

**BAZI SÜBSİTİTÜE BENZİNİDENİLİN TÜREVLERİNİN
MUTAJENİK AKTİVİTELERİNİN AMES SALMONELLA
MİKROZOM TESTİ İLE ARAŞTIRMASI**

Sinem YÜKSEL
Yüksek Lisans Tezi

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Ağustos-2005

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sinem Yüksel'in "Bazı Sübstitüe-Benzinidenilin Türevlerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames Salmonella Mikrozom Testi ile Araştırılması" başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans tezi 05 / 07 / 2005 tarihinde, aşağıdaki Jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Yard. Doç.Dr. Filiz SUSUZ	
Üye	: Doç. Dr.Mehtap KUTLU	
Üye	: Yard. Doç. Dr. Hüseyin BERBER	

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

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI SÜBSTİTÜE BENZİNİDENİLİN TÜREVLERİNİN MUTAJENİK AKTİVİTELERİNİN SALMONELLA MUTAJENİTE TESTİ İLE ARAŞTIRILMASI

Sinem YÜKSEL

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yard.Doç.Dr. Filiz SUSUZ

2005, 86 sayfa

Bu çalışmada, 8 Benzinidenilin türevlerinin mutajenik etkileri, metabolik aktivasyon olmadan ve olarak Ames/Salmonella /Mikrozom testi yoluyla araştırılmıştır. Deneyde *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. TA 98 çerçeve kaymasına yol açan mutajenlerin, TA 100 ise baz çifti değişimine yol açan mutajenlerin belirlenmesi için tasarlanmıştır.

Deneylerde organizma sayılarında doza bağlı artışlar gözlenmiştir ve bunlar zayıf mutajenisite olarak düşünülmüştür. Deneysel ve çözücü kontrol grupları arasında önemli farklılıklar olumlu sonuçlar olarak düşünülmüştür.

Yapı-aktivite ilişkileri mutajenler ve zayıf mutajenler olarak ele alınan bileşimler için tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Ames Test, Mutajenite, Benzinideniline, *Salmonella typhimurium*, Metabolik Aktivasyon.

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATION OF SOME SUBSTITUTED BENZINIDENILIN DERIVATES BY SALMONELLA MUTAGENICITY TEST

Sinem YÜKSEL

Anadolu University
Graduate School of Sciences
Biology Program

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Filiz SUSUZ

2005, 86 pages

In this study, the mutagenic effects of these 8 Benzinidenilin derivatives were investigated by Ames Salmonella/Microsome test in the absence and presence of metabolic activation. *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 strains were used in experiments. TA 98 is designed for frameshift mutagens, TA 100 is designed for base-pair mutagens.

Dose-dependent increases were observed in the number of organism and considered as a weak mutagenicity experiments. Significant differences between experimental and solvent control groups were considered as positive results.

Structure-activity relationships were discussed for the compounds considered as mutagens and weak mutagens.

Keywords: Ames Test, Mutagenicity, Benzinidenilin, *Salmonella typhimurium*, Metabolic Activation.

TEŐEKKÜR

Bu alıőmamın hazırlanmasında, pratik ve teorik kısımlarında yapıcı eleőtirileri, bilgi ve deneyimi ile araőtırmamın yürütölmesi ve değerlendirilmesinde bana her zaman yol gösteren, yardımlarını esirgemeyen danışman hocam, Sayın Yard.Doç.Dr.Filiz SUSUZ'a, tezimin tüm aőamalarında desteğini esirgemeyen hocam, Sayın Doç.Dr.Mehtap KUTLU'ya, bölümümüzde çalışma olanaklarını sağlayan dekanımız, Sayın Prof.Dr.Ahmet ÖZATA'ya, test edilen kimyasal maddeler konusunda yardımlarından dolayı, Anadolu Üniversitesi Eczacılık Faköltesi Öğretim Üyesi, Sayın Prof.Dr. İlhan IŐIKDAĞ'a, laboratuvar çalıőmaları boyunca bana yardımcı olan Uzman Erdoğan ÇAKIR'a tezimin tüm aőamalarında değerli bilgi ve fikirlerinden yararlandığım, Araç.Gör.Gözde AYDOĞAN ve Araç.Gör.Volkan KILIÇ'a yardımlarından dolayı biyolog Öge BAŐOĞLAN, dostluğunu ve yardımlarını asla unutmayacağım sevgili dostum yüksek biyolog Burcu KORKMAZ'a teőekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmada benden desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen annem Nurcan YÜKSEL ve babam Mustafa YÜKSEL'e teőekkürlerimi sunarım.

Sinem YÜKSEL

Ağustos-2005

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
	<u>No:</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜRLER	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kromozom Yapısı.....	5
2.2. Mutasyon.....	6
2.2.1. Kromozom sayısı değişmeleri.....	7
2.2.1.1. Euploidi.....	7
2.2.1.1. Aneuploidi.....	8
2.2.2. Kromozom yapısı değişmeleri.....	9
2.2.2.1. Delesyon.....	9
2.2.2.2. Duplikasyon.....	10
2.2.2.3. İnverson.....	10
2.2.2.4. Translokasyon.....	11
2.2.3. Gen mutasyonları.....	12
2.2.3.1. Gen mutasyonlarının sınıflandırılması.....	13
2.2.4. Mutasyonların oluşum şekilleri.....	14
2.3. Ksenobiyotiklerin Biyotransformasyonu.....	17
2.4. Kimyasal Mutajenler ve Kanserojenler.....	18
2.5. DNA Onarım ve Teknikleri.....	20

2.6. Mutajenik ve Kanserojenik Maddelerin Saptanması Teknikleri ve Ames Testi.....	23
2.7. Ames/Salmonella/Mikrozom Testi ile ilgili Yapılan Çalışmalar.....	28
2.8. Benzinidenilin'nin Sentezi ve Yapısı.....	29
2.8.1. Benziniden-Anilin sentezlenmesi ve schiff bazları oluşumu.....	29
2.8.2. Benzinidenilin'nin genel yapısı.....	30
3. MATERYAL VE METOD.....	33
3.1. Materyal.....	33
3.1.1. Deneyde kullanılan <i>Salmonella typhimurium</i> test suşları.....	33
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler.....	34
3.1.3. Test maddeleri dozları ve hazırlanışı.....	34
3.1.4. Deneyde kullanılan ortamların içerikleri ve hazırlanmaları.....	36
3.2. Metod.....	42
3.2.1. Salmonella suşlarının kültürlerinin ve master plaklarının hazırlanmaları.....	42
3.2.2. Salmonella suşlarının stoklanması ve stok kültürlerinin açılması.....	42
3.2.3. Salmonella suşlarının genotip özelliklerinin açıklanması.....	43
3.2.3.1. Salmonella suşlarının kontrol testlerinin yapılması.....	45
3.2.4. Sıvı kültürünün ml'sindeki bakteri sayısının belirlenmesi.....	51
3.2.5. Test maddelerinin sitotoksik etkilerinin saptanması.....	51
3.2.6. Memeli karaciğer mikrozomlarının hazırlanması.....	52
3.2.6.1. S9 karışımının hazırlanması.....	52
3.2.7. Ames testinin yapılışı.....	53
3.2.7.1. S9'suz (-) deneyler.....	54
3.2.7.2. S9'lu (+) deneyler.....	55
3.2.8. Sonuçların değerlendirilmesi.....	55
4. BULGULAR.....	57
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	72

KAYNAKLAR.....

79

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
1.1. Kromozomun yapısı	5
2.1. Delesyon çeşitleri.....	9
2.2. Kromozom değişimleri (duplikasyon, inversiyon, translokasyon)	12
2.3. Transisyon mutasyonu.....	13
2.4. Baz çifti değişimlerinin şematik açıklanması Transisyon transversiyon	13
2.5. Replikasyon içinde çerçeve kaymasının meydana gelişi.....	14
2.6. Faz-I ve Faz-II biyotransformasyon reaksiyonları	18
2.7. Fotoreaktivasyon onarım mekanizması	21
2.8. Kesip-Çıkarma Onarım mekanizması.....	22
2.9. Benzinidenilin'nin genel şekli.....	31
2.10. Bazı-2 süstitüe benzinideniline türevleri.....	31
2.11. Bazı-2 süstitüe benzinideniline türevleri.....	32
3.1. a) TA 98 suşunun master plaklarında üremesi.....	43
3.1. b) TA 100 suşunun master plaklarında üremesi.....	43
3.2. a) TA 98 suşunun histidin gereksinimini kontrolü sonucu HB plaklarında üreme	46
3.2. b) TA 100 suşunun histidin gereksinimini kontrolü sonucu HB plaklarında üreme	46
3.3. a) TA 98 suşunda uvrB mutasyon kontrolü	47
3.3. b) TA 100 suşunda uvrB mutasyon kontrolü	47
3.4. a) TA 98 suşunda Rfa mutasyon kontrolü	48
3.4. b) TA 100 suşunda Rfa mutasyon kontrolü	48
3.5. a) TA 98 suşunda R faktör varlığının kontrolü	49
3.5. b) TA 100 suşunda R faktör varlığının kontrolü	49
3.6. a) TA 98 suşunda spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü	50
3.6. b) TA 100 suşunda spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü	50
3.7. Ames testi.....	53

4.1.	TA 98 ve TA 100 suşunun metabolik aktivasyon yokluğunda elde edilen sonuçları.....	64
4.2.	TA 98 ve TA 100 suşunun metabolik aktivasyon varlığında elde edilen sonuçları.....	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa <u>No</u>
2.1. Yaygın olarak kullanılan <i>Salmonella typhimurium</i> suşları.....	27
3.1. Çalışmada kullanılan benzilidenaniline türevleri	34
3.2. Deneyde kullanılan <i>Salmonella typhimurium</i> mutant suşlarının sahip olduğu genotip ve fenotip özellikleri	44
4.1. TA 98 suşunun metabolik aktivasyon yokluğunda elde edilen sonuçları.....	58
4.2. TA 100 suşunun metabolik aktivasyon yokluğunda elde edilen sonuçları.....	60
4.3. TA 98 suşunun metabolik aktivasyon varlığında elde edilen sonuçları.....	65
4.4. TA 100 suşunun metabolik aktivasyon varlığında elde edilen sonuçları.....	67

1. GİRİŞ

Teknolojinin hızla geliştiği günümüzde insanoğlu giderek artan çeşitli kimyasal maddelerin, başta ilaçlar olmak üzere, çeşitli katkı maddelerinin etkileri altında kalmaktadır.

Teknolojik gelişmelerin insan yaşamına sunduğu, fiziksel ve kimyasal ajanların dahil olduğu çok sayıda çevresel faktör, sağlık açısından tehlike oluşturma boyutundadır ve insanın genetik bütünlüğünü tehdit etmektedir [1].

Doğadaki tüm canlılar günlük yaşamda sık sık doğal ya da yapay kimyasal maddelerle yüz yüze gelmektedir. İnsan popülasyonu çevredeki kanserojen ve mutajen maddelerin etkisinden korunması için çevremizdeki bu özelliğe sahip bileşiklerin tespit edilmesi ve etkilerinin değerlendirilmesi öncelikle gerekli ve önemlidir [2,3,4,5].

Kimyasal maddelerin olası mutajenik aktivitelerini araştıran ilk çalışmalar ikinci dünya savaşından hemen sonra bir grup kimyasal üzerinde yapılmış ve ilk olarak mustard gazının etkili bir mutajen olduğu tespit edilmiştir. Ardından dünyanın hemen her yerinde yapılan deneylerle, diğer bazı kimyasallara dikkat çekilmiştir. 1972 yılında yapılan bir araştırmada yiyecekleri renklendirme, koruma ve diğer amaçlarla kullanılan 2500 kadar katkı maddesi olduğu tespit edilmiştir. Yiyeceklere bulaşarak vücuda giren pestisitler ve çeşitli amaçlarla kullanılan ilaçlar üzerinde durulmuş ve bu sayede pek çok mutajenite test sistemi geliştirilmiştir [6].

Kimyasal maddelerin biyolojik aktivitelerine bağlı olarak meydana gelen mutasyon, kanser ile yakından ilgisi vardır. Genellikle, doğrudan veya metabolize edildikten sonra kanserojenik etki gösteren tüm maddelerin, aynı zamanda mutajenik etki gösterecekleri kabul edilmektedir. Aksine, yani tüm mutajenik maddelerin kanserojenik etki göstermeleri beklentisi ise bazen gerçekleşmemektedir. Bunun nedeni, mutasyonun genetik materyalin doğrudan etkilenmesiyle ortaya çıkabilmesine rağmen, kanserin çok basamaklı karmaşık biyolojik olaylar sonucu ortaya çıkması olabilir. Kimyasal maddeleri mutajenler ve kanserojenler diye ayrı gruplar halinde incelemek yerine mutajen/kanserojen diye bir gruba alabiliriz.

Kimyasal maddelerin karsinojenik risklerini ortaya çıkarmak için en akılcı yaklaşım deney hayvanlarından tümör indüksiyonudur. Ancak bu testlerin sonuçlanması uzun zaman almakta ve maliyetleri yüksek olmaktadır. Bu yüzden araştırmacılar karsinojenite araştırmalarına esas olabilecek, kısa zamanda sonuç verebilen ve düşük maliyetli bir çok kısa zamanlı test sistemleri geliştirmişlerdir. Bu testler kimyasal maddelerin mutajenik etkilerini belirlemeye yöneliktir. Kısa zamanlı test sistemlerinden en yaygın olarak kullanılanları bakteriyel testlerdir. Bakteriyel testler bakterilerin basit üreme ortamlarında hızlı üreyebilmesi, basit, çabuk ve ucuz uygulanabilir olmaları nedeni ile tercih edilmektedir. Karsinojenlerin taranmasında mutajenitenin esas alınması iki nedene dayanır:

1-Genetik kodun ve genetik sistemin evrensel oluşu.

2-Mutajenite ile karsinojenite arasındaki korelasyonun yüksek oluşu.

Bakteriyel test sistemlerinde mutajen olduğu saptanan birçok bileşiğin aynı zamanda kanserojen olduğu gösterilmiştir. Kanserojen ve mutajenlerin neden olduğu özgül DNA hasarları tiplerini saptamada, bakteriyel test sistemleri kullanılmaktadır. Kısa zamanlı bakteriyel test sistemleri, karmaşık kimyasal örneklerdeki mutajenik bileşiklerin ve metabolik aktivasyon sonucu ortaya çıkan, reaktif birleşenlerin saptanmasında analitik araçlar haline gelmişlerdir [7].

Kanserojen ve mutajen maddelerin araştırılması çeşitli testlerle tespit edilebilir [3,8,9,10]. Bunlardan bazıları DNA hasarlarına sebep olan kimyasal mutajen ve kanserojenlerin test edildiği sitogenetik metotlardır. Bu testler; kardeş kromatid değişimi (SCE= sister chromatid exchange) [9,11,12,13], mikronükleus testi (MN) [3,9,14], kromozom bozulma testi (CA= chromosome aberation) [15], comet testi (gen konversiyonları ve DNA kırılmaları) [16,17], programlanmamış DNA sentezi (UBS=Uncheduled DNA synthesis) [18,19,20], SOS kromotest [10,12], transformasyon yöntemi umu test [10] ve Ames/Salmonella/Mikrozom yöntemi şeklinde sıralanabilir [3,8,9,16,17]. Tüm bu mutajenite test yöntemleri *Salmonella* test suşları, çeşitli *E.coli* suşları, rat, primat ve tavşan türleri kullanılarak hazırlanmış memeli hücre kültürleri ve memelilerin kan, kemik iliği hücreleri, *Saccharomyces cerevisia* suşları ve farklı organizmalar kullanılarak uygulanmaktadır [16,21,22,23,24]. Bu testlere kısa zamanlı (short term) testler de denir [9,15,22].

Sözü edilen yöntemlerin tümü söz konusu olası mutajenik etkileri saptamak amacıyla, bağımsız ya da birkaçı birlikte karşılaştırmalı olarak kullanılmaktadır. Bir testte pozitif olan diğerinde negatif olabilir ya da değişik mutasyona neden olabilmektedir [25,26,27].

Son yıllarda, tıp ve farmakoloji alanlarında yeni ilaçların gelişiminde üretilen ilaç hammaddelerinin biyolojik sistemlerdeki toksik ve mutajenik etkilerinin araştırılmasında kısa zamanlı testler kullanılmaktadır. Yukarıda sayılan test yöntemleri kullanılarak ilaç hammaddesi olması düşünülen test maddelerinin toksik, mutajenik, karsinojenik etkilerini incelemek için daha çok Ames testi kullanılmaktadır. Ames testinde mutajenik etkileri diğer canlı gruplarına göre daha fazla duyarlı olan bakteriler üzerindeki etkilerinin araştırılmasının yanı sıra, bu test ile aynı zamanda ortama ilave edilen memeli metabolik aktivasyon enzimleri ile, test bakterilerinin memeli metabolizmaları sonucu oluşabilecek metabolitlerinin de mutajenik etkileri araştırılmıştır [4,5,28,29,30].

Ames /Salmonella /Mikrozom test yöntemi 1975 yılında Prf. Dr. Ames ve Dr. Maron tarafından geliştirilen ve daha sonra yaygın olarak uygulanmaya çalışılan mutajenite testidir [4,11,19,31,32,33]. Bu testin amacı, yapay mutasyonla oluşturulmuş olan *Salmonella typhimuriumun* histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş (His⁻=oksotrof) olan suşlarının test bileşeni ile muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyon geçirip his⁺ hale geri dönüşmesi temeline dayanır. Geri dönüşüm (revertant) bakteri kolonileri sayılarak değerlendirilir. Fakat normalde mutajenlere maruz kalmadan spontan olarak geri dönüşebilen bakterilerde olmaktadır. Mutajenik etkiden bahsetmek için spontan revertant sayısından daha fazla sayıda revertant koloni sayılması gerekir [4,34,35]. Bu test ile birçok mutajenik madde tespit edilmiştir. Bu test *Salmonella typhimuriumun* TA ve YG suşları ile uygulanmaktadır. En çok kullanılan bakteri suşları, TA 97, TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535, TA 1538 suşlarıdır [36,37,38,39,40,41].

Ames/Salmonella/Mikrozom testi ile yapılan çalışmalar hala en güvenilir test olmasından dolayı 1975 yılından bu yana devam etmektedir [4].

Ames/Salmonella/Mikrozom testi kullanılarak memeli hücrelerinde P450IA₂ cDNA gen ifadesi ile promutajenlerin tanımlanması sağlanmıştır [42].

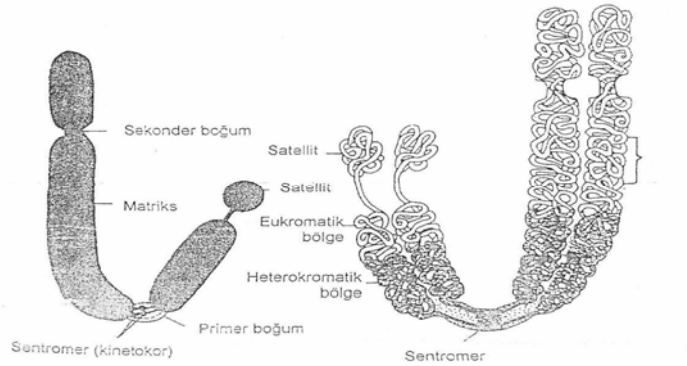
Kimyasal maddelerin vücuda alınış yollarından biri de çeşitli amaçlarla kullanılan ilaçlar aracılığıyla, bu çalışma da sentetik olarak elde edilen ve ilaç yapımında başlangıç maddesi olarak kullanılması amaçlanan Benzinidenilin ve türevlerinin mutajenik aktivitesi Ames/Salmonella/Mikrozom yöntemi ile araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kromozom Yapısı

Kalıtsal maddenin, bölünme halinde olmayan hücrelerin çekirdeğinde yani interfaz çekirdeğinde meydana getirdiği yapıya “kromatin” adı verilir. Kromatin, kalıtsal materyal olan DNA molekülünün özel bazı proteinlerle birlikte oluşturduğu kromatin iplikleri, hücre bölünmesi başladığında, giderek yay şeklinde kıvrılıp kalınlaşarak kromozomları oluştururlar. Yani kromozom yoğunlaşmış ve biçimlenmiş kromatin materyalidir [43,44].

DNA “histon” adı verilen kromozomal proteinlerle sıkıca paketlenerek kromozomları oluşturur. Kromozomlar aralarında açığı bulunan iki koldan oluşur. Kollar primer boğumla birbirinden ayrılmıştır, bu boğuma sentromer adı verilir. Sentromerler kromozomların iç ipliğine takılmasını sağlar. Sentromeri olmayan bir kromozom bölünmeye katılamaz. Kromozomlar üzerinde primer boğumlardan başka, sekonder boğumlarda bulunabilir. Bazen kromozomun uç kısmını da uydu “satellit” denilen yuvarlak ya da uzunca bir yapı bulunur, kromozomların uçlarına “telomer” adı verilir. Şekil 1.1’ de görüldüğü gibi özel boyama teknikleriyle bir kromozom üzerinde açık ve koyu bantlar şeklinde görülen kromatin kısımları saptanır. Açık bantlar az yoğunlaşmış bölgelerdir ve “eukromatik bölgeler” adını alır. Açık bantlar ise çok yoğunlaşmış bölgelerdir ve “heterokromatik bölgeler” olarak adlandırılır (Şekil 1.1) [44].



