M., (1985), *The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures*, *Mutat. Res.*, **147**, 65-78.
- Pai, C.A., (1985), *Foundation of genetics: A science for society*, Kefford Pres, Singapur.

- Park, K.Y., Jung, G.O., Lee, K.T., Choi, J., Choi, M.Y., Kim, G.T., Jung, H.J., Park, H.J., (2004), Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciiflua*. *Journal of Ethnopharmacology*, **90**, 73-79.
- Perry, P., and Evans , H.J., (1975), Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*, **258**, 121-125.
- Petek, M., (1999), İstanbul Boğazındaki toplam kirliliğin canlılardaki mutajenik etkilerinin, Salmonella/ mikrozom test sistemi ile araştırılması. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Deniz Bilimleri ve İşletmeciliği Enstitüsü, İstanbul.
- Pierre, J.L., Fontecave, M., (1999), “Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry”, *Biometals*, **13**, 91-96.
- Porter, T.D. ve Coon M.J., (1991), Cytochrome P.450. Multiplicity of isoforms, Substrates and catalytic and regulatory mechanisms, *J.Biol. Chem*, **266**, 13469-13472.
- Rencüzoğulları, E., İla, H.B., Kayraldız, A., Topaktaş, M., (2001a), “Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes treated with sodium metabisulfite, a food preservative”, *Mutat. Res.*, **490**, 107-112.
- Rencüzoğulları, E., Kayraldız, A., İla, H.B., Çakmak, T., Topaktaş, M., (2001b), “The Cytogenetic Effects of Sodium Metabisulfite, a Food Preservative in Root Tip Cell of *Allium cepa* L.” *Tr. J. Biol.*, **25**, 361-370.
- Rencüzoğulları, E., Tüylü, B.A., Topaktaş, M., İla, H.B., Kayraldız, A., Arslan, M., Diler, S., (2004), “Genotoxicity of Aspartame”, *Drug Chem. Toxicol.*, **27** (3), 257–268.
- Rencüzoğulları, E., Parlak, S., İla, H.B., (2008), “The Effects of Food Protector Biphenyl on Sister Chromatid Exchange, Chromosome Aberrations, and Micronucleus in Human Lymphocytes”, *Drug Chem. Toxicol.*, **31** (2), 263–274.
- Roberts, J.J. (1978), *The repair of DNA modified by cytotoxic mutagenic and carcinogenic chemicals*, *Adu. Radiat. Biol.*, **7**, 211-435.
- Rothfuss, A., Steger-Hartman, T., Heinrich, N. ve Wichard, J., (2006), “Computational Prediction of the Chromosome-Damaging Potential of Chemicals”, *Chemical Research in Toxicology*, **19**, 1313-1319.

- Rozgaj, R., Kasuba V. ve Fučić, A., (2002), “Genotoxicity of cadmium chloride in human lymphocy tests” *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*.
- Russel, P. J., (1998), *Genetics*, The Benjamin- Cummings publishing company, Inc., Canada, USA.
- Salama, S.A., Serrana, M., Au, W.W., (1999), “Biomonitoring using accessible human cells for exposure and health risk assessment”, *Mutat. Res.*, **436**: 99-112.
- Saleh, K., (1997), *Mikronükleus Testi ile bazı kimyasal maddelerin ve çevre kirlenmelerinin neden olduğu klastojenik etkilerin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- Sambamurty, A.V.S.S., (2005), *Genetics*, Alpha Science International Ltd., Harrow, U.K.
- Santos, N.C.J., Castilho, R.F., Meinicke, A.R., Hermes-Lima, M., (2001), “The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe(II)-citrate”, *Eur. J. Pharmacol.*, **428**: 37-44.
- Santos, M. F. M. A. , Ferrari, I. ve Luna, H., (2005), “Chromosomal aberration analysis in workers exposed to chemical and biological hazards in research laboratories ”, *Environmental Research*, **97**, 330-334.
- Saraç, E., (2005), “Doğanın Şifalı Eli”, *Doğan Kitapçılık*, İstanbul, 25-26.
- Sarıkaya, R. ve Solak, K., (2003), “Benzoik Asit’in Drosophila melanogaster’de Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Genotoksitesinin Araştırılması”, *Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, **23**, 19-32.
- Sasaki, Y.F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K. ve Tsuda, S., (2002), The comet assay with 8mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat Res.*; **519(1-2)**, 103-119.
- Savage, J.R.K., (1999), “An introduction to chromosomal aberrations”, *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*.
- Sen, S. ve Kar, D. K., (2005), *Cytology and genetics*, Alpha Science International Ltd., Harrow, U.K.
- Shama, A. S. K., Szeto, Y. T., Benzie, I. F. F. ve Tan-un, K. C., (2003), “Preliminary Study of DNA Damage in Peripheral Lymphocytes from