Şekil 1.1. Kromozomun yapısı (Demirsoy'dan alınmıştır)

2.2. Mutasyon

DNA kalıtsal bir materyal olduğu için gelecek nesillere değişmez bir formda aktarılması gerekir [45]. Fakat, zaman zaman doğal ve yapay koşullar altında mutasyon denen değişiklikler gözlenebilir. DNA'nın türe özđu kalıtsal kombinasyonu değişmeksizin, taşıdığı bilgi içeriğinde meydana gelen değişmeye “mutasyon” denir [46,47,48,49].

Birçok genetik kavramın geliştirilmesinde, kalıtsal materyalin yapı ve içeriğinin dölden döle geçerken değişmediğı kabul edilir. Her ne kadar, genler dikkati çekecek kadar kararlı ve yeni döllerde bütün özelliklerini koruyarak katılıyorsa da, zaman zaman doğal ve yapay koşullar altında mutasyona uğrarlar [47,48,49].

Mutasyonlar doğada kendiliğinden meydana gelebildiğı gibi, mutajen adı verilen fiziksel ve kimyasal dış etkenler tarafından da meydana gelebilirler. Genelde mutasyonun kendiliğinden meydana gelebilme olasılığının çok düşük olmasına karşın, mutajenlerin etkisi ile mutasyon frekansı oldukça yükselmektedir. Normal koşullarda kendiliğinden olan mutasyon frekansı her jenerasyonda $10^{-5} - 10^{-10}$ gibi düşüktür. İki ayrı gende aynı anda iki ayrı mutasyonun oluşma olasılığı ise $10^{-10} - 10^{-20}$ gibi çok daha düşüktür [48,49].

Bir genin baz dizisindeki bir değişim bazen o gen tarafından kodlanmış olan üründe de değişime sebep olabilir. Böyle mutant bir genin mutant enzimi, aminoasit dizisindeki meydana gelen değişme sebebiyle inaktif ya da daha az aktif olabilmektedir. Eğer hücre mutasyon sonucu ihtiyaç duyduğu bir fenotipik özelliğı yitirirse genotipteki bu değişiklik zararlı ya da öldürücü olabilir. Bununla birlikte bir mutasyon faydalı da olabilir. Örneğın mutant bir gen tarafından kodlanan enzim, hücreye avantaj sağlayan yeni bir aktiviteye sahip olursa bu mutasyon çeşidi nadir de olsa canlıya doğal seleksiyonda avantaj kazandırır. Mutasyonlar, popülasyondaki çeşitliliğı sağladığından, yeni türlerin oluşumuna katkıda bulunduğundan dolayı evrimsel öneme sahiptir [45,50,51,52].

Basit mutasyonların birçoğı nötraldir. DNA baz dizisindeki değişme, bu gen tarafından kodlanan ürünün aktivitesinde herhangi bir değişmeye yol açmaz.

Mutasyon vücut hücrelerinde ya da üreme hücrelerinde olabilir. Vücut hücrelerinde olan mutasyonlara “somatik mutasyonlar” denir ve bu mutasyonlar hastalıklara ve dejenerasyonlara yol açarak gelişmeyi ve metabolizmayı olumsuz etkileyebilirler. Birçok kanser türünün somatik hücrelerde genellikle bir mutasyon nedeni ile ortaya çıktığı bilinmektedir. Üreme hücrelerinde görülen mutasyonlara ise “germinal mutasyonlar” denir. Üreme hücrelerinin DNA’sında görülen değişimler genetik içeriğin farklılığına yol açar ve bu mutasyon kalıtsal olarak yeni nesillere aktarılır [45,52,53].

Mutasyonlar iki temel grupta incelenebilir. Bunları “kromozom mutasyonları” ve “gen mutasyonları” olarak sıralayabiliriz. Kromozom mutasyonları da “kromozom sayı değişimleri” ve “kromozom yapı değişimleri” şeklinde iki gruba ayrılabilir [45,52].

2.2.1. Kromozom sayısı değişimleri

Organizmaların hem doğal hem de laboratuvar koşullarında popülasyonlarında kendiliğinden meydana gelen kromozom sayısındaki değişimlerdir.

Canlıların kromozom sayıları cinsten cinse, hatta türden türe değişiklik gösterir ama her tür için sabittir. Kromozomlar mitoz ve mayoz bölünme sırasında bazen düzenli olarak ayrılmaz ve sonuçta kromozom sayısı bakımından farklı hücreler meydana gelir [47,52].

Kromozom sayısı değişiklikleri başlıca iki grup altında toplanır. Bunlar; euploidi ve aneuploididir.

2.2.1.1. Euploidi

Kromozom takımı sayısındaki değişimlerdir. Bir takımdaki kromozomların hepsinin birden sayısının tam katlar halinde artması ya da organizmada sadece tek takım kromozom bulunması şeklinde olabilir. Bunlar; monoploidi ve poliploididir.

a. Monoploidi: Nadiren bazı hayvan ve bitki hücrelerinde sadece bir takım, yani “n” kromozom içerirler. Bu olaya monoploidi, böyle fertlere de monoploid adı verilir.

Bir monoploidin germ hücreleri mayozu normal geçiremez, çünkü kromozomların eşleşen ortakları yoktur. Böylece monoploidler karakteristik olarak kısırdirler.

b. Poliploidi: Bir takımdaki (genomdaki) kromozomların hepsinin birden sayısının üç veya daha fazla kata yükseltilmesi olayıdır. Bu olay sonunda 3n, 4n, 5n ve daha yüksek katlarda n kromozomlu fertler meydana gelir. Poliploidlerin meydana gelmesi 2 yoldan biriyle mümkün olmaktadır.

1. Mayozda kromozom sayısının yarıya inmesinin önlenmesiyle somatik hücrelerdeki kadar genoma sahip gametlerin oluşması.

2. Zigotun ilk bölünmeleri esnasında enine çeperin oluşumuna engel olmak suretiyle meydana gelecek bireyde kromozom sayısının 2 kata yükseltilmesi.

Poliploidi 3 gruba ayrılmaktadır. Bunlar;

a-) Otopoliploidi: Bir poliploidin içerdiği genomların hepsi aynı türden geliyorsa bu durumda otopoliploididen bahsedilir.

b-) Allopoliploidi: Bir poliploidin içerdiği genomların bir kısmı bir türden bir kısmı da başka bir türden geliyorsa bu duruma denir.

c-) Endopoliploidi: Endomitoz adı verilen olayın sonucudur. Bazen farklılaşmış ve bölünme yeteneğini kaybetmiş olan hücrelerde nükleus zarı kaybolmadığı halde iki veya daha fazla kata yükseldikleri görülür. Fakat iğ oluşumu ve sitokinez görülmez. Bu olaya endomitoz denir. Endomitozla oluşan kromatidler birbirinden ayrılarak bağımsız kromozomlar halini alırsa olaya endopoliploidi denir.

2.2.1.2. Aneuploidi

Bir takımdaki kromozomların birinin veya birden fazlasının sayısını değiştirmesi olayıdır. Aneuploid bir fert, aneuploid yani normal haploid sayıdan daha fazla veya eksik sayıda kromozom içeren gametlerin ürünüdür.

Aneuploid başlıca 3 gruba ayrılır. Bunlar;

a-) Monosomi: Diploid bir fertle tek bir kromozom eksik olması olayıdır.

b-) Nullisomi: Bir canlıda bir kromozomun, homologu ile beraber eksik olması olayıdır.

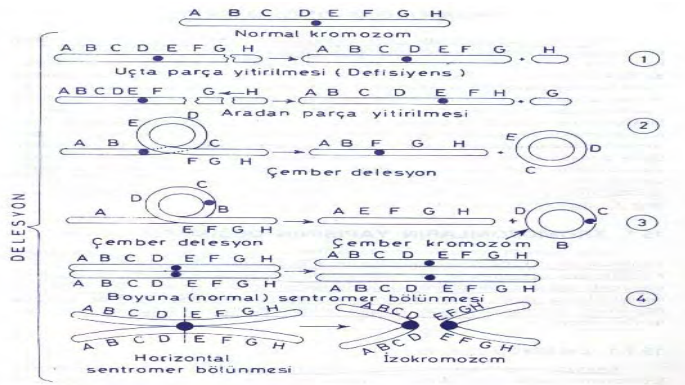
c-) Polisomi: Bir takımda bulunan kromozomlardan birinin veya birkaçının sayısını yükseltmesi olayıdır.

2.2.2. Kromozom yapısı değişimleri

Bazen kromatidler, krossingover olmadan da parça değişimine uğrar [47,52]. Kromozom kırılmaları ve tekrar eşleşmeleri sonucu kromozomlar yapısal olarak tekrar organize olurlar. Bunun gibi değişimler kromozomların düzeninin değişmesine sebep olurlar. Bu değişimde kromozomun yapısında farklılığa yol açar. Kromozomlardaki bu değişiklikler çeşitli şekillerde meydana gelebilirler [53,54,55,56,57]. Bunlar; delesyon, duplikasyon, inversiyon, translokasyondur.

2.2.2.1. Delesyon

Delesyonun, ısı, radyasyon, virüsler, kimyasallar, transposibil elementler ya da hatalı rekombinasyon gibi ajanların neden olduğu kromozom kırığından parça koparılmasıyla meydana gelir. Şekil 2.1'de görüldüğü gibi delesyonun meydana gelişi ve delesyon çeşitleri gösterilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Delesyon çeşitleri

Bazı araştırmacılar kromozomun bir ucundan bir parçanın kopup kaybolması olayına defisiyans, kopup kaybolan parçanın aradaki her hangi bir bölgeden olması durumunu da delesyon olarak tanımlamışlardır. Her iki şekilde de organizma bazı genlerini kaybetmiş olur. Kopan parça herhangi diğeri bir kromozoma bağlanmaz, hücre bölünmesine de katılmaz. Büyük bir olasılıkla yeni oluşacak çekirdeğin dışında kalır. Eğer hücre diploid ise, kaybolan genlerin allelleri kardeş kromozom üzerinde bulunacağından öldürücü olmaz. Fakat gen dengesinin ve sonuçta fenotipin değişmesine neden olur. Eğer yitirilen parça çok büyükse gen dengesi tamamen bozulur ve sonuçta ölüm meydana gelir. Erkeklerin X kromozomunda meydana gelecek bu şekildeki bir parça yitilmesi, Y kromozomu üzerinde alleli olmadığı için ölüme sonuçlanabilir. Parça yitilmesi ile bazı canlıların parazit ya da saprofit yaşama uyum gösterdikleri savunulmuştur. Bu yolla bazı enzimler yitilince, zorunlu olarak parazitizm veya saprofitizm ortaya çıkar [47,49,58,59]. Ayrıca kromozomal delesyonların, özellikle meme kanserinde görülen patolojik bir gösterge olduğu da bilinmektedir [60].

2.2.2.2. Duplikasyon

Bir kromozom segmentinin kromozom üzerinde çift olarak taşınması şeklinde oluşan “duplikasyon” gen alellerinin evriminde önemli bir role sahiptir. Şekil 2.2’de duplikasyonun meydana gelişi gösterilmiştir (Şekil 2.2). Örneğin hemoglobin molekülü iki alt ünitenin her birinden iki kopya içermektedir [61].

2.2.2.3. İnversiyon

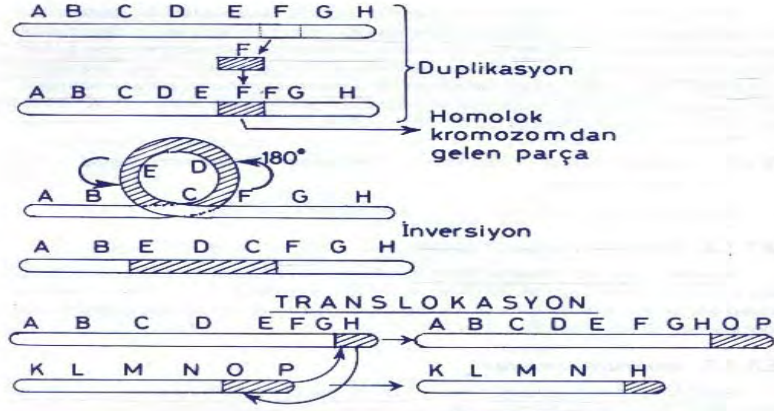
İnversiyon, kromozomdan kopan bir parçanın 180⁰ ters dönerek koptuğu bölgeye tekrar bağlanmasıdır. Şekil 2.2’de inversiyonun meydana gelişi gösterilmiştir (Şekil 2.2). İverte olan segment, sentromer içeriyorsa “perisentrik inversiyon” içermiyorsa, “parasentrik inversiyon” olarak adlandırılır [20].

İnversiyon sonucunda kromozomlardaki genlerin diziliş sırasında değişme olur [7].

Çok yakın türler ve alt türler arasında meydana gelen melezlemelerden bazı uygun olmayan sinapsların ortaya çıkmasının en büyük nedeni, doğada kromozom değişiminin en yaygın şekli olarak görülen inversiyonlar olduğu saptanmıştır [47,49,55].

2.2.2.4. Translokasyon

Homolog olmayan kromozomlar arasında kromozom parçalarının yer değiştirmesine translokasyon adı verilir. Kromozom parçasının, homolog kromozoma taşınması halinde ise verici kromozom delesyona, alıcıda duplikasyona uğramış olur. Basit translokasyonda, bir kromozomda tek bir noktada kırılma olur ve parçalardan biri bir başka kromozomun ucuna yapışır. Kromozom uçlarının yapışkan olmama özelliği nedeniyle basit translokasyon oldukça enderdir. İnterkalar translokasyonda kromozomların birinde iki yerde bir başkasında ise tek noktada kırılma olur ve aradan çıkan parça tek noktada kırığın olduğu kromozomun o bölgesine eklenir. Karşılıklı translokasyon ise en fazla rastlanana ve en iyi araştırılmış olanıdır. Bu tipte, iki ayrı kromozomda birer kırılma olur ve kopan parçalar birbirlerinin yerine geçer. Translokasyonlar, yeni gen kombinasyonlarını ve hücrede DNA miktarının değişmesini sağladığı için evrimsel olarak önemlidir. Translokasyonlar, insanda çoğu kez çeşitli fenotipik anormallikler meydana getirirler, düşüklere veya doğumdan sonra birkaç ay içinde ölüme yol açarlar. Daha uzun yaşayabilenlerde genellikle zihinsel kusurlar görülür. Şekil 2.2’de translokasyonun meydana gelişi gösterilmiştir (Şekil 2.2) [47,49,59].



Şekil 2.2. Kromozom değışmeleri (Duplikasyon,İnversiyon,translokasyon)

2.2.3. Gen mutasyonları

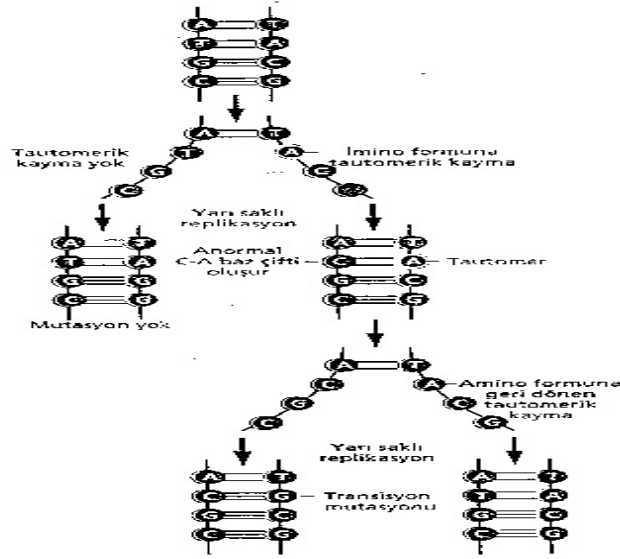
Bir genin, kromozom üzerindeki yerini değiştirmeksizin stabil bir halden, başka bir stabil hale geçmesine gen mutasyonu veya nokta mutasyonu denir. Bunlar kendiliğinden meydana gelebildiği gibi deneysel olarak da meydana getirilebilir.

Gen mutasyon mekanizmasının esasını, dış etkilerle AT/GC oranında veya bazların diziliş sırasında meydana gelen değişiklikler oluşturur. Bir genin fonksiyonu için gerekli bilgiyi, bazların sırasıyla ilgilidir. Baz sırasında bir değişme olursa, bilgiyi dolayısı ile genin fonksiyonu değişir. Gen mutasyonları hem somatik hücrelerde, hem de gametlerde veya onları verecek olan ana hücrelerde meydana gelebilir. Fakat; somatik hücrelerde oluşan mutasyonlar, eşeyli üreme ile çoğalan canlılarda yeni döllere geçemezler. Mutasyonla genellikle dominant genler resesif hale geçerler yani resesif aleller meydana getirirler. Çok seyrek olarak, mutasyonla meydana gelmiş olan resesif bir gen, başka bir mutasyonla meydana gelmiş olan resesif, başka bir mutasyonla tekrar kendisini veren dominant gene dönebilir. Bu olaya ters mutasyon veya geri mutasyon adı verilir. Geri mutasyonun meydana gelme olasılığı, mutant oluşturan ileri mutasyonun olasılığından daha düşüktür [56,61,62].

2.2.3.1. Gen mutasyonlarının sınıflandırılması

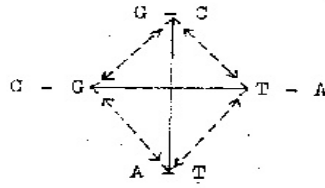
Gen mutasyonları 3 şekilde sınıflandırılır. Bunlar; transisyon, transversiyon ve çerçeve kayması mutasyonlarıdır.

a) **Transisyon** : DNA üzerindeki bir pürin ya da pirimidinin, başka bir pürin ya da pirimidin ile yer değiştirmesidir. Şekil 2.3’de transisyon mutasyonunun DNA üzerinde meydana geliş aşamaları gösterilmiştir (Şekil 2.3.).



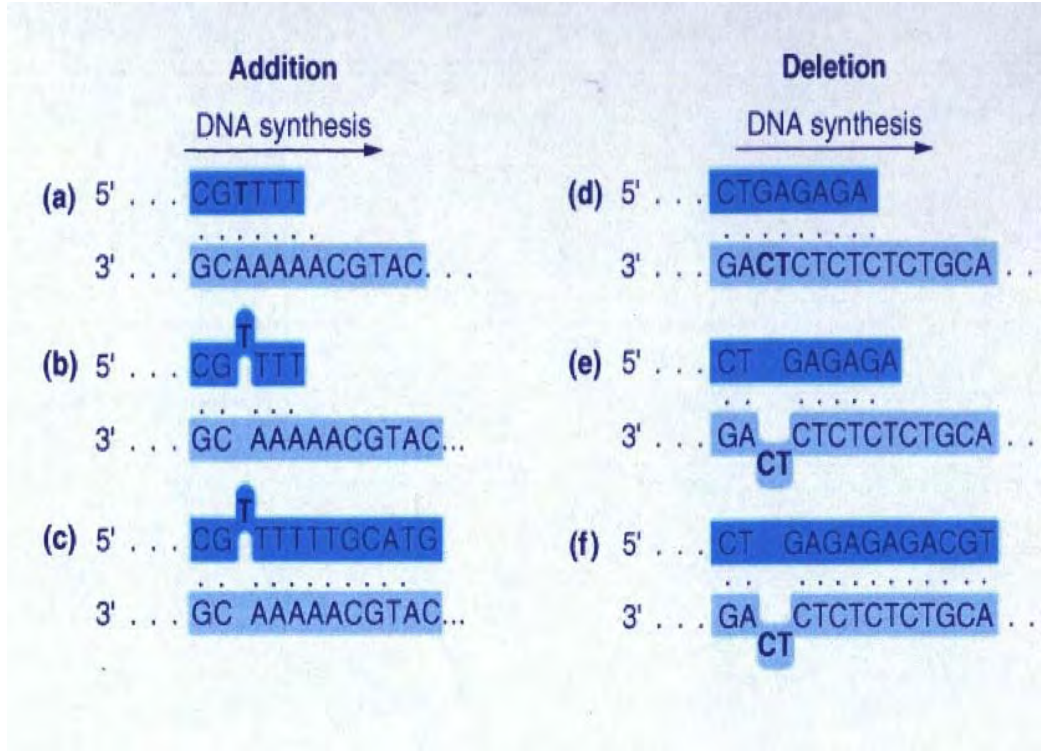
Şekil 2.3. Transisyon mutasyonu

b) **Transversiyon**: Bir pürin bazının, pirimidin bazı ile ya da bir pirimidin bazının, pürin ile yer değiştirmesi durumudur. Şekil 2.4’de transversiyon ve transisyon mutasyonlarının meydana gelmesi gösterilmiştir (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. Baz çifti değişimlerinin şematik açıklanması (transisyon transversiyon)

c) **Çerçeve kayması mutasyonu:** DNA zincirinde çoğunlukla sık tekrar eden baz dizilerinin bulunduğu “polindromik bölgeler” de bir veya birkaç baz çiftinin eklenmesi ya da çıkması ile meydana gelen mutasyon şeklidir. Şekil 2.5’de normal DNA sentezi ve çerçeve kaymasına uğramış olan DNA’nın sentezi gösterilmiştir (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Replikasyon içinde çerçeve kaymasının meydana gelişi

2.2.4. Mutasyonların oluşum şekilleri

Geni, depolanmış kimyasal bilgiyi temsil eden nükleotit çiftlerinin lineer (doğrusal) bir dizisi olarak değerlendirmek kolay olacaktır. Genetik şifre üçlü (triplet) olduğundan üç nükleotitin her dizisi, ilgili proteinde tek bir aminoasidi belirler. Bu dizileri veya şifrelenen bilgiyi bazen herhangi bir değişiklik mutasyon için yeterlidir. En az karmaşık olan değişiklik bir nükleotitin bir nükleotitle yer değiştirmesidir. Bunlar daha uygun olarak baz yer değiştirmeleri veya nokta mutasyonları olarak adlandırılan mutasyonlara analogdur.

Nükleotit yer değiştirmelerini tanımlamak için genellikle daha bilimsel olan iki tanım kullanılır. Eğer bir pirimidin bir pirimidinle yer değiştirirse veya bir pürin diğer bir pürinle yer değiştirirse, bir transisyon (geçiş) olmuştur. Eğer bir pürin ve pirimidin karşılıklı yer değiştirirlerse bir transversiyon (değişim) olmuştur.

İkinci tip değişiklik, gen içinde herhangi bir noktaya bir ya da daha fazla nükleotitin girmesi (inversiyon) veya çıkmasıdır (delesyon). Tek bir harfin kaybedilmesi veya eklenmesi, tüm üç harfli kelimelerin değişmesine neden olur. Bu örnekler çerçeve kayması mutasyonları olarak adlandırılır, çünkü okuma çerçevesi değişmiştir [44].

Temel olarak mutasyon oluşturabilen faktörler üç ayrı grupta; fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere sınıflandırılabilir.

Fiziksel etmenler arasında ultraviyole (UV) ve X ışınları sayılabilir. DNA molekülleri 250-260 nm olan UV ışınlarını spesifik olarak absorbe eder. Bu ışınlara maruz kalan DNA moleküllerinde mutasyon oluşur.

Biyolojik mutajenler olarak virüsler ve transpozibil elementler bilinmektedir. Virüs genomu konak hücrelerin DNA'sına girdiğinde kendi DNA'sından da bazı genleri konak DNA'ya aktarmakta veya ayrılırken beraberinde bir parçayı da götürmektedir.

Kimyasal mutajenler ise etki biçimlerine göre 5 alt grupta incelenebilir. Bunlar;

a) Baz analogları: Nükleik asit biyosentezi sırasında, pürin ve pirimidinler yerine geçebilen moleküllere baz analogları denir ve bunlar genellikle mutajenik kimyasallardır. Örneğin, urasilin bir türevi olan 5-bromourasil (5-BU), timin analogu olarak davranır ve pirimidin halkasının 5 numaralı pozisyonunda halojenir [44].

b) Akridin ajanlar: II. Dünya savaşında keşfedilen kükürt içeren hardal gazları, kimyasal savaş araştırmalarında tanımlanan ilk kimyasal gruplardan biriydi. Hardal gazları alkilleyici ajanlardır. Nükleotidlerin amino veya keto gruplarına -CH₃ veya CH₃-CH₂- gibi bir alkil grubu eklerler. Baz analoglarında olduğu gibi, baz eşleşme yatkınlıkları değiştirilmiş ve sonuçta transisyon mutasyonlar "akridin boyaları" adını alan kimyasal mutajenler çerçeve kayması

mutasyonlarına neden olur. Proflavin ve akridin sarısı (oranj) akradin boyalarından en çok çalışan mutajenlerdir ve organik moleküler grubuna girerler [44].

c) Ap rinik bölgeler ve diğer lezyonlar: Mutasyonun diğer bir tipi de, sağlıklı bir çift-sarmal DNA molekülündeki azotlu bazlardan birinin, genellikle guanin ya da adeninin, spontan olarak kaydedilmesiyle ilgilidir. Pürin halkasının 9 nolu azotu ile deoksiribozun 1 nolu karbonu arasındaki glikozidik bağın kırılmasıyla oluşan bu bölgelere ‘‘Ap rinik bölgeler’’ (AP bölgeler) denir. Bir AP bölgede bir bazın yokluğu, eğer ilgili zincir transkripsiyon ve translasyona uğramaktaysa genetik kodu değiştirecektir. Eğer replikasyon olursa, AP bölge kalıp olarak uygun olmayacak ve replikasyonun durmasına neden olabilecektir. Eğer yapıya bir nükleotid girmişse, bu nükleotid genellikle yanlıştır ve diğer bir mutasyonun oluşmasına neden olur. Neyse ki hücreler genellikle bu tip lezyonlara karşı onları onaracak tamir sistemlerine sahiptir [44].

d) Tautomerik değişmeler: Watson ve Crick DNA’ daki pürin ve pirimidinlerin tautomerik formlarda yani azotlu bir bazın her birinin, molekülde sadece tek bir protonun kayması ile farklılık gösteren, yapısal izomerler olarak adlandırılan alternatif kimyasal formları halinde bulunabileceğini ileri sürdüler. Biyolojik bir öneme sahip olan tautomerler, sitozin ve adeninin amino-imino formları ile timin ve guaninin keto-enol formlarını içerir. Bu tür bir kayma molekülün bağ özelliğini değiştireceğinden, tautomerik kaymaların baz çifti değişmelerine veya mutasyonlara yol açacağı ileri sürülmüştür [44].

e) Ultraviyole radyasyonu ve timin dimerleri: Nükleik asitlerin analiz ve tanısında yararlanılan bir özelliği, pürin ve pirimidinlerin ultraviyole (UV) radyasyonunu yaklaşık 260 nm dalga boyunda yoğun olarak absorbe ettikleridir. UV radyasyonunun zararlı etkisi, özellikle iki timin bazı arasında dimerlerin oluştuğu pirimidinler üzerindedir. Sitozin –sitozin ve timin – sitozin dimerleri de oluşabilir, fakat sayıları daha azdır. Dimerler DNA konformasyonunu bozar ve normal replikasyonu durdurur. Replikasyonun durması, UV radyasyonunun mikroorganizmalar üzerindeki öldürücü etkisini sorumlusu olarak görülmektedir [44].

2.3. Ksenobiyotiklerin Biyotransformasyonu

Metabolizma yaşam için gerekli olan ve organizmada meydana gelen bütün kimyasal reaksiyonlar olarak tanımlanabilir. Organizmada yabancı olan kimyasal maddelere “ksenobiyotik” adı verilir. Bunların organizmadaki kimyasal değişimlerine de metabolizma denmektedir fakat “biyotransformasyon” bu anlamda daha uygun bir terim olarak kullanılmaktadır.

İnsanlar ilaçlar, gıdalardaki katkı maddeleri veya çevre kirliliğine neden olan maddeler v.s. şeklinde olsun, giderek artan bir biçimde çeşitli yabancı kimyasal maddelerin etkileri altında kalmaktadırlar. Çeşitli yollarla organizmaya giren kimyasal maddeler enzimlerin katalitik etkisi ile kimyasal reaksiyonlara girerler ve böylece metabolitlere dönüşürler. Genellikle lipitte çözünür olan bu yabancı maddeleri metabolize etmedeki amaç, onları daha polar yaparak suda çözünür, hale getirmek ve bu şekilde vücut dışına atılmaları sağlanmaktadır [48,55,63].

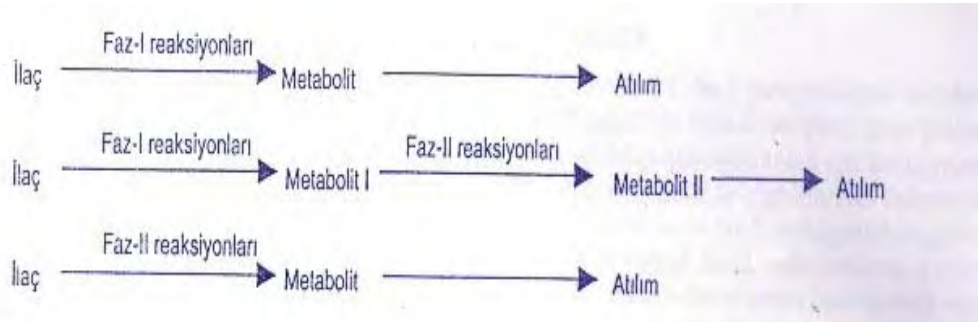
Biyotransformasyon, ilaç etkisinin ortadan kalkması, toksisitenin azalması ve ilacın vücuttan daha kolay atılması olaylarını gerçekleştirir [48,64]. Buna rağmen ilaç metabolizma reaksiyonları sadece zehirsizlenme değildir, çünkü bazı ilaçların biyolojik aktivitesi metabolitte de görünmektedir ve bunlara “aktif metabolit” denir. Bu bileşikler bazı durumlarda değişik etkiye sahip bir yapıya çevrilebilmektedir. Kendileri inaktif olup biyotransformasyon sonucu etkili metabolite dönüştürülen ilaçlara “ön ilaç” (prodrug) denir [65,66].

Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonları, genellikle spesifik olan kompleks enzimlerle gerçekleşir. Bu enzimlerin önemli bir kısmı karaciğerde yerleşmiştir. Karaciğerdeki mikrozomal enzimler toksik maddelerin metabolizmasında önemli rol oynarlar.

Mikrozomal enzimlerin yaptığı oksidasyon olayında P450 sitokromuna bağlı değişik etkili oksidazlar (monooksijenaz) rol oynar. Ayrıca biyotransformasyon bağırsak, böbrek, akciğer, beyin ve deride de olabilir [54].

Ksenobiyotiklerin biyotransformasyon mekanizmaları iki fazda toplanabilir. Faz I reaksiyonları yükseltgenme (oksidasyon), indirgenme (redüksiyon) ve hidroliz olaylarını, faz II reaksiyonları ise çeşitli konjugasyon

veya sentez olaylarını içerir. Faz I'de lipitde çözülen ksenobiyotikler daha polar moleküller haline geçerler, faz I boyunca hidroksil gibi bir veya daha fazla polar grup, hidrofobik moleküller ortaya çıkar. Faz I reaksiyonları ile bileşikler, faz II için uygun hale gelirler ve yeterli derecede polar olan ürünler kolayca hücre ve vücuttan çıkarılır. Faz II' de ise endojen maddelerle birleşen polar metabolitler inaktif olarak eliminasyona uğrarlar. Şekil 2.6'da Faz I ve Faz II reaksiyonlarının meydana gelmesinin birbirine bağlı olduğu gösterilmiştir (Şekil 2.6.) [54].



Şekil 2.6. Faz-I ve Faz-II biyotransformasyon reaksiyonları

Faz I reaksiyonlarının önemli bir kısmı, normal metabolizmanın spesifik enzimlerinden farklı mikrozomal enzimler tarafından katalizlenir [54].

2.4. Kimyasal Mutajenler ve Kanserojenler

Kimyasal mutajenler, DNA molekülünde neden oldukları değişmelere göre üç tipe toplanabilir. Tahrip edici, katılma (addison) ve yer alma (substitüsyon).

a) Tahrip edici mutajenler: Bu mutajenlere örnek olarak hidrojen peroksit (H_2O_2) ve nitroz asiti verilebilir. Nitroz asit, bakteri ve mantarlarda mutajeniktir. İnsanlarda ise mutajenik potansiyeli görünmemiştir. İnsan için tehlikesi netrik tuzları ile mide asiditesinde oluşan nitroz asitin, sekonder ve tersiyer aminlerle kuvvetli nitroz aminleri oluşturması ile ilgilidir [54].

b) Katılma şeklinde etki gösteren mutajenler: Bu gruptaki mutajenlere alkilendirici etkenleri örnek verebiliriz. Alkilendirici etkenler, alkil grupları DNA molekülüne eklerler yani alkilendirirler. Histolojide nükleikasitlerin boyanmasında kullanılan akridin boya DNA moleküllerine eklenerek

mutasyona neden olurlar. Akridinler, DNA üzerinde bağlanarak kompleks oluştururlar. Bu durumda iki baz arasındaki mesafe açılacaktır. DNA replikasyonunda bu açılmış yerin karşısına, yeni sentez edilen DNA ipliğinden yeni bir baz yerleşir. Böylece de mutasyon oluşacaktır. Bu boyalar insanlarda başlıca lokal antiseptik olarak kullanılır [54].

c) Yer değiştirme şeklinde etki gösteren mutajenler: DNA yapısında değişmeye neden olan bu kimyasal mutajenlere nükleik asit baz analogları örnektir [54].

Kimyasal maddelerin kanser oluşturabileceği ise, deneysel olarak ancak 1915 yılında Katsusaburo Yama Givva ve Koichi Ichikawa isimli iki Japon araştırmacının, tavşan derisinde sürekli ve lokal olarak katran uygulamalarında cilt kanserini gözlemlemeleri ile başlamıştır [54,67].

Kanserojenез, somatik hücrelerin baskısız bir şekilde büyüyüp çoğalması olarak tarif edilir. Kanselerde görülen kötü tabiatlı büyüme olayının kaynağının yani başlangıcının gen kökenli bir DNA değişikliği yani bir tür mutasyon olduğu düşünülmektedir [54,67].

Dış etkenlerden kimyasal maddeler, virüsler ve fiziksel faktörlerin kansere neden olduğu gösterilmiştir. Bu etkenlerden kimyasal kanserojenler 3 ana grupta inceleyebiliriz:

1. Primer veya doğrudan etkili kanserojenler,
2. Sekonder ve prokanserojenler,
3. Ko- kanserojenler veya kanser uyarıcı kimyasallar [54,67].

1. Primer kanserojenler: Genelde elektrofilitik (elektron eksikliği olan) tabiatlı veya serbest kök durumu alabilen bu moleküller, hücrel makro moleküllerde (DNA, RNA ve proteinler) doğrudan reaksiyona girebilir ve onları modifiye ederler. Bu gruba alkilleyici maddeler, inorganik kimyasallar ve bazı trifenil metan boyaları girer [48].

2. Sekonder kanserojenler: Kanserojenlerin çoğu bu gruba girer. Bu moleküller kimyasal, biyokimyasal ve biyolojik açıdan aktif olmayan (inert) bileşiklerdir. Bazıları kendiliğinden veya kimyasal yolla hidrolize olarak kanserojen haline dönerler. Bazıları spesifik metabolik aktivasyonlar sonucu primer kanserojenik formlarına çevrilirler. Metabolik aktivasyonu yürüten

enzimler organizma, organ ve dokulara göre farklılıklar gösterdiklerinden herhangi bir prokanserojen maddenin etkisi de enzim aktivitelerine paralel olarak farklı organizmalarda veya aynı organizmanın farklı organlarında farklı etkiler göstereceklerdir. Prokanserojenlerden bazıları; polinükleer aromatik azo boyaları, nitroaril, nitrosoöreler, alkoloid karbomatlar girer [48,54].

3. Ko-kanserojenler: Bu gruptaki kimyasallar kendileri kanserojenik etkiye sahip değildirler, fakat primer veya sekonder kanserojenlerin etkilerini arttırmaları. Ko-kanserojenlerden bazıları; forbol miristat asetat, antralin, linalil, pren katekol gibi bileşikler girer [48,54].

2.5. DNA Onarım ve Teknikleri

Spontan ya da indüklenen mutasyonlar DNA'da hasara sebep olmaktadır [67]. Bu hasar eğer giderilmezse replikasyon yoluyla aktarılabilir. Bunun sonucu olarak mutant hücre ya da organizmalar oluşur. Buna karşın, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde çeşitli onarım sistemleri gelişerek bu DNA hasarlarını giderme yolunda işlev görmektedir [68,69]. Bilinen DNA onarım mekanizmaları aşağıda açıklanmaktadır.

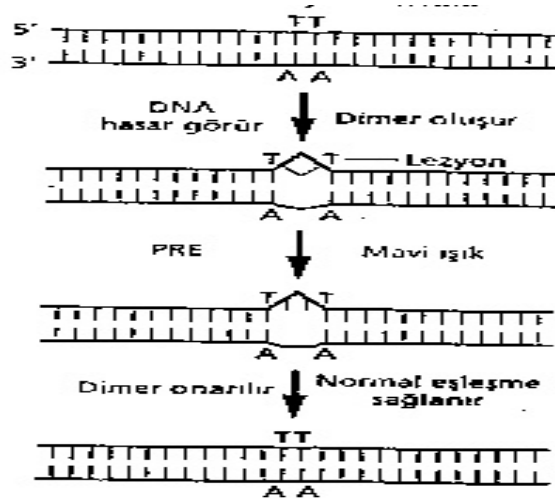
a) DNA polimeraz proofreading ile onarım

Bakterilerde baz çiftlerinin spontan değişme sıklığı her replikasyon için 10^{-7} - 10^{-11} civarındadır. Diğer yandan DNA polimerazın yeni sentezlenen ipliğe nükleotidleri eklerken yaptığı hata sıklığı ise 10^{-5} dir. Bu iki değer arasındaki fark polimerazın proofreading aktivitesidir. Çoğu bakteriyel DNA polimerazın $5'$ - $3'$ yönünde polimerizasyon, $3'$ - $5'$ yönünde ise ekzonükleaz aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Bu sayede doğru olmayan nükleotidler $3'$ - $5'$ yönünde tekrarlanmaktadır. DNA polimerazın proofreading aktivitesi, çevresel mutajenlerden polisiklik aromatik hidrokarbonlardan (PAH) tarafından engellenebilmektedir [68].

b) Fotoreaktivasyon ile onarım

UV ışığı uyarısıyla oluşan timin ya da diğer pirimidin dimerleri 320-370 nm dalga boylu görülür ışığın varlığında direkt olarak geri dönüştürülür. Fotoreaktivasyon ya da ışık onarımı denilen bu mekanizma, fotoliz enzimi

tarafından katalize edilir. Fotolizaz ışıkla aktif hale gelerek dimerleri ayırmaktadır. Fotolizaz tüm prokaryotlarda ve ilkel ökaryotlar da var iken insanda bulunmamaktadır. Şekil 2.7’de görüldüğü üzere hasarlı DNA fotoreaktivasyon tamir sistemi ile onarılır. Timin dimerini oluşturan bağ, mavi ışıkla aktive olması gereken fotoreaktivasyon enzimi (PRE) tarafından kırılır (Şekil 2.7.) [70].



Şekil 2.7. Fotoreaktivasyon onarım mekanizması

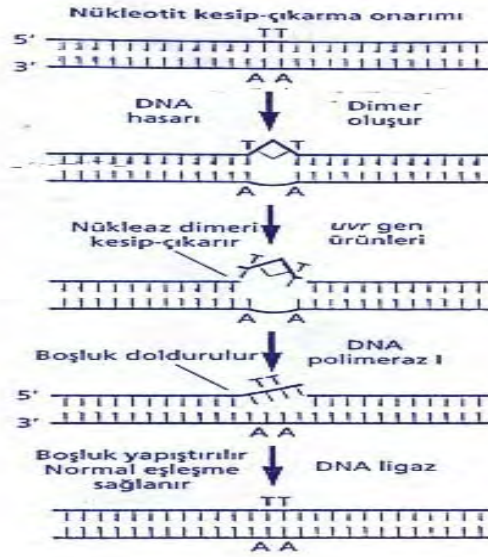
c) Alkilasyon hasarı onarımı

Alkilleyici ajan olarak bilinen mutajenler, memeli hücre DNA’sındaki metil ya da etil gruplarını aktarırlar [71]. Alkillenen bazlar yanlış baz eşleşmeleri yaparlar. DNA’ daki bu hasar, metil transferaz enzimi ile özgün bir şekilde onarılır. Bu enzim hatalı bazları değil, sadece onlara bağlı metil gruplarını kopararak uzaklaştırılır [61].

d) Kesme-çıkarma onarım yolu

Bu mekanizma 1964 yılında bir grup bilim adamı tarafından keşfedilen ve tüm canlılarda gerçekleşen bir onarım mekanizmasıdır [72]. Bu sistem dimerleri ışık gerektirmeyen bir reaksiyonla onardığı için “karanlık onarım” olarak da adlandırılır. *E.coli*’ de sadece pirimidin dimerlerini değil, DNA heliksinin distorsiyonunu (bükülme, katlanma) uyaran ciddi hasarları da onara bilmektedir. Hasar *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* genleri tarafından kodlanan *uvrABC* endonükleaz enzimi tarafından tanınmaktadır. Bu enzim DNA tek ipliğindeki hasarlı bölgede 12 nükleotitli kısmı kesmekte ve oluşan boşluk DNA polimeraz 5¹-3¹ aktivitesiyle

doldurulmaktadır. Şekil 2.8’de görüldüğü gibi UV tarafından uyarılan bir timin dimerinin nükleotit kesip-çıkarma onarımı (Şekil 2.8.).