- Lung Cancer Patients and Healthy Subjects”, *Turkish Journal of Medical Sciences*, **33**, 149-154.
- Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H. Wahl, G.M. (1998), Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *Journal of Cell Biology*, **140**, 1307-1320
- Shimizu, N., Shiumara, T., Tanaka, T. (2000), Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through extrusion of Mni. *Mutation Research*, **448**, 81-90
- Sivikova, K. ve Dianovsky, J., (1999), *Genotoxic activity of the commercial herbicide containing bifenoxy in bovine peripheral lymphocytes*, *Mutation research, Gen. Tox. Environ. Mut.*, **439**, 129-135.
- Soriano, C., Creus, A. ve Marcos, R., (2007), “Gene-mutation induction by arsenic compounds in the mouse lymphoma assay”, *Mutation Research*, **634**, 40–50.
- Sowers, L.C., Shaw, B.R., Veigl. M.L. ve Sedwick, W.D., (1987), *DNA base modification: ionized base pairs and mutagenesis*, *Mutat. Res.*, **177**, 201-218.
- Surjan, A., (1989), “Analysis of genotoxic activity of 16 compounds and mixtures by the Drosophila mosaic test” *Ann. Ist. Super Sanita.*, **25 (4)**, 569-572.
- Snyder, R. D. ve Gren, J. W., (2001), “A review, genotoxicity of marketed pharmaceuticals”, *Mutation Research, Reviews in Mutation Research*, **488**, 151-169.
- Strachan, T. ve Read, A.P., (1996), *Human Molecular Genetics*, , Bios Scientific Publishers Limited.
- Şahin, Y. (1995), *Genel Biyoloji II.*, Bilim teknik Yayınevi, 334-349.
- Temizkan, G.O., (1994), *Genetik I. Temel Genetik*, İstanbul, 181-228.
- Temizkan, G.O., (1996), *Moleküler Genetik*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, 281.
- Thierens, H., Vral, A., Morthier, R., Aousalah, B., De Ridder, J. (2000), Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using micronucleus assay, *Mutagenesis*, **15**, 245-249.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Strachan, T. ve Read, A.P., (1996), *Human Molecular Genetics*, , Bios Scientific Publishers Limited.
- Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E. (1995), *Sitogenetik*. Ç.Ü. Fen Fakültesi, Adana, 182.



- Tortoro, F.C., (1992), *Microbiology in Intraduction*, Fourth Edition, 207-215.
- Tsuda, H., Inui, N., Takayama, S., (1976), “*In vitro* transformation of newborn hamster cells induced by sodium nitrite” *Gann*, **67** (2), 165-173.
- Türkoğlu, Ş., (2007), “Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L.”, *Mutat. Res.*, **626** (1-2), 4-14.
- Türkoğlu, Ş., (2008), “Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*”, *Food Chem. Toxicol.* **46** (6), 2035-2041.
- Ulupınar, M., Okumuş, M. ve Okumuş, İ., (2002), “Detection of Mutagenic-Carcinogenic Pollutants in Aquatic Systems Using Cytogenetic Methods in Fish”, *Turkish Journal of Zoology*, **26**, 141-148.
- Yavuz-Kocaman, A., Rencüzoğulları, E., İla, H.B., Topaktas, M., (2008), “The Genotoxic Effect of Potassium Metabisulfite Using Chromosome Aberration, Sister Chromatid Exchange, Micronucleus Tests in Human Lymphocytes and Chromosome Aberration Test in BoneMarrow Cells of Rats”, *Environ. Mol. Mutagen.*, **49**, 276-282.
- Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M. ve Tanyolaç, B., (2007), *Moleküler Biyoloji*, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., Aksoy, H. ve Çelik, M. , (2008), “Genotoxicity testing of fluconazole in vivo and in vitro”, *Mutation Research*, **649**, 155–160.
- Zhang, Z., Che, W., Liang, Y., Wu, M., Li, N., Shu, Y., Liu, F., Wu, D., (2007), “Comparison of cytotoxicity and genotoxicity induced by the extracts of methanol and gasoline engine exhausts”, *Toxicology in Vitro*, **21** ,1058–1065.