Şekil 2.8. Kesip-çıkarma onarım mekanizması

e) AP bölgelerinin onarımı

DNA üzerindeki bazlarda deaminasyon gibi bir etki oluştuğunda, sitozin – urasile, adenin ise hipoksantine dönüşür. DNA glikosilaz enzimi bu anormal bazı tanıyarak ve hidroliz ederek dizinden koparır. Böylelikle DNA baz dizisi üzerinde, küçük bir boşluk şeklinde meydana gelen Apürinik ya da Apirimidinik bölgeler (AP), AP endonükleaz tarafından tanınır. Mol (2000) ve arkadaşları tarafından, prokaryot ve ökaryotlarda homolog olduğu kaydedilen bu AP endonükleaz enzim grubu, DNA ipliğini AP bölgesi yakınından keserek bir çentik açar. Bu noktada DNA polimeraz I devreye girerek eksonükleaz aktivitesiyle birkaç nükleotidi koparır. Ardından 5¹-3¹ polimerizasyon aktivitesiyle, yeni iplik sentezi gerçekleşir ve eksik olan bazın yeri, doğru nükleotitle tamamlanır [72,73].

f) Yanlış eşleşme onarımı (mismatch onarımı)

DNA replikasyonundan sonra dizide yer alan yanlış baz eşleşmelerinin pek çoğu, yanlış eşleşme onarımı denilen diğer bir sistem tarafından düzeltilmektedir. Bu mekanizma *E.coli*'de mut S, mut Z ve mut H genlerinin ürünleri tarafından başlatılır. Yanlış bazlar ekzonükleazla çıkarılır. DNA

polimeraz III ve ligaz ile tamamlanır. Yanlış eşleme onarımı, ökaryotlarda da *E.coli*' deki çok benzer şekilde, ancak başka genler tarafından yürütülür. Bu genler hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 olarak belirlenmiştir. hMSH2, *E.coli*' nin mut S geni ile diğer üç gen de *E.coli* mut L geni ile homoloji göstermektedir. Bu genlerin fonksiyon kaybı, genomdaki mutasyon birikimini arttırdığı için “mutator genler” olarak bilinirler.

g) SOS onarım sistemi

E.coli' de hasarlı DNA' ya farklı bir şekilde yanıt veren diğer bir onarım şeklidir. DNA sentezi esnasında bir lezyonun üstünden atlamak yerine bu sistem, DNA polimerazın lezyon karşısında replikasyonun devamına olanak veren koşulları hazırlar. Boşluk oluşturulmazken, replikasyonun doğruluğundan fedakarlık edilerek uyum sağlanır. Bu nedenle sistem “hataya meyilli” olarak tanımlanır.

Bu sistemde *lexA*, *RecA* ve *Uvr* 'de dahil olmak üzere 20 kadar farklı genin ürünlerinin, SOS yanıtında görev yapmak üzere DNA hasarı tarafından uyarıldığı saptanmıştır. Burada ilgi çekici olan nokta; sentezlendiği zaman *recA* ve *uvr* genleri ile diğer onarım genlerinin transkripsiyonunu baskılayan *lexA* protein ürünüdür. Bununla beraber *recA* proteinini boşluk bölgesindeki tek zincirli DNA' ya bağlandığı zaman, bu bağlanma her nasılsa *lexA* baskılayıcı molekülün yıkımını aktive eder ve onun regülatör görevini bozar. İşlevsel bir repressör molekülünün yokluğu, *RecA* ve *Uvr* genlerinin aktivasyonuna ve bu yolla onların kodladığı proteinlerin üretimini artmasına olanak sağlar. Bu ürünler lezyonu geçerek DNA' yı replike etmesini sağlar. Olay tamamlanınca; *recA* proteini inaktive hale gelir. Bu durumda, *lexA* artar, bu da *recA* ve hedef geni inhibe ederek, SOS sistemini kapatır.

2.6. Mutajenik ve Kanserojenik Maddelerin Saptanması Teknikleri ve Ames Testi

Çevremizde bulunan ve biyolojik etkileri bilinmeyen sayıları milyonları bulan sentetik ve doğal maddelerin kanserojenik potansiyelleri açısından test edilmeleri sağlığımız açısından gerekmektedir [48].

Bir maddenin kanserojenik potansiyeli, deney hayvanlarıyla veya insanlarla yapılan uzun zamanlı testlerle veya edipemiyolojik çalışmalarla ölçülmektedir. Uzun zamanlı testler, uygun hayvan türleri seçilerek hayvansal maddenin uygulanmasını takiben yapılan otopside patolojik ve histolojik çalışmalarla ölçülmektedir [41,48].

Memelilerde mutasyon testlerinin yapılmasında en önemli zorluk memeliler mikroorganizmalar gibi mutajenlere çok duyarlı değildirler.

DNA çok farklı bölgelerde ve çeşitli mekanizmalarla hasara uğrayabildiği için hasarın direkt olarak gösterilmesi teknik olarak zordur. Kimyasalların insanda oluşturduğu mutajenik ve karsinojenite olgusunun belirlenmesinde bakterilerin kullanımı, yaşayan tüm canlıların ortak genetik materyali olan DNA' nın primer yapısının incelenmesi temeline dayanmaktadır. Fiziksel ya da kimyasal ajanların DNA' da meydana getirdiği hasar, bakteriyel mutasyonları ölçebilen kısa-zamanlı testlerle saptanmaktadır [74]. Bakteriler gecelik kültürlerinde çok sayıda gelişirler ve nadir mutasyonel olayların saptanmasına olanak tanır.

Bakteriyel testlerde; mutajenik etki “ileri=forward” ve “geri =reverse” mutasyonları belirleyen yöntemlerle ölçülebilmektedir. İleri mutasyonu belirleyen genetik sistemler, geniş bir hedef bölgesinde gerçekleşen mutajen atağından sonra oluşan genetik değişimlerin fenotipe yansiyarak saptanmasını sağladığı için teorik olarak avantajlıdır.

Geri mutasyon yönteminde ise mutant bakteriler kullanılmaktadır. Bu bakteriler, fenotipik etkileri kolayca belirlenebilen gen lokuslarında istenilen tip mutasyonun oluşturulmasıyla, amaca uygun halde hazırlanmaktadır. Bu yöntem maruz kalınan test kimyasalının etkisiz olma ya da var olan mutasyonu baskılama sıklığını belirlemektedir. Test kimyasalının genetik hedefi küçük, özgül ve seçicidir. Kullanılan bakteri suşları mutajenlerin özgüllüğünü gösterecek çeşitli markerlere sahiptir. Geri mutasyon yönteminde en yaygın olarak kullanılan marker, bakterinin büyümesi için gereksinim duyduğu bir aminoasitin, bulunmadığı ortamda gelişerek, geri dönüşüm yapmasıdır.

Mutajenleri tanımlamakta kullanılan test sisteminin her biri farklı bir mutasyonu gösterdiği için değişik test sistemleri gelişmiştir. Bunlardan bazıları

DNA hasarlarına sebep olan kimyasalların test edildiği sitogenetik metotlardır. Bu testler kardeş kromatid değişimi (SCE = sister chromatid exchange), comet testi (gen dönüşümleri ve DNA kırılımları), programlanmış DNA sentezi (UBS = unscheduled DNA synthesis), SOS kromotest, transformasyon yöntemi ve Ames/Salmonella yöntemi şeklinde sıralanabilir [3,9,11,14,15,16,18,19]. Şimdi bunları tek tek inceleyelim.

a) Kardeş kromatid değişimi (SCE) yöntemi

SCE yönteminin prensibi; kardeş kromatidlerin birbirine kontrast sağlayacak şekilde boyanmasına dayanır. Kardeş kromatidlerden meydana gelen parça değişimi, boyama farklılığından hemen anlaşılır. Bu yöntemler sadece kromozomlarda oluşan yapısal değişimler gözlemlendiğinden dolayı SCE yöntemi sınırlı amaçlar için kullanılabilir [3,8,9,13,15,19].

b) Mikronükleus test yöntemi

Mikronükleus testi bölünme yeteneğine sahip tüm hücrelerde yapılabilen bir testtir ve 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 [3,9,14,16,17].

c) CA ve COMET test yöntemi

CA ve comet yönteminde ise hücreler metafaz safhasında incelenerek kromozom hatalarını ortaya çıkarıldığı sitogenetik bir yöntemdir [9,15,23,50].

d) UDS yöntemi

UDS yöntemi, “programlanmış DNA sentezi” testi olarak adlandırılır. Bu yöntemin prensibi, primer rat hepatositlerinde DNA tamirinin uyarılmasına dayanmaktadır. UV ile pozitif kontrol deneyleri yapıp otoradyografik olarak değerlendirilmektedir [9,18,19,20].

e) S.O.S. kromotest yöntemi

S.O.S. kromotestinin temeli, *E.coli*' de hasarlı DNA da S.O.S. cevabının uyarılmasına yöneliktir. *E.coli*' de SOS sisteminin genel reseptörleri ile gen kontrol edildiğinden dolayı S.O.S. kromotest, DNA hasarlarını tespit etme olanağı sağlar [10,12].

f) Transformasyon yöntemi

Transformasyon yönteminde, M2-C3H fare fibroblast hücrelerinde malignant transformasyonun uyarılmasıyla kimyasal maddelerin mutajenik ve tümorojenik etkileri ölçülür. Kanserojenik maddelerin tespiti için daha uygun bir testtir [22].

g) Umu test yöntemi

Umu test yöntemi, DNA hasarları için bir kromojenik testtir. Bu test için sadece tek bir bakteri suşu gereklidir. Yüksek bakteriyotoksik etkilere sahip olan kimyasalların teşhisinde kullanılabilir. Umu test suşu olan TA 1535/ psk 1002'ye eklenen çok kopyalı plazmidler, NR (nitroaren) geni, NAT (N-asetil transferaz) geni ya da her ikisini bakteriye aktarmaktadır. Sonuç olarak bu bakteri suşu DNA hasarına sebep olan “nitroantren” ve “aromatik aminler”e karşı hassasiyet kazanır [10].

h) Salmonella / Mikrozoim (Ames) test

Ames testi, 1970'lerin başında Bruce Ames tarafından geliştirilen ve daha sonra yaygın olarak kullanım alanı bulmuş olan kısa zamanlı, bir geri mutasyon testidir [4]. Salmonella / Mikrozoim testi bakteriyel mutasyon testleri içinde detayları en iyi bilinen ve karakterilize edilen, geçerliliği uygulama kolaylığı ve hassaslığı nedeniyle en fazla kabul görerek tercih edilen ve günümüzde de sıklıkla kullanılan bir yöntemdir [74]. Test organizması olarak kullanılan *Salmonella typhimurium*, histidin geninde oluşturulan farklı mutasyonlarla (his G, his C yada his D), gelişmek için histidin gereksinimi duyan değişik tipte oksotrofik mutantlara dönüştürülmüştür. Çok yaygın kullanılan suşlar çizelge 2.1'de verilmiştir.

Bilinen bakteriyel mutajenlerin büyük bir kısmını belirlemede çok hassas oldukları için TA 98 ve TA 100 kombinasyonu kabul görmüştür [74].

Bu testin temeli, yapay mutasyonla oluşturulmuş olan *Salmonella typhimuriumun* histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş (His⁻ = oksotrof) olan suşlarının test bileşeni ile muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyon geçirip his⁺ hale geri dönüşmesi temeline dayanır. Çizelge 2.1'de yaygın kullanılan *Salmonella typhimurium* suşları ve sahip oldukları mutasyonlar gösterilmektedir (Çizelge 2.1).

Diğer bakteriyel testlerde olduğu gibi Ames testinde de eksik olan unsur, memelilerde detoksifikasyon mekanizmasını gerçekleştiren enzim sisteminin olmayışıdır. Bu sistem pek çok kimyasal grubu reaktif olmayan hale getirirken, bazı bileşikleri de DNA ile etkileşime girebilen yüksek ölçüde elektrofilik mutajenik hatta karsinojenik forma dönüştürmektir [75]. Enzim özütü, kofaktör, tuzlar ve tampon sistemle tamamlandığında, S9 karışımı adını alır. Ames testinde de S9 enzimi kullanılır.

Ames yönteminde pozitif sonuç veren bir ajanın insan ya da diğer memelilerde mutajenik veya karsinojeniktir denilemez. Bakteriyel mutasyonun pozitif olması, ajanın potansiyel zararı konusunda bir ön uyarı anlamını taşır. Ames testi bu sebeple dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çizelge 2.1. Yaygın kullanılan *Salmonella typhimurium* suşları

Mutasyon Suş	Mutasyon Tipi	Geri Dönüşüm Tipi
hisG428	TA102 w/t CAG-AGC-AAG-CAA-GAG-CTG- TA104 mutant CAG-AGC-AAG-TAA (ochre)	Transisyon Transversiyon Küçük delesyon
hisG46	TA100 w/t GTG-GTC-GAT-CTC-GGT-ATT TA1535 mutant CCC	Baz çifti değişimleri
hisD6610	TA97 w/t GTC-ACC-CCT-GAA-GAG-ATC- GCC mutant GTC-ACA-CCC-CCC-TGA	Çerçeve kayması
hisD3052	TA98 w/t GAC-ACC-GCC-CGG-CAG-GCC- TA1538 CTG-AGC mutant GAC-ACC-GCC-GGC-CCC- TGA	Çerçeve kayması

2.7. Ames /Salmonella/ Mikrozom Testi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Ames testi kullanılarak çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bunlardan bazıları şunlardır;

İn vitro salmonella mutajenite testi kullanılarak rat ve balıktaki karaciğer S9 enzim aktivitesi karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak; S9 enzimiyle birlikte 8 promutajen, rat ve balığa uygulanmış. Ratta metabolik aktivitede değişiklik gözlenirken, balıkta ise karaciğer metabolik aktivitede önemli bir değişim bulunamamıştır [6].

Salmonella / mikrozom test sisteminde kullanılan TA 98 ve TA 100 suşlarıyla birlikte çeşitli faktörler araştırılmış ve geriye dönen koloni sayılarına bakılmış. Daha sonra S9 enzimiyle de aynı çalışma yapılmış sonuçta; geriye dönen koloni sayısında değişiklik olduğu görülmüştür [76].

nemli nitrobenzenlerin ve nitroanilinesin genotoksik aktivitelerinin Ames testi ile araştırılmış. Nitro ve aminobenzenler ve patlayıcı trinitrobenzen için *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 her ikisi için S9 varlığında ve yokluğunda mutajenite testi yapılmış, TA 98 için bütün maddeler pozitif sonuç gösterirken, TA 100 için sadece 4 maddenin mutajenik olduğu görülmüştür [77].

Aromatik Nitro bileşiklerin Ames pozitif ile; antiseptik, AMP 397 ilacının genotoksisitesi değerlendirilmış ve genotoksik ve karsinogenetik çalışmalarda Nitro aromatik bileşiklerden 4- nitro quinoline- 1-oxide potansiyel kanserojen bulunmuştur (TA 98+ kontrolde kullanılıyor) [78].

İzmir körfezine akan dere sedimentlerinin mutajenitesi araştırılmıştır. Bu alışma, Aralık 1995 tarihleri arasında İzmir körfezine dere olan Manda, Melez, Laka, Bostanlı, Bornova ve Gediz nehirleri ağızlarından alınan sediment örneklerinde *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları ile Ames'in mutajenite testi uygulanmıştır.

Test sonucuna göre körfezin iç kısmına drene olan dereler taşıdıkları kirlilik yükü sebebi ile körfez için mutajenik aktivite kaynağı teşkil etmektedir [79].

Brezilya'da Sao Paula bölgesindeki doğal su kaynaklarının kalitesi 20 yıl süre Salmonella mutajenite testi kullanılarak araştırılmış ve bu yöntemin kirlenen

önemli çevre kaynaklarının belirlenmesinde yararlı bir araç olduğu vurgulanmıştır [80].

Ames /Salmonella /Mutajenite testinde kullanılan TA 98 ve TA 100 suşları kullanılarak Porsuk Nehri'nin genotoksik etkisi araştırılmış. Çalışmadan alınan sonuçlar da Porsuk Nehri'nin fabrika etkisi altında bulunan bölgedeki değerler dikkat çekici bulunmuştur. Bu bölgenin baraj alanına yakınlığı ise barajda arıtılan ve şehre dağıtılan suyun sağlık açısından sorgulanması gerektiğini ortaya çıkarmıştır [81].

Tekstil endüstrisinde kullanılan boya maddelerinin Ames test sistemi ile mutajenik etkileri araştırılmış. Sonuç olarak bu çalışmada, test edilen kimyasallardan bir tanesi kuvvetli mutajen bulunurken diğer ikisinin zayıf mutajen ve geri kalan üç tanesinin mutajen olmadığı tespit edilmiştir. Sonuçlara göre kullanılan boya maddelerinin üçünün mutajen etki göstermesi çok önemli bir tehlike yaratmaktadır. Bu boya maddeleri fabrikadaki kullanımdan sonra fabrika atık suyu olarak ana su kütlelerine veya onlara ulaşan akarsulara karışarak bu yaşama ortamlarında yaşayan canlılığın temel yapıtaşı olan DNA'yı etkilemektedir. Bu yolla dünyamızda var olan ve doğal sulardaki kimyasal kirlenmenin yaşamsal ilişkiler açısından, insanlar için de çok önemli ve değerli olan pek çok canlı türünün sağlığını hatta varlığını tehdit ettiğini dolayısı ile ekosistemimizin dengesini bu derece etkileyen bir durum olduğunu göstermektedir.

Ames testi boyaların mutajenitesinin tespiti için basit, çabuk ve ucuz uygulanabilir bir test olmakla beraber boya maddelerinin insan üzerinde oluşturabileceği bozukluklara ve sebep olabileceği etkileri tahmin etmek açısından önemlidir [82].

2.8. Benzinideniline'nin Sentezi ve Yapısı

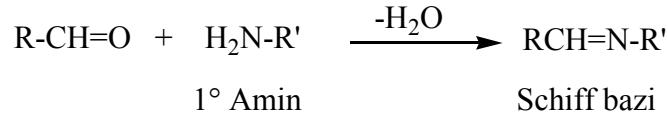
2.8.1. Benziniden-Anilin sentezlenmesi ve schiff bazları oluşumu

Bir deneme tüpü içinde 1 cm³ anilin 1 cm³ benzaldehid ile su banyosu üstünde ısıtılır. Bir bulanıklık husule gelerek su ayrılır, tüp soğutulduğu zaman

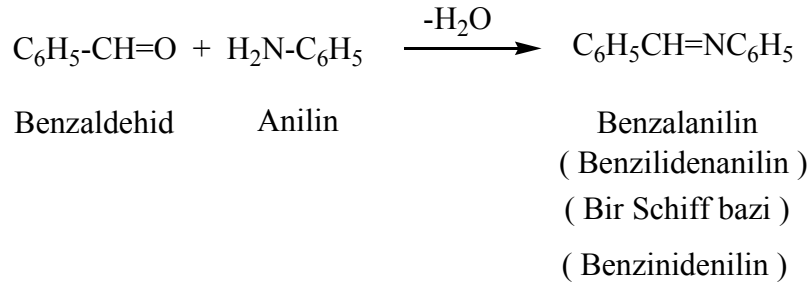
içindeki karışım donarak schiff bazı (azo-metin) denilen madde meydana gelir (Erime noktası 72 °C'dir.).

Zayıf asit karakterindeki bu kondensasyon ürünü asit ısıtıldığı zaman komponentlerine ayrılır. Bu, primer aminlerin genel bir reaksiyonudur [83].

Aldehidler, Primer Aminler RNH₂ ile birer İmin karakterinde olan schiff bazlarını oluştururlar.



R ve R¹ gruplarının alkil veya aril grupları olabildiği bu reaksiyonda özellikle aromatik aldehidler kullanıldığı zaman kararlı ürünler elde edilir.

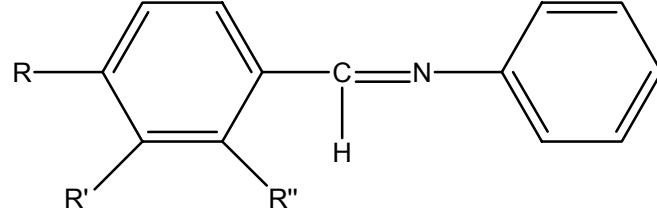


Schiff Bazları oluşumu aldehidlerin tanınmasında kullanılabilen bir reaksiyondur [84].

Schiff bazları biyolojik olarak aktif moleküllerin en önemli sınıflarındandır. Görmede başlıca rol oynarlar. Trans-N-benzinidenilin genellikle schiff bazlarına örnek verilir [85].

2.8.2. Benzinidenilin genel yapısı

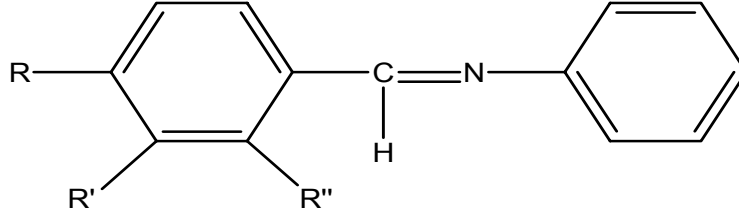
Benzinidenilin türeyiği anilin ve benzaldehitin yer değiştirdiği ethanol ile reaksiyona sokularak sentezlenmiştir. Bu bileşimlerin yapıları IR, ¹H – NMR ve ilk analiz yoluyla açıklanmıştır. Şekil 2.9'da Benzinidenilin bileşiğinin genel yapısı gösterilmektedir (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. Benzinidenilinin genel şekli

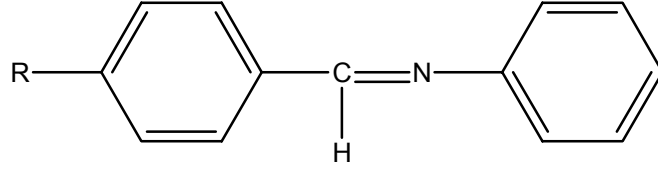
Benzinidenilin türeyikleri hala şifa veren etkileri için araştırılmakta olan ürünlerdir ve ilaç imalatında kullanılmaları düşünülmektedir, ancak mutajenik aktiviteleri hakkında bir gözlem raporlanmamıştır.

Benzinidenilinden yerleri değiştirilmiş bazı türeyikler sentezlenmiştir. Bu bileşiklerin erime noktaları literatürde yer alan erime noktalarıyla karşılaştırılmış ve araştırılmıştır. Literatürlerde bu ürünlerin mutajenisitesi ile ilgili gözlemlere rastlanmamıştır. Şekil 2.10,11'de Benzinidenilinden türetilmiş bileşikler gösterilmektedir (Şekil 2.10,11.).



R	R'	R''
-NO ₂	-H	-H
OCH ₃	-H	-H
-H	-NO ₂	-H
-H	-H	OCH ₃

Şekil 2.10. Bazı 2-Süstitüe Benzinidenilin türevleri



R : -Cl , -CH₃ , -Br , -OH

Şekil 2.11. Bazı 2- Süstitüe Benzinidenilin türevleri

Bu çalışmada, bu benziniden ilin türevlerinin mutajenik etkileri ayrıca metabolik aktivasyon olmadan ve olarak Ames/Salmonella/Mikrozom testi yoluyla araştırılmıştır. Deneylerde *Salmonella typhimuriumun* TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır.

Yapı-aktivite ilişkileri mutajenler ve zayıf mutajenler olarak ele alınan bileşikler için araştırılmıştır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Deneyde kullanılan *Salmonella typhimurium* test suşları

Mutajenite testlerinde, *Salmonella typhimurium* bakterisinin LT2 atasal suşundan in vitro mutasyonlar ile üretilen mutant suşları kullanılmaktadır. Bu mutant suşlardan bazıları TA 1535, TA 1537, TA 1538, TA 97, TA 98, TA 100, TA 102 suşlarıdır. Mutajenite testlerinde en çok TA 97, TA 98, TA 100 ve TA 102 suşları kullanılır.

Ames testinde *Salmonella typhimuriumun* seçilmesinin sebebi, onların mutasyona duyarlı olmasıdır. Çünkü;

1. Mutasyon, bakterinin hücre duvarında bulunan lipopolisakkarit bariyerini kaplayarak büyük zarar verir. Sonuç olarak, büyük moleküllerin geçirgenliği artar (Rfa mutasyonu).

2. Mutasyon, bakteriyel hücre sisteminin kesme ve onarımda hata oluşturur. Dolayısıyla DNA onarım mekanizmasında hata oluşur ve mutasyonel hasar meydana gelir (uvr B mutasyonu) .

3. Plazmidler ve multikopy plazmidler DNA onarım sisteminde hataya meyillidir.

LT2 atasal suşu, yani prototrofik bakteriler, histidin aminoasidini sentezleme yeteneğine sahiptirler. Oysa, mutant suşlar ise histidin operonunun farklı yerlerinde, farklı tipte mutasyonlar içermektedir. Bu yüzden mutant suşlar, ortamda hazır olarak histidin aminoasidi bulunmadığında çoğalamazlar. Mutant suşlar histidin mutasyona ek olarak, mutajenleri ortaya çıkarma yeteneklerini büyük oranda arttıracak başka mutasyonlar içerir.

Deneyde, Ames ve arkadaşları tarafından, *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan in vitro mutasyonlarla geliştirilmiş TA 100 ve TA 98 suşları kullanılmıştır.

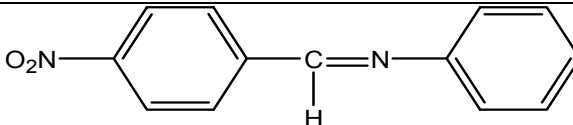
3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

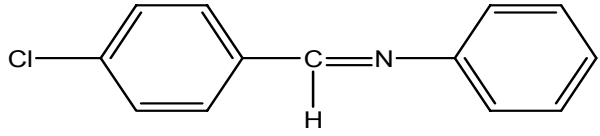
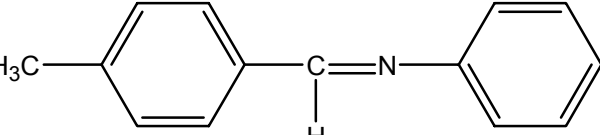
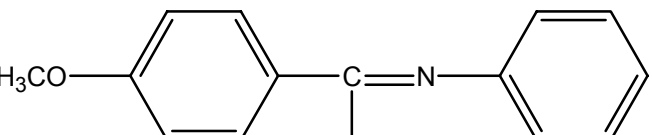
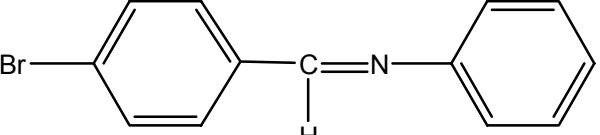
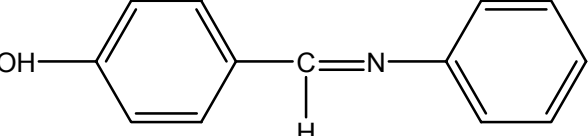
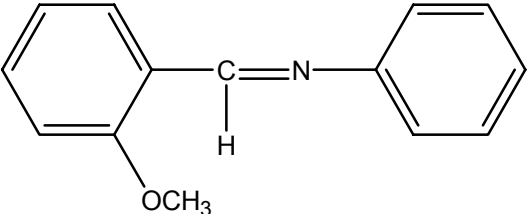
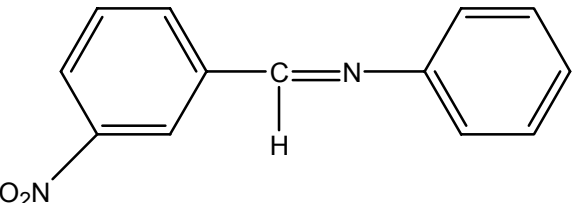
Benzinidenilinin 8 ayrı türevi, 4-Nitro-o-fenilendiamin (Aldrich), D-Biyotin (F.W.247.3), K₂HPO₄, MgSO₄. H₂O, NaNH₄ (HPO₄.4H₂O), NaOH, NaCl, 3.Metilkollantren, DMSO, NADP, Sitrikasit monohidrat, L-Histidin. HCl (F.W. 191.7), Ampisilin trihidrat (sigma), Sodyum azid (Merck), 2-amino- fluoren, Nutrient Broth No:2 (oxoid), 1M Glukoz-6-Fosfat, S9 karışımı, Bacto Agar (Difco)'dan temin edilmiştir.

3.1.3. Test maddeleri dozları ve hazırlanışı

Bu çalışmada 8 ayrı Benzinidenilin bileşiğinin mutajenik etkileri Ames/Salmonella/Mikrozom test yöntemiyle araştırılmıştır. Test maddeleri Benzinidenilin 8 ayrı türevidir ve Prof.Dr.İlhan Işıkdag (Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi) tarafından sentezlenmiştir. İsimleri sırasıyla; 4-Nitro benzinidenilin, 4-Kloro benzinidenilin, 4-Metil benzinidenilin, 4-Metoksi benzinidenilin, 4-Bromo benzinidenilin, 4-Hidroksi benzinidenilin, 2-Metoksi benzinidenilin, 3-Nitro benzinidenilin. Bu maddelerin açık formülleri çizelge 3.1' de gösterilmektedir (Çizelge 3.1). Bu maddeler dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülmüşler ve oda sıcaklığında saklanmışlardır. 8 madde için 5'er doz (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵) hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan Benzilidenanilin türevleri

No	R	İsim	M.A g/mol
1.		4- Nitro benzinidenilin	226 g/mol

2.		4- Kloro benzinidenilin	215,5 g/mol
3.		4- Metil benzinidenilin	195 g/mol
4.		4- Metoksi benzinidenilin	211 g/mol
5.		4- Bromo benzinidenilin	260 g/mol
6.		4- Hidroksi Benzinidenilin	197 g/mol
7.		2- Metoksi benzinidenilin	211 g/mol
8.		3- Nitro benzinidenilin	226 g/mol

3.1.4. Deneyde kullanılan ortamların içerikleri ve hazırlanmaları

Vogel Bonner Medium E (50x)

Kullanım: Minimal glikoz agar plaklarının hazırlanmasında kullanıldı.

Distile su.....	167,5 ml
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	2,5 gr
Sitrikasit monohidrat.....	25 gr
K ₂ HPO ₄	125 gr
NaH ₂ NH ₄ (PO ₄ .4H ₂ O).....	43,75 gr

Maddeler yukarıda yazıldıkları sıra doğrultusunda sıcak suyun içine eklendi. Bir madde iyice çözünmeden diğeri eklenmemesi gerekir. Daha sonra hacim 1 litreye tamamlandı. 1 litrelik 2 kaba bölünerek 121 °C’de 20 dakika süreyle otoklava konarak steril hale getirildi.

(0.05 mM) Histidin / Biotin çözeltisi

Kullanım: Mutasyon deneyinde kullanılıyor.

D-Biotin (F.W 273.3).....	30,9 mg
L- Histidin.HCl (F.W.273.3).....	240 mg
Distile su.....	250 ml

Biotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözünür. Daha sonra histidin ilave edilerek karışım otoklav edilir. Histidin / biotin hazırlandıktan sonra + 4 °C’ de saklanır.

(% 0,8/0,02 NaOH) Ampisilin solüsyonu

Kullanım: Ampisiline dirençlilik kontrolü ve HBA plaklarının hazırlanmasında kullanılır.

Ampisilin trihidrat.....	0,89gr
0,02 M Sodyum Hidroksit.....	100 ml

Ampisilin trihidrat, 0,02M NaOH içinde çözülür ve 0,22 Mm çaplı filtreden geçirilerek steril edilir. + 4 °C’ de saklanır.

(% 0,1) Kristal Viyole çözeltisi

Kullanım: Suşların kristal viyoleye duyarlılıklarını, dolayısıyla rfa mutasyonu taşıyıp taşımadıklarını kontrol etmek için kullanılır.

Kristal viyole..... 0,1gr
Distile su.....100 ml

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

(% 0,13) Biotin çözeltisi

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanmasında kullanılır.

D-Biotin.....0,00065 gr
Distile su.....50 ml

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

(% 0,5) Histidin çözeltisi

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanmasında kullanılır.

L-Histidin.HCI (F.W.91,7).....2 gr
Distile su.....400 ml

Histidin ile distile su karıştırılarak otoklav edilir.

(% 20) Glukoz çözeltisi

Kullanım: MGA ve HBA plaklarının hazırlanmasında kullanılır.

Glukoz.....20 gr
Distile su.....100 ml

Glukoz distile su içinde çözülerek otoklav edilir. 0- 4 °C' de saklanır.

Sodyum Azid (AZS)

Kullanım: Pozitif kontrollerde kullanılır.

5 Mg/petri olmak üzere DMSO içinde çözülerek hazırlanır. 0 °C ile + 4 °C arasında saklanır. TA 100 suşu için S9 karışımı gerektirmeyen bir kimyasaldır.

4-Nitro-o-Fenilendiamin (NPA)

Kullanım: Pozitif kontrollerde kullanılır.

2.5 mg/petri olmak üzere DMSO'da çözülerek kullanılır. TA 98 suşu için S9 karışımı gerektirmeyen bir kimyasaldır. Oda ısısında saklanır.

Top agar

Kullanım: Mutasyon deneyinde kullanılıyor.

Agar.....1,5 gr
NaCl.....1,25 gr
Distile su.....250 ml

Maddeler su içinde çözülerek, 121 °C' de 20 dakika otoklavlanarak steril edilir.

Histidin / Biotin plakları (HB agar)

Kullanım: Histidin gereksinim deneyinde kullanılıyor.

Agar.....3 gr
Distile su.....182 ml
50 XVB tuzları.....4 ml
% 20 Glukoz.....20 ml
Histidin.HCl.H₂O.....2 ml
Biyotin çözeltisi.....1,2 ml

Agar ve su karıştırıldıktan sonra otoklav edilir. 45 °C' ye kadar soğutulup % 20 glukoz, 50XVB tuzları ve histidin çözeltisi eklenir. Son olarak biyotin çözeltisi eklenir, karışım steril perilere dökülür.

Histidin / Biotin / Ampisilin plakları (HBA agar)

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

Agar.....3 gr
Distile su.....182 ml

50 X VB tuzları.....	4 ml
% 20 Glukoz.....	20 ml
Histidin.HCl.H ₂ O.....	2 ml
0,5 mM Biyotin.....	1,2 ml
(% 0,8/0,2 NaOH) Ampisilin.....	0,6 ml

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

Minimal Glukoz Agar plakları (MGA)

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

Agar.....	7,5 gr
Distile su.....	415 ml
50XVB tuz.....	10 ml
% 20 Glikoz.....	50 ml

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

Nutrient agar plakları

Kullanım: Gecelik kültürün ml'sindeki bakteri sayısını bulma ve genotip kontrollünde kullanılır.

Oxoid Nutrient Broth no:2.....	2,6gr
Agar.....	1,6gr
Distile su.....	100 ml

Agar, broth ve su karıştırılıp otoklavlanır ve petrilere dökülür.

Nutrient broth sıvı kültür ortamı

Kullanım: Bakterilerin gecelik kültürde büyütülmesinde kullanılır.

Oxoid Nutrient Broth.....	5 gr
Distile su.....	200 ml
Ampisilin.....	630 ml

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

2-Aminofluorene (2AF)

Kullanım: Pozitif kontrolde kullanılır.

10.0 mg/petri başına olmak üzere Dimetil sülfoksit (DMSO)’de çözülerek kullanıldı. S9 karışımı gerektiren kimyasal 0 °-4 °C’ de saklanır.

3-Metilkolantren

Kullanım: Metabolik aktivasyon hazırlanmasında kullanılır.

3.Metilkolantren.....64mg

Mısır yağı.....1ml

80 mg/kg olmak üzere mısır yağında çözülerek 0,2-0,5 ml olarak intraperitoneal olarak (IP) ratlara enjekte edilir.

0,1 M NADP çözeltisi

Kullanım: S9 karışımında kullanıldı.

NADP (F.W.765).....383 mg

Steril distile su.....5 ml

Çözelti 0,22 Mm por çaplı Molsheim GBWP tip filtreden geçirilerek steril edildi.

(0,2M) Fosfat tamponu (PH 7.4)

Kullanım: S9 karışımında kullanıldı.

0,2 M NaH₂PO₄H₂O (13.8G/500ml).....60 ml

0,2 M Na₂HPO₄ (14.2 g/500 ml).....440 ml

Karışım hazırlanıp 121 °C’de 20 dakika steril edildi.

(% 10) S9 karışımı

Kullanım: Metabolik aktivasyon deneyinde kullanıldı.

Mikrozom.....	1 ml
MgCl ₂ -KCl tuzları.....	0,2 ml
Glukoz-6-fosfat.....	0,05 ml
0,1 M NADP.....	0,4 ml
0,2 M fosfat tamponu (PH 7.4).....	5 ml
Steril distile su.....	3 ml

Tüm kimyasallar buz içindeki steril bir kaptaki karıştırıldı.

(0,15 M) KCl çözeltisi

Kullanım: Mikrozom izolasyonunda kullanıldı

KCl.....	11,275gr
Distile su.....	1000ml

11,25 gr KCl alınıp su ile 1 litreye tamamlanarak çözüldü. Karışım 121 °C’de 20 dakika otoklavda steril edildi.

KCl-MgCl₂ tuz çözeltisi

Kullanım: S9 karışımında kullanıldı.

KCl.....	61,5 gr
MgCl ₂ .6H ₂ O.....	40,7 gr
Distile su.....	500 ml

KCl ve MgCl₂ tuzları alınıp distile su ile 500 ml’ye tamamlandı. 20 dakika 121 °C’ de otoklavda steril edildi.

1M Glukoz-6-Fosfat çözeltisi

Kullanım: S9 karışımı

Glukoz-6-Fosfat.....	2,82gr
Steril distile su.....	10ml

Çözelti 0,22 Mm por çaplı filtreden geçirilerek steril edildi.

3.2. Metod

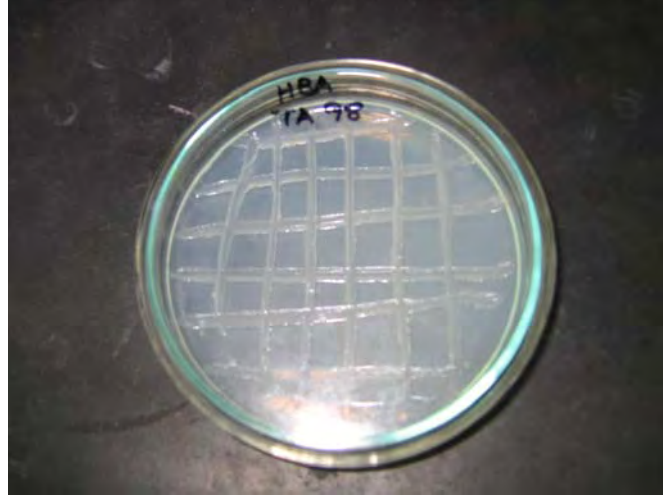
3.2.1. *Salmonella* suşlarının kültürlerinin ve master plakların hazırlanması

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

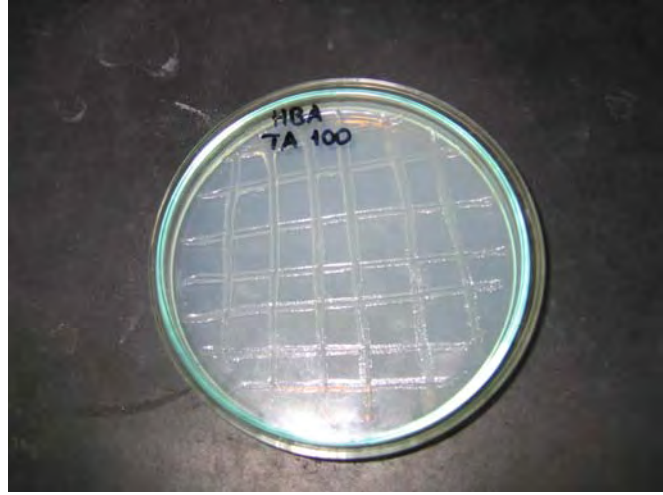
3.2.2. *Salmonella typhimurium* suşlarının stoklanması ve stok kültürlerinin açılması

Test suşlarının canlılığını ve mutant özelliklerini uzun süre koruyabilmeleri için stoklanması gerekir. Bunun için Histidin/Biyotin/Ampisilin agar da üremiş olan *Salmonella* suşlarından iyi izole olmuş, bir koloni öze ile alınıp 2 ml Nutrient Broth içeren tüplerde süspanse edilir ve 37 °C’ de, bir gece (12-16) inkübe edilir. Bu sürenin sonunda steril ependorf tüplerinin içerisine 1 ml bakteri kültürü ve 0,09 ml dimetil sülfoksit (DMSO) ilave edilmiş ve –20°C’de donması sağlandıktan sonra –80 °C’ de saklanmıştır.

Kültürün açılması gerektiğinde, stok bakteri kültürü oda sıcaklığında eritilip bir öze dolusu alınarak Histidin/Biyotin (HB) agar plaklarına paralel ekim yapılmıştır. 37 °C’ de 48 saat inkübe edilmiş ve bu sürenin sonunda iyi izole olan bir koloni öze ile alınıp Histidin/Biyotin/Ampisilin agar plaklarına paralel ekim yapılmıştır. HBA plakları 37 °C’ de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası master plaklar +4 °C’ de iki ay süre ile saklanabilir ve gerektiğinde gecelik kültür hazırlamak için kullanılabilir. Şekil 3.1’de TA 98 ve TA 100 suşlarının master plaklarda üremesi gösterilmektedir (Şekil 3.1.a ve b.).



Şekil 3.1.a. TA 98 suşunun master plaklarda üremesi



Şekil 3.1.b. TA 100 suşunun master plaklarda üremesi

3.2.3. *Salmonella typhimurium* suşlarının genotip özelliklerinin açıklanması

Bu test sisteminde, *S.typhimurium* LT2 atasal suşundan in vitro mutasyonlarla elde edilmiştir. TA 98 ve TA 100 mutant suşları kullanılmaktadır. Deneyde kullanılan *Salmonella typhimurium* mutant suşlarının sahip olduğu genotipik ve fenotipik özellikleri aşağıdaki çizelge 3.2' de özetlenmiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Deneide kullanılan *Salmonella typhimurium* mutant suşlarının sahip olduğu genotip ve fenotipik özellikleri

Mutant suşlar	Histidin Mutasyonu	Lipopolisakkarit (LPS)	Onarım	R-faktör
TA 98	HİS D 3052	Rfa	D uvr B	+
TA 100	His G46	Rfa	D uvr B	+

Histidin Mutasyonu: Her test suşu, histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içermektedir. Bunlar, ya DNA'daki tek bir bazın değişmesiyle ortaya çıkan baz değişimleri ya da tek bir bazın eklenmesi ya da çıkarılması ile kendini gösteren çerçeve kayması mutasyonlarıdır. Bunlardan TA 98'de olan his D 3052 ve TA 100'de bulunan his G 46 inceleyelim.

His D 3052: His D⁺ geni histidinol dehidrojenaz enzimini kodlar. His D 3052 mutasyonu çerçeve kayması tipinde bir mutasyon olup nükleotit eksikliği his D⁻ geni içinde 8 kere tekrarlanan (- GCGCGCGC -) bölgesindedir. Bu nedenle;

(- CGCGCGCG -)

bu suş genellikle çerçeve kayması tipi mutasyonlara sahip olan mutajenik / kanserojenik kimyasallarla his⁺ hale dönüştürülür.

His G46: Bu mutasyon histidin biyosentezinde rol alan, ilk enzimi kodlayan gende lösün kodunu (-GAG-) yerine prolin kodunun(-GGG-) gelmesine neden olur.

(-CTC-)

(-CCC-)

Başlangıçta geliştirilen bu mutantların çeşitli kimyasallara karşı duyarlılığını arttırmak için bu suşlara aşağıda bahsedilen mutasyonlar eklenmiştir.

Rfa mutasyonu: Bu mutasyon hücre yüzeyini saran lipopolisakkarit tabakasını zayıflatarak normalde hücre içine giremeyen büyük moleküllerin hücre içine girmelerini sağlar. TA 98 ve TA 100 ikisinde de bu mutasyon vardır.

Uvr B mutasyonu: DNA'nın kesme-onarım-tamir mekanizmasından sorumlu uvr B genindeki delesyon sonucu oluşur. Bu kısımda normalde uvr B⁺, chl⁺ ve bio genleri bulunmaktadır. UvrB geni kesme-onarmada görevli bir enzimi kodlamaktadır. Sonuçta bu enzimin yokluğunda mutant suşu değişik mutajenlere

karşı daha hassas hale gelmektedir. TA 98 ve TA 100 suşları bu tip mutasyonu içermektedir.

R faktör (+): pKM101 Ampisilin dirençlilik geni taşıyan, hücrede çok sayıda bulunan bir plazmidir. Bu plazmidin hücrede bulunuşu, bu hücrelerde normalde bulunan, hata frekansı yüksek olan error-prone DNA onarım mekanizmasını aktif hale getirir. Sonuç olarak, kimyasalların etkisiyle veya spontan olarak mutasyonların artmasına neden olur. TA 98 ve TA 100 suşlarının her ikisinde de bu tip mutasyon bulunmaktadır.

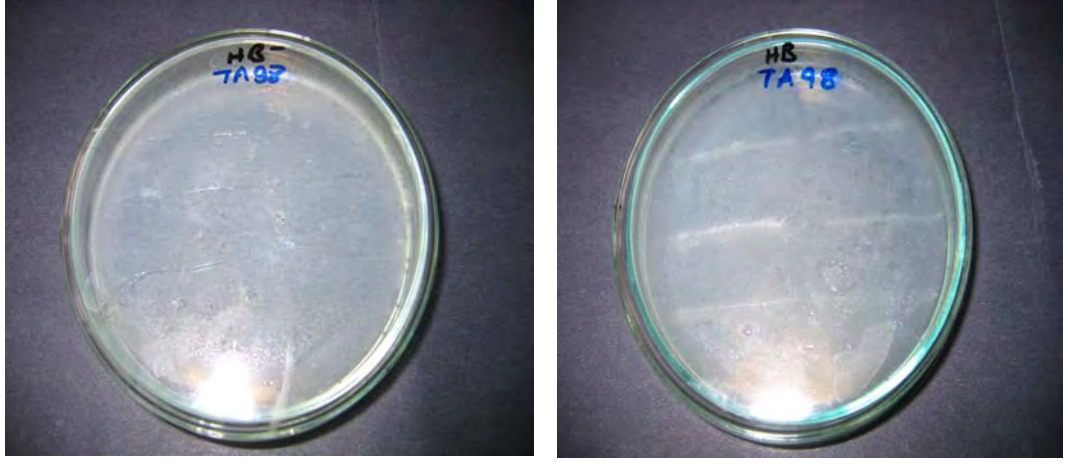
3.2.3.1. *Salmonella typhimurium* suşlarının kontrol testlerinin yapılması

A. *Salmonella typhimurium* suşlarının genotiplerinin kontrol edilmesi

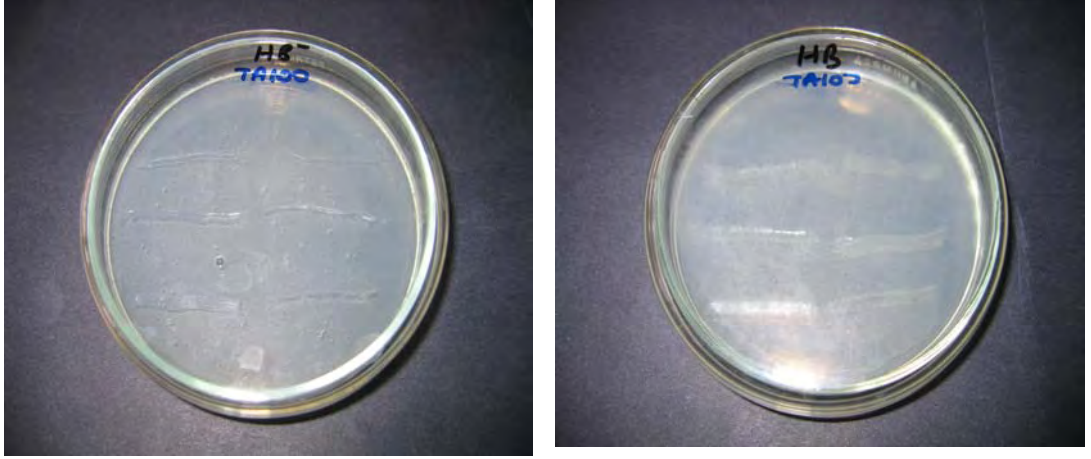
Testin güvenilirliği açısından test suşlarının orjinal mutasyonlara sahip olup olmadıklarının bilinmesi gerekir. Bu nedenle bakterilerin genotipleri çeşitli testlerle kontrol edilir. Bunlar;

1. Histidin gereksinimi kontrolü

Bakterilerin minimal glukoz agar (MGA) üzerine ekilmeleri sonucu his⁻ bakteriler his⁺lerden ayırt edilir. Bu amaçla, Nutrient Broth'da, bir gece üretilen bakterilerden MGA ve HB plaklarına ekilerek 37 °C' de ve 48-78 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonucu HB plaklarında üreme gözlenirken MGA plaklarında üreme gözlenmez. Dolayısıyla bu sonuç bize bakterilerin His⁻ mutasyonu taşıdığını gösterir. Şekil 3.2.a ve b'de TA 98 ve TA100 suşlarının histidin içermeyen ve histidin içeren ortamlara ekilmeleri sonucunda gösterdikleri davranışlar görülmektedir (Şekil 3.2.a ve b).



Şekil 3.2.a. TA 98 suşunun histidin gereksinimi kontrolü sonucu HB plaklarında üreme

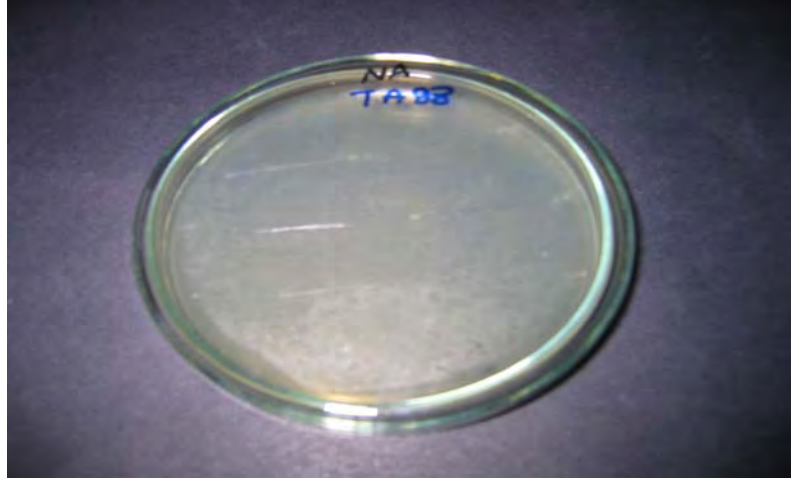


Şekil 3.2.b. TA 100 suşunun histidin gereksinimi kontrolü sonucu HB plaklarında üreme

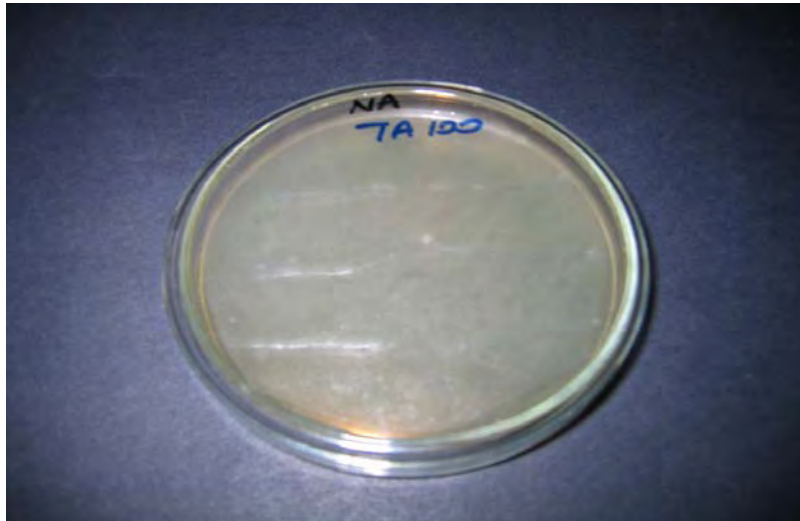
2. Uvr B mutasyonu kontrolü

Bu mutasyon ile bakterilerin ultraviyole (UV) ışınlarının neden olduğu replikasyon hatalarının düzeltilmesi için gerekli olan “DNA onarım mekanizması” engellenmiştir ve bu mutasyonun varlığı UV ışınlarına duyarlılık testiyle kanıtlanmıştır. Bu test için, Nutrient Broth’da bir gece üretilen bakteri kültüründen bir öze dolusu alınıp Nutrient Agar (NA) plaklarına paralel ekim yapılmıştır. Plağın yarısı (çizgileri kesecek şekilde) plastik bir tabaka ile kapatılıp 15 watt gücünde bir UV lambası ile 33 cm yüksekten 8 sn. süre ile ışınlanmıştır. Işınlamadan sonra petri kapakları kapatılıp 37 °C’ de 24 saat inkübe edilmiştir. Kullanılan UV ışığı dozu, uvrB mutasyonu taşıyan bakteriler öldürecek dozdadır.

Bundan dolayı UV'ye maruz kalan kısımda üreme olmaz, plastik kapakla kapatılan kısımda normal üreme gözlenmiştir. Bu sonuç bize kullanılacak olan bakterilerin uvrB mutasyonu taşıdığını gösterir. Şekil 3.3 .a ve b'de TA 98 ve TA 100 suşlarının uvrB mutasyon kontrolü gösterilmektedir (Şekil 3.3.a ve b).



Şekil 3.3.a. TA 98 suşunda uvrB mutasyon kontrolü

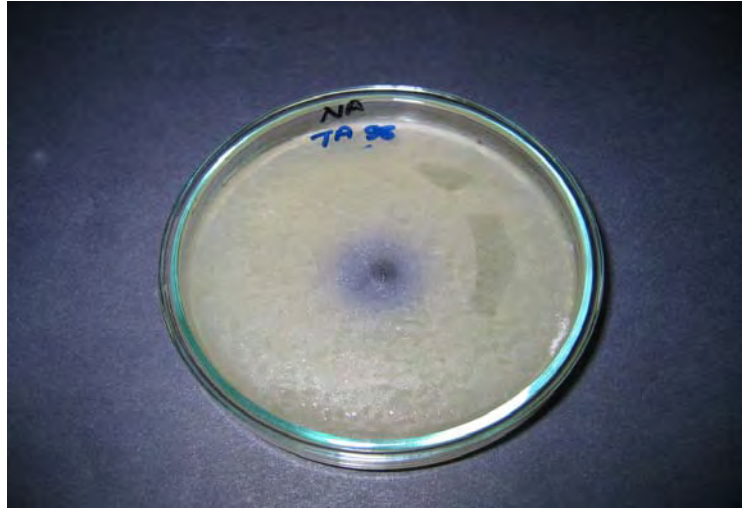


Şekil 3.3.b. TA 100 suşunda uvrB mutasyon kontrolü

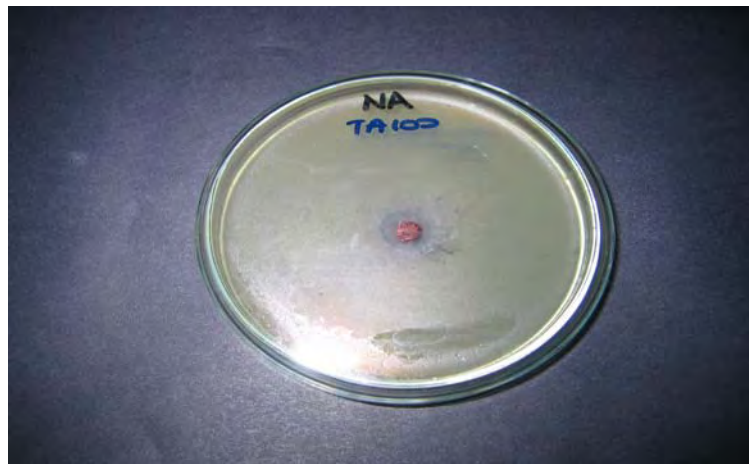
3. Rfa mutasyon kontrolü

Rfa mutasyonu bakterileri hücre zarının lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuştur ve hücre zarının geçirgenliği arttırılmıştır. Varlığı kristal viyole duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için bakteri kültürü Nutrient Broth'da

bir gece büyütülen 0,1 ml sıvı kültür, 45 °C' lik su banyosunda ısıtılmış 2 ml top agar üzerine ilave edilip, Nutrient agar plaklarına dökülerek 8 işareti yaptırılmıştır. Donduktan sonra, plağın ortasına 0,5 cm çaplı steril filtre kağıdı disk yerleştirilip diskin ortasına % 0,1'lik kristal viyole karışımından 10 ml damlatılmıştır. Kağıt boyayı emdikten sonra plaklar 37 °C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda diskin çevresinde 2,4 cm'lik üreme olmayan zon gözlenmiştir. Boya maddesi bakterilerin içine kolayca girip etkilediği için bakterilerin üremeleri engellenmiş ve bakterilerin Rfa mutasyonu taşıdıkları görülmüştür. Şekil 3.4.a ve b'de TA 98 ve TA 100 suşlarının Rfa mutasyon kontrolü sonucunda bakterilerin gösterdikleri davranışlar görülmektedir (Şekil 3.4.a ve b.)



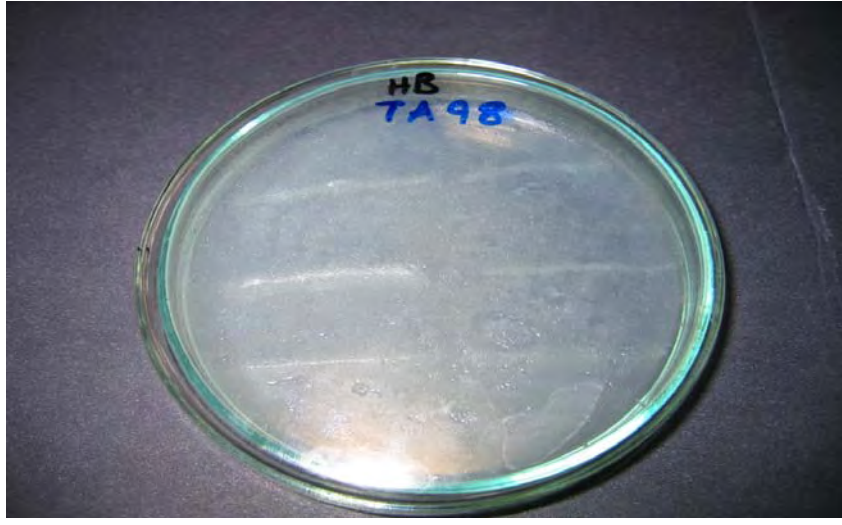
Şekil 3.4.a. TA 98 suşunda Rfa mutasyon kontrolü



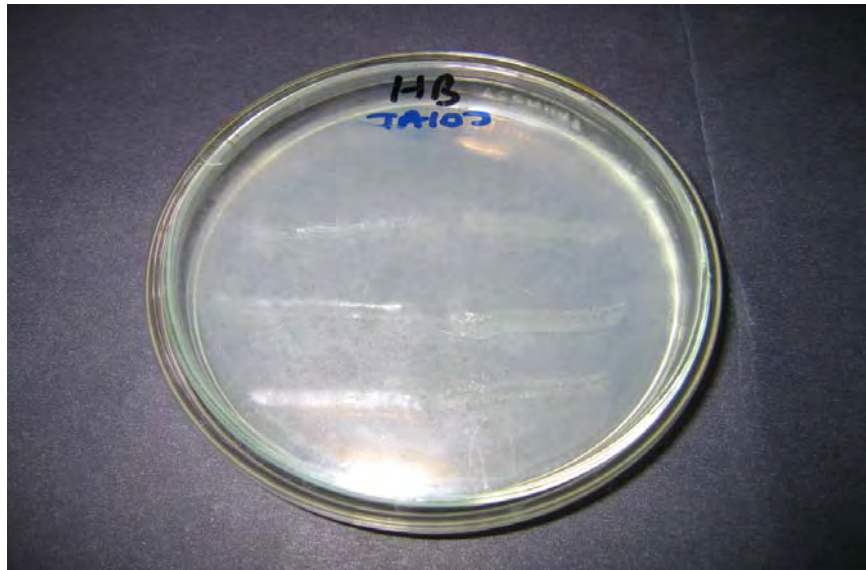
Şekil 3.4.b. TA 100 suşunda Rfa mutasyon kontrolü

4. R faktör varlığının kontrolü

Test bakterilerinin içerdiği R faktör taşıyan pKM101 plazmidlerinin varlığı ampisiline dirençlik testiyle belirlenir. Bu amaç doğrultusunda büyütülen NB içinde bakteri kültürü (% 0,8 ampisilin/0,02 M NaOH), ampisilin içeren HB plaklarına çizgi ekim yapılarak, 37 °C' de 24 saat inkübasyon sonunda plazmid içeren mutant bakterilerin ampisilinli ortamda büyüdüğü gözlenmiştir. Yani bakteriler R faktör plazmidini içermektedir. Şekil 3.5.a ve b. Test bakterilerinin R faktör taşıyan pKM101 plazmidini taşıyıp taşımadığı gösterilmiştir (Şekil 3.5.a. ve b.).



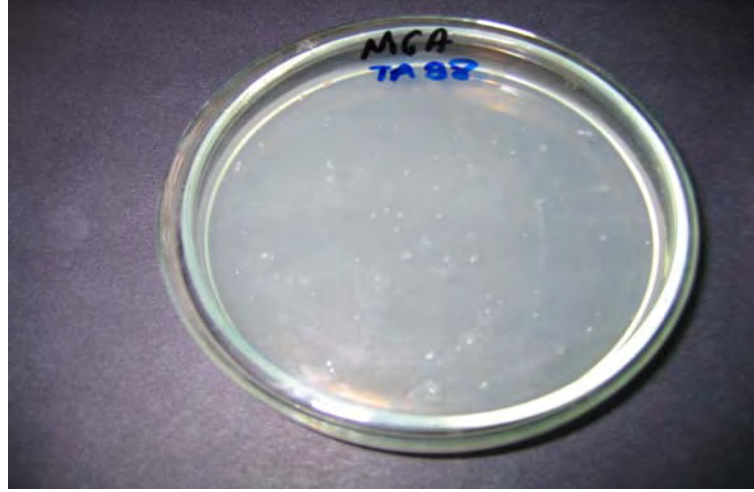
Şekil 3.5.a. TA 98 suşunda R faktör varlığının kontrolü



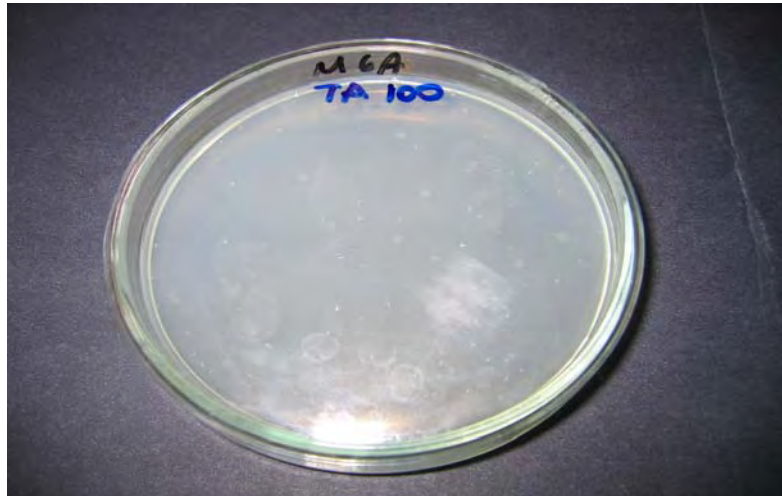
Şekil 3.5.b. TA 100 suşunda R faktör varlığının kontrolü

5. Spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü

Mutant bakteri suşları spontan his^- durumundan his^+ durumuna dönüşmesi belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar TA 98 için 30-50 revertant/ plak, TA 100 için 120-200 revertant/plaktır [44]. Bunu test etmek için normal gecelik kültürden 0,1 ml alınıp 45 °C' deki su banyosunda ısıtılan 2 ml top agar üzerine ilave edilir. Daha sonra 0,2 ml 0,5m Histidin/Biyotin solüsyonu da eklenip test tüpü yavaşça çalkalanarak MGA plaklarına yayılmış ve 37 °C' de 48 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır. Normal sınırlarda revertant sayı gösteren kültürler deneyde kullanılmıştır. Şekil 3.6.a. ve b'de TA 98 ve TA 100 suşlarının normal sınırlarda spontan olarak geri dönüşen koloniler görülmektedir (Şekil 3.6.a.ve b.).



Şekil 3.6.a. TA 98 suşunda spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü



Şekil 3.6.b. TA 100 suşunda spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü

3.2.4. Sıvı kültürün ml'sindeki bakteri sayısının belirlenmesi

Deneyde kullanılan gecelik kültürün ml'sinde bulunan bakteri sayısını belirlemek için HBA plaklarından bir koloni alınarak NB içinde süspanse edilmiş ve çalkalamalı inkübatörde 37 °C' de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu gecelik kültürün, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} olacak şekilde bir dizi seyreltmeleri hazırlanmıştır. Bu seyreltmelerden NA plaklarına 10 ml'lik miktarda damlatarak ekim yapıp 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra plaklardaki koloniler sayılmış ve bakteri sıvı kültürünün ml'sinde $2,4 \times 10^9$ bakteri olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bakteri kültürünün optik dansitesi 650 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülüp saf kültürün (10^0) optik dansitesi 0,165 olarak belirlenmiştir.

3.2.5. Test maddelerinin sitotoksik etkilerinin saptanması

Test bileşiklerinin standart test suşları için öldürücü olmayan dozlarının saptanabilmesi için bu deney yapılmıştır.

Mutajenite deneyine geçmeden önce deneyin sağlıklı olarak değerlendirilmesi için sitotoksik etkinin saptanması gerekir. Kültürün 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} seyreltmeleri serum fizyolojik kullanılarak hazırlanır. Sitotoksik etkiyi belirlemek için daima 10^{-6} seyreltmedeki bakteri suşları kullanılır. Daha sonra maddeyi seyreltme işlemi yapılır. 8 madde için 5'er doz 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} hazırlanır. Her madde için 0,03 gr tartılır. Daha sonra 3 ml DMSO konur ve 10^0 olan tüpten başlayarak 300 m/t karışım birinden diğerine aktarılır ve en son olarak 10^{-5} yani 5.doz sitotoksik etkinin saptanmasında kullanılır.

Madde ve bakteri seyreltmesi bittikten sonra deneye geçilir. Buna göre, top agara 0,1 ml 12-16 saatlik bakteri kültürü ve 0,1 ml değişik konsantrasyonlarda test bileşiği eklenip karıştırılarak nutrient agar plaklarına dökülür. Plaklar 37 °C' de 24 saat inkübe edilir. İnkübasyondan sonra plaklardaki koloni sayıları, kontrol plakları ile karşılaştırılarak toksik olmayan dozlar saptanır. Buna göre test bileşiği 0,01, 0,1, 1, 10, 100 mg/plate seyreltmeleri kullanıldı.

Bir dozun sitotoksik olduğunun anlaşılması LD₅₀ dozun altında olmasıyla anlaşılır. Kontrol plağındaki koloni sayısının yarısının altında olmamalıdır.

3.2.6. Memeli karaciğer mikrozoamlarının hazırlanması

Test maddelerinin metabolik ürünlerinin mutajen olup olmadığını, bilmek için kullanılması gereken karaciğer mikrozoam ekstresi erkek sıçanlardan hazırlanmıştır. Mikrozoomal enzimlerin miktarını arttırmak için erkek sıçanlara 80 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal olarak 3- methylcholontrene enjekte edilerek, 5 gün süre ile mikrozoomal enzim artışı uyarılmıştır.

Bu sürenin sonunda boynu kırılarak (servikal dislokasyon) öldürülen sıçanlar diseksiyon masasında açıldıktan sonra karaciğer zedelenmeden çıkarılmış ve net ağırlığı bulunmuştur. Mikrozoam izolasyonuna başlamadan önce kullanılan tüm malzemeler steril edilmiş ve 0-2 °C’ de saklanmıştır. 1 gr karaciğer 0,15 M KCl ile yıkandıktan sonra 1 gr karaciğere 3 ml olacak şekilde soğuk 0,15 M KCl eklenmiştir. Karaciğer steril pens ve makas yardımıyla parçalara ayrılarak “junge kunkel ultra furrax” marka homojenizatör ile 24000 rpm’de 20 saniye homojenize edilmiştir. Daha sonra 9000 xg’de 4°C’de 30 dak. santrifüj edildikten sonra, süpernatant kısım soğuk steril ependorf tüplere aktarılmıştır. Olası bir kontaminasyonu önlemek amacı ile homojenat 0,45 mm por gözenekli selüloz filtreler ile sterilize edilir. Sterilite kontrolü için mikrozoomal fraksiyondan 0,1 ml alıp NA ve HBA plaklarına yayma ekim yapılmış ve plaklar 37 °C’ de 24 saat inkübe edilerek kontrol edilmiştir. Üreme olmayan ekstreler S9 deneylerde kullanılmak için -20 °C’ de saklanmıştır.

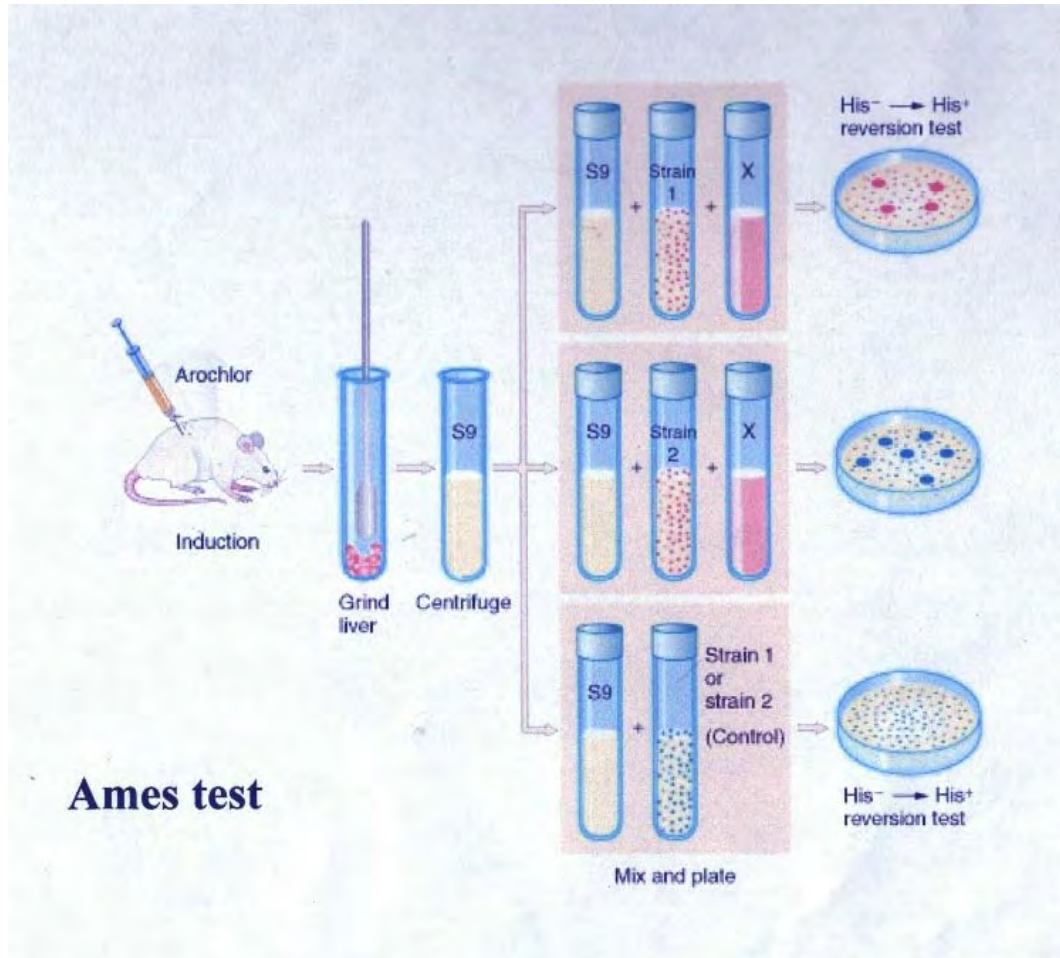
3.2.6.1. S9 karışımının hazırlanması

S9 fraksiyonunda bulunan mikrozoomal enzimlerin metabolik aktivasyon reaksiyonlarını yürütebilmeleri için gerekli kofaktörler S9 karışımına eklendi. Bu Salmonella/ Mikrozoam test sistemi için standart S9 karışımı bileşenleri; 8 mM MgCl₂, 33 mM KCl, 5 mM Glukoz-6-fosfat, 4 mM β-NAD, 100 mM Na⁻-fosfat (pH:7,4) ve bu karışımın her ml’si için 0,04 ml derişimindeki S9 fraksiyonudur.

Karışım her mutajenite deneyi için taze hazırlanmakta ve deney süresinde buz içinde saklanmaktadır.

3.2.7. Ames testinin yapılışı

Ames/Salmonella/mikrozom testinin amacı; deneğimiz kimyasal maddelerin daha önce histidin aminoasitine gerek duyan mutant hale gelmiş oksotrof suşları histidin yapabilen prototrof suş haline döndürme gücünü ölçmek için yapılmaktadır. Bunun için deneylerde “plak inkorporasyon” yöntemi kullanıldı. Deneyler S9’lu ve S9’suz olmak üzere iki grup halinde yapıldı. Şekil 3.7’de ames testinin yapılışı şematize edilmiştir (Şekil 3.7.) [44].



Şekil 3.7. Ames testi

3.2.7.1. S9'suz (-) deney

İlk önce hazırladığımız tüplere 2'şer ml'lik top agar eklenir ve top agarın donmasını engellemek için su banyosunu 45°C ayarlanır. Top agar dökülen tüpler 45°C su banyosuna yerleştirilir. Daha sonra bu top agarlı tüplere 0,2 ml histidin biyotin solüsyonu eklenir (yapay mutasyon ile histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş yani His⁻ = oksorofturlar. Ortalama çok az histidin biyotin eklenmemizin nedeni bakterilerin belirli bir düzeye ulaşmasını birkaç bölünme geçirmelerini sağlamaktır). Daha sonra bu tüplerin içlerine 0,1 ml test maddesi ve 0,1 ml 12-16 saatlik bakteri kültürü eklenmiştir (Bu deney TA 98 ve TA 100 için ayrı ayrı yapılmıştır. 8 kimyasal maddenin 4-Nitro benzinidenilin, 4-Kloro benzinidenilin, 4-Metil benzinidenilin, 4-Metoksi benzinidenilin, 4-Bromo benzinidenilin, 4-Hidroksi benzinidenilin, 2-Metoksi benzinidenilin, 3-Nitro benzinidenilin. 0,01, 0,1, 1, 10, 100 dozlarda 3'er plak halinde deney yapılmıştır. Tüpler çalkalanarak 37 °C' ye ısıtılmış MGA (Minimal glikoz agar) plaklarına dökülmüş ve plaklar hızla 8 işareti yapılarak top agarın plak üzerinde homojen dağılması sağlanmıştır. 15 dakika donması beklendikten sonra plaklar ters çevrilip 37 °C'lik etüvde 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra koloniler sayılmıştır. Sonuçların değerlendirilebilmesi için, test maddeleriyle yapılan deneylere paralel olarak, spontan kontrol, çözücü kontrol (DMSO) ve pozitif kontrol deneyleri de yapılmıştır. Pozitif kontrol maddesi olarak TA 100 suşu için 1 mg/100 ml (NaN₃) sodyum azid TA 98 suşu için 200 mg/100 ml 4-nitro-o-fenilendiamin kullanılmıştır.

Spontan kontrolde, top agar 2 ml tüplere + histidin/biyotin 0,2 ml + bakteri TA 98 ve TA 100 için 0,1 ml konulup karıştırılarak MGA'lı petrilere dökülüp 8 hareketi yapılır. 37 °C' lik 48-72 saatlik etüve konur.

DMSO kontrolde, top agar 2 ml tüplere + histidin/biyotin 0,2 ml + bakteri TA 98 ve TA 100 için 0,1 ml + 0,1 DMSO konulup karıştırılarak MGA'lı petrilere dökülüp 8 hareketi yapılır. 37 °C' lik 48-72 saatlik etüve konur.

Pozitif kontrolde, top agar 2 ml tüplere+ histidin/biyotin 0,2 ml + bakteri TA 98 0,1 ml 4-nitro-o-fenildiamin, TA 100 için 0,1 ml sodyum azid konulup

karışım karıştırılıp MGA'lı petrilere dökülüp 8 hareketi yapılır. Donması için bekletildikten sonra. 37 °C' lik 48-72 saatlik etüve konur.

3.2.7.2. S9'lu (+) deney

Araştırılan kimyasal maddelerin metabolize olduktan sonra etkilerini araştırmak için memeli karaciğer mikrozomları hazırlandı. Deneyler S9'lu olarak tekrarlandı.

Bu amaçla yine 12-16 saatlik bakteri kültürü ve deneyden hemen önce de taze olarak S9 karışımı hazırlandı. 2 ml top agar, histidin-biyotin çözeltisi, bakteri kültürü ve test edilen maddeler S9'suz deneydeki ölçülerde koyulduktan sonra, 0,5 ml de buzda bekletilen S9 karışımına ilave edilip karıştırılarak MGA petrilere döküldü. Homojen bir şekilde yayıldı. Soğuduktan sonra 37 °C'lik etüvde 48-72 saat inkübasyona bırakıldı. Spontan ve dimetil sülfoksitli kontrollerde aynı şekilde, 0,5 ml S9 karışımı ilave edilerek yapıldı. S9'lu olarak yapılan deneylere ilaveten pozitif mutajen olarak TA 98 ve TA 100 için S9'suz deneyden farklı olarak 2-amino- fluoren kullanıldı. Daha sonra sonuçların değerlendirilmesi yapıldı.

3.2.8. Sonuçların değerlendirilmesi

Bu çalışmada benzilidenaniline maddesinin 8 farklı türevi *Salmonella typhimuriumun* TA 98 ve TA 100 suşları kullanılarak mutajenite testine tabi tutulmuştur. Her doz 3 paralel plak ile aynı anda test edilmiştir ve farklı zamanlarda iki bağımsız deney yapılmıştır. Ayrıca, test bileşenlerinin etkilerinin memeli metabolik aktivasyonları sonucunda değişip değişmediğini belirlemek amacıyla S9 fraksiyonu varlığında da deney aynen tekrarlanmıştır. Sonuçlar, standart hataları ile birlikte ortalamaları alınarak istatistiksel açıdan student-t testi ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi İstatistik Bölümünden alınan "SPSS-WINDOWS" paket programı kullanılmıştır.

Mutajenite testi sonucunda sayılan koloniler spontan kontrollerde çıkanların en az iki katı olursa örnek mutajendir denilebilir veya çıkan sonuçlarda

doza bağlı bir artış gözlenmelidir. Doza bağlı artış gözlendiği halde koloni sayısı spontanların iki katından az çıkmışsa örnek zayıf mutajen olarak değerlendirilir.

4. BULGULAR

4.1. Benzinidenilin Türevlerinin Mutajenik Aktivitesinin Ames Testi ile Ölçülmesi

Materyal ve metot bölümünde açıklandığı gibi, benzinidenilinin 8 türevinin mutajenik aktivitesi, söz konusu test maddelerinin 5 ayrı dozu ile test edildi. Her doz için 3 ayrı plağa ekim yapıldığından değerler bunların ortalaması olarak verildi. Deney sonuçları TA 98 için metabolik aktivasyon yokluğunda elde edilen sonuçları çizelge 4.1 gösterilmiştir (çizelge 4.1). TA 98 için metabolik aktivasyon varlığında elde edilen sonuçları ise çizelge 4.3.' de gösterilmiştir (çizelge 4.3). Deney sonuçları TA 100 için metabolik aktivasyon yokluğunda elde edilen sonuçları çizelge 4.2 gösterilmiştir (çizelge 4.2). TA 100 için metabolik aktivasyon varlığında elde edilen sonuçları çizelge 4.4.'de verilmiştir (çizelge 4.4).

Çizelgelerde test maddelerinin farklı dozlarında tespit edilen revertant koloni sayıları yer almaktadır.

Ayrıca çizelgenin altında pozitif mutajen olarak kullanılan sodyum azid (1,5 µg/plak), 4-nitro-o-fenilendiamin (20µg/plak) ve 2-amino-fluoren (10µg/plak) ile verilen cevaplar da çizelgenin altında belirtilmiştir.

Test bakterilerimizin (*S.typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 suşları) kimyasal test maddelerimizle verdiği doz cevap eğrileri, TA 98 ve TA 100 için metabolik aktivasyon yokluğunda elde edilen sonuçları şekil 4.1 gösterilmiştir (Şekil 4.1.). TA 98 ve TA 100 metabolik aktivasyon varlığında, kimyasal test maddelerimizle verdiği doz cevap eğrileri şekil 4.2.'de gösterilmiştir (Şekil 4.2.).

Çizelge 4.1. TA 98 suşunun metabolik aktivasyon yokluğunda elde edilen sonuçları

TA 98 / S9 (-)

DOZ	REV/PL	P
4-Nitro benzinidenilin		
100	34 ± 3.6	0.04*
10	28 ± 3.7	0.19
1	26 ± 2.5	0.35
0.1	28 ± 3.5	0.18
0.01	21 ± 1.5	1.00
4-Metil benzinidenilin		
100	17 ± 3.3	0.38
10	28 ± 12.5	0.44
1	21 ± 8.5	0.92
0.1	30 ± 9.4	0.25
0.01	26 ± 4.9	0.42
4-Bromo benzinidenilin		
100	18 ± 4.5	0.48
10	15 ± 1.0	0.18
1	20 ± 7.0	0.78
0.1	40 ± 2.5	0.01*
0.01	37 ± 3.0	0.02*
4-Hidroksi benzinidenilin		
100	37 ± 1.7	0.01*
10	37 ± 4.5	0.03*
1	23 ± 3.0	0.71
0.1	19 ± 3.0	0.61
0.01	17 ± 6.0	0.40
4-Kloro benzinidenilin		
100	27 ± 3.7	0.50
10	22 ± 2.6	0.88
1	21 ± 0.5	0.87
0.1	21 ± 1.5	0.87
0.01	19 ± 0.5	0.53

TA 98 / S9 (-)

4-Metoksi benzinidenilin

100	22 ± 1.1	0.81
10	18 ± 2.0	0.42
1	18 ± 7.5	0.60
0.1	19 ± 2.6	0.60
0.01	18 ± 0.5	0.48

2-Metoksi benzinidenilin

100	23 ± 2.0	0.76
10	25 ± 3.0	0.48
1	22 ± 1.5	0.93
0.1	19 ± 4.5	0.64
0.01	17 ± 2.6	0.36

3-Nitro benzinidenilin

100	23 ± 3.6	0.72
10	20 ± 3.2	0.82
1	23 ± 13.0	0.94
0.1	23 ± 5.1	0.80
0.01	21 ± 0.5	0.87

Sonuçlar üç tabakanın ortalamasıdır. Çözücü kontrol değerleri çıkarılmıştır. Her bir konsantre sonuç çözücü kontrolü ile student t testi yoluyla karşılaştırılmıştır.

*P ≤ 0.05

Negatif kontrol: DMSO(petride 100 ml) 21.3 ± 6.8

Pozitif kontrol : TA 98: NPD (20µg/petri) 1516 ± 114.4

Çizelge 4.2. TA 100 suşunun metabolik aktivasyon yokluğunda elde edilen sonuçları

TA 100 / S9 (-)

DOZ REV/PL P

4-Nitro benzinidenilin

100	126 ± 12.0	0.40
10	166 ± 18.5	0.01*
1	165 ± 14.0	0.00*
0.1	131 ± 7.5	0.13
0.01	111 ± 15.1	0.55

4-Metil benzinidenilin

100	159 ± 39.6	0.15
10	139 ± 7.6	0.03*
1	155 ± 3.6	0.00*
0.1	160 ± 7.2	0.00*
0.01	95 ± 12.4	0.16

4-Bromo benzinidenilin

100	141 ± 14.6	0.07
10	132 ± 4.1	0.07
1	119 ± 13.5	0.87
0.1	104 ± 26.6	0.10
0.01	107 ± 17.0	0.39

4-Hidroksi benzinidenilin

100	107 ± 2.5	0.14
10	93 ± 3.2	0.01
1	110 ± 7.0	0.30
0.1	97 ± 3.0	0.61
0.01	117 ± 0.9	0.96

4-Kloro benzinidenilin

100	95 ± 3.7	0.03*
10	173 ± 11.7	0.00*
1	180 ± 3.5	0.00*
0.1	165 ± 10.3	0.00*
0.01	109 ± 17	0.51

TA 100 / S9 (-)

4-Metoksi benzinidenilin

100	164 ± 1.5	0.00*
10	156 ± 29.7	0.10
1	171 ± 2.0	0.00*
0.1	176 ± 8.3	0.00*
0.01	155 ± 4.0	0.00*

2-Metoksi benzinidenilin

100	140 ± 12.6	0.75
10	162 ± 15.0	0.00*
1	153 ± 14.4	0.02*
0.1	182 ± 7.6	0.00*
0.01	161 ± 16.0	0.01*

3-Nitro benzinidenilin

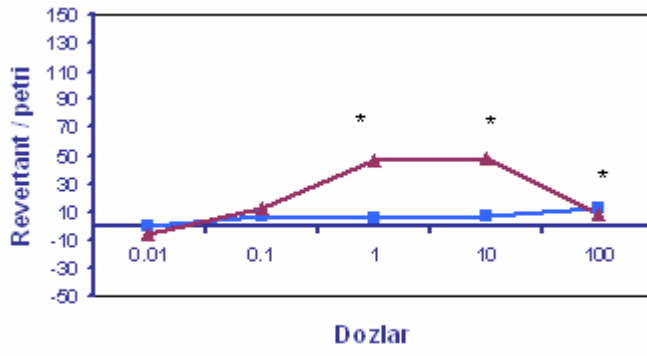
100	149 ± 8.1	0.01*
10	152 ± 28.0	0.11
1	172 ± 15.0	0.00*
0.1	169 ± 14.5	0.00*
0.01	163 ± 3.5	0.00*

Sonuçlar üç tabakanın ortalamasıdır. Çözücü kontrol değerleri çıkarılmıştır. Her bir konsantre sonuç çözücü kontrolü ile student t testi yoluyla karşılaştırılmıştır.

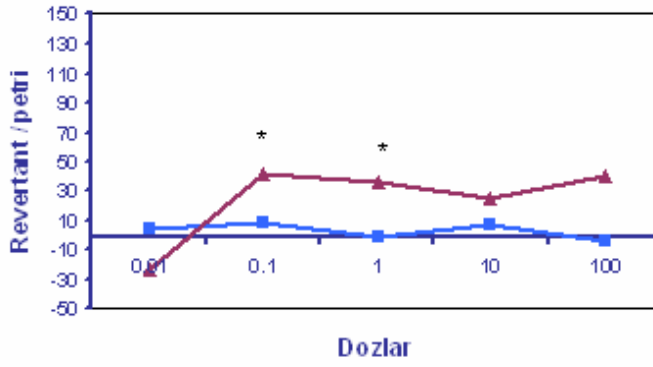
*P ≤ 0.05

Negatif kontrol: DMSO(petride 100 ml) 117.6 ± 9.6

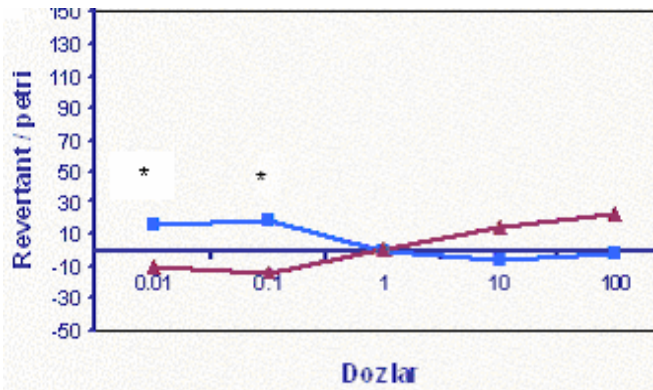
Pozitif kontrol : TA 100: SAZ (1,5 µg/petri) 714 ± 82.3



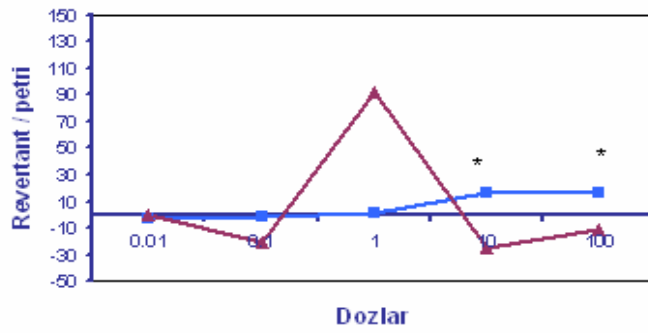
4-Nitro benzinidenilin



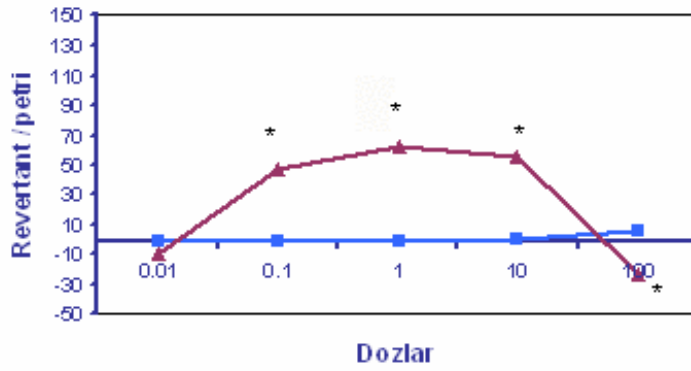
4-Metil benzinidenilin



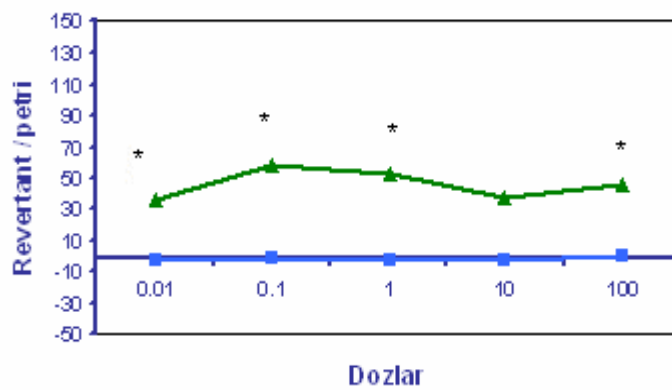
4-Bromobenzinidenilin



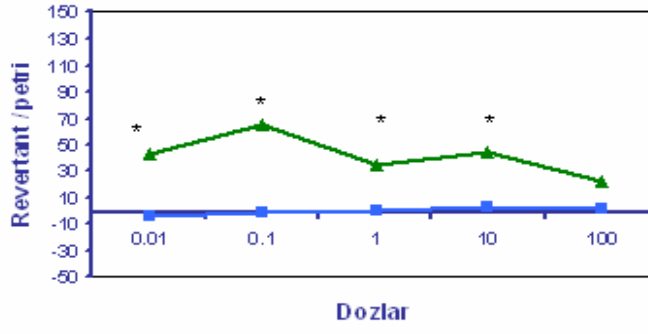
4-Hidroksi benzinidenilin



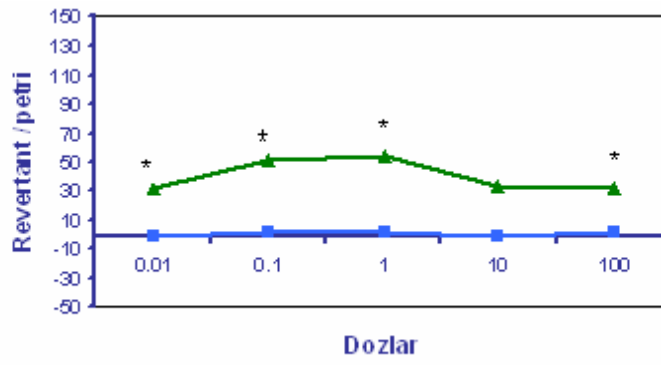
4-Kloro benzinidenilin



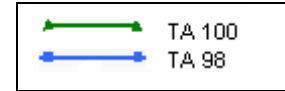
4-Metoksi benzinidenilin



2-Metoksi benzinidenilin



3-Nitro benzinidenilin



Şekil 4.1. TA 98 ve TA 100 suşlarının metabolik aktivasyon yokluğunda elde edilen sonuçları

Çizelge 4.3. TA 98 suşunun metabolik aktivasyon varlığında elde edilen sonuçları

TA 98 / S9 (+)

DOZ	REV/PL	P
4-Nitro benzinidenilin		
100	40 ± 1.0	0.00*
10	22 ± 10.7	0.92
1	25 ± 2.0	0.60
0.1	20 ± 1.0	0.13
0.01	21 ± 3.2	0.39
4-Metil benzinidenilin		
100	26 ± 5.2	0.36
10	27 ± 2.5	0.25
1	23 ± 1.5	0.58
0.1	30 ± 2.0	0.06
0.01	22 ± 2.0	0.38
4-Bromo benzinidenilin		
100	28 ± 5.2	0.34
10	20 ± 8.0	0.51
1	33 ± 3.6	0.03*
0.1	20 ± 8.0	0.44
0.01	19 ± 2.6	0.12
4-Hidroksi benzinidenilin		
100	27 ± 2.5	0.25
10	22 ± 5.5	0.62
1	19 ± 1.0	0.08
0.1	22 ± 4.0	0.49
0.01	29 ± 2.6	0.12
4-Kloro benzinidenilin		
100	29 ± 1.7	0.09
10	22 ± 1.5	0.50
1	25 ± 3.0	0.73
0.1	22 ± 4.0	0.49
0.01	20 ± 1.5	0.18

TA 98 / S9 (+)

4-Metoksi benzinidenilin

100	38 ± 1.5	0.04*
10	33 ± 4.1	0.04*
1	31 ± 8.3	0.23
0.1	35 ± 3.0	0.00*
0.01	32 ± 2.0	0.03*

2-Metoksi benzinidenilin

100	35 ± 2.0	0.01*
10	34 ± 3.6	0.02*
1	23 ± 3.0	0.03*
0.1	32 ± 2.0	0.02*
0.01	30 ± 6.0	0.19

3-Nitro benzinidenilin

100	44 ± 3.4	0.00*
10	41 ± 2.0	0.00*
1	37 ± 6.5	0.04*
0.1	34 ± 2.5	0.01*
0.01	32 ± 1.7	0.04*

Sonuçlar üç tabakanın ortalamasıdır. Student t testi yoluyla karşılaştırılmıştır.

* $P \leq 0.05$

Negatif kontrol: DMSO(petride 100 ml) 24 ± 3.6

Pozitif kontrol : TA 98: 2 AF (10µg/petri) 912 ± 31.5

Çizelge 4.4. TA 100 suşunun metabolik aktivasyon varlığında elde edilen sonuçları

TA 100 / S9 (+)

DOZ	REV/PL	P
4-Nitro benzinidenilin		
100	133 ± 4,5	0.00
10	96± 6.4	0.70
1	98 ± 4.0	0.34
0.1	102 ± 9.0	0.23
0.01	90 ± 6.5	0.50
4-Metil benzinidenilin		
100	104± 7.2	0.13
10	101 ±3.0	0.13
1	97 ± 8.1	0.62
0.1	80 ± 7.0	0.06
0.01	89 ± 3.5	0.32
4-Bromo benzinidenilin		
100	74 ± 9.7	0.03
10	74 ± 6.1	0.01
1	94 ± 14.9	0.90
0.1	72 ± 18.8	0.12
0.01	86 ± 7.7	0.25
4-Hidroksi benzinidenilin		
100	92 ± 4.0	0.6
10	87 ± 10.7	0.37
1	91 ± 12.0	0.71
0.1	76 ± 8.5	0.04
0.01	84 ± 10.3	0.23
4-Kloro benzinidenilin		
100	109 ±8.6	0.05
10	82 ± 5.0	0.05
1	100 ± 4.0	0.19
0.1	88 ± 16.0	0.05
0.01	88± 19.4	0.65

TA 100 / S9 (+)

4-Metoksi benzinidenilin

100	125 ± 7.3	0.00*
10	144 ± 18.0	0.01*
1	123 ± 19.5	0.06
0.1	108 ± 8.8	0.07
0.01	108 ± 11.2	0.11

2-Metoksi benzinidenilin

100	128 ± 19.6	0.45
10	111 ± 6.1	0.02*
1	94 ± 11.0	1.00
0.1	81 ± 25.8	0.45
0.01	100 ± 13.0	0.48

3-Nitro benzinidenilin

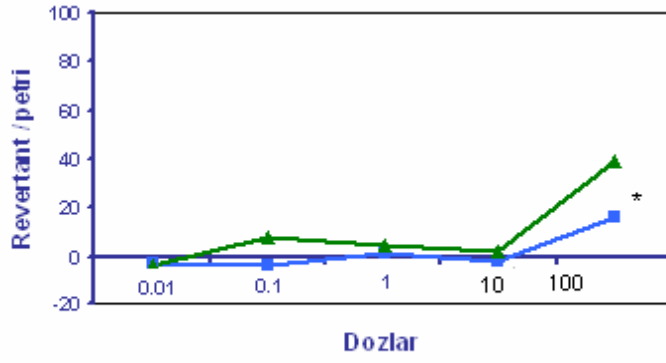
100	76 ± 8.3	0.04*
10	146 ± 11.9	0.00*
1	123 ± 25.9	0.12
0.1	100 ± 13.0	0.48
0.01	100 ± 14.5	0.52

Sonuçlar üç tabakanın ortalamasıdır. Student t testi yoluyla karşılaştırılmıştır.

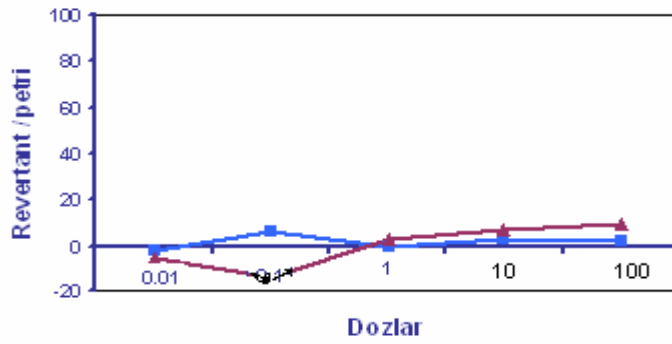
* $P \leq 0.05$

Negatif kontrol: DMSO(petride 100 ml) 94 ± 5.6

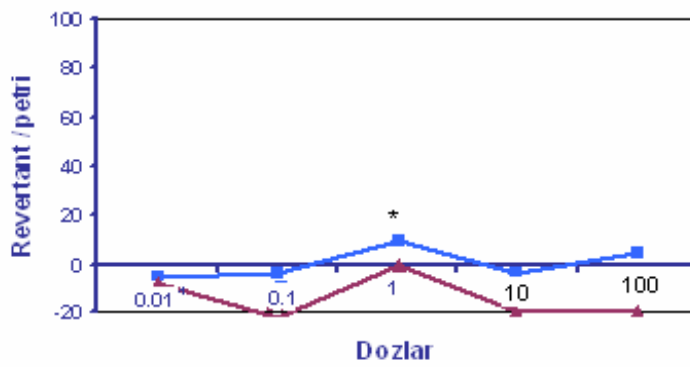
Pozitif kontrol : TA 100: 2 AF (10µg/petri) 845 ± 41.6



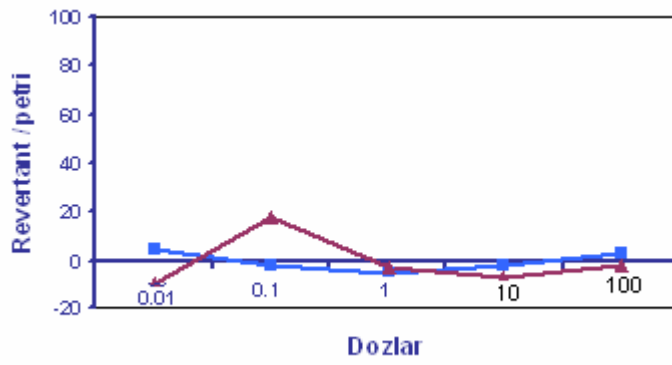
4-Nitro benzinidenilin



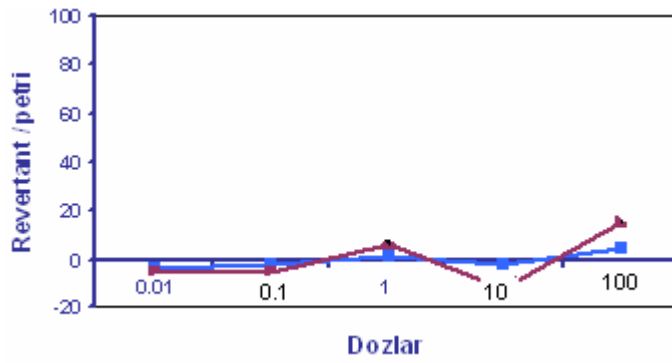
4-Metil benzinidenilin



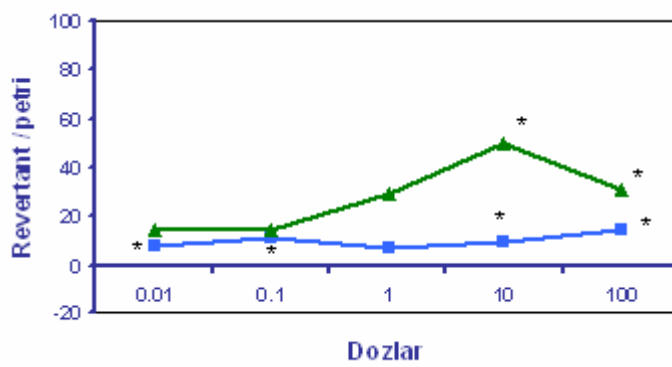
4-Bromo benzinidenilin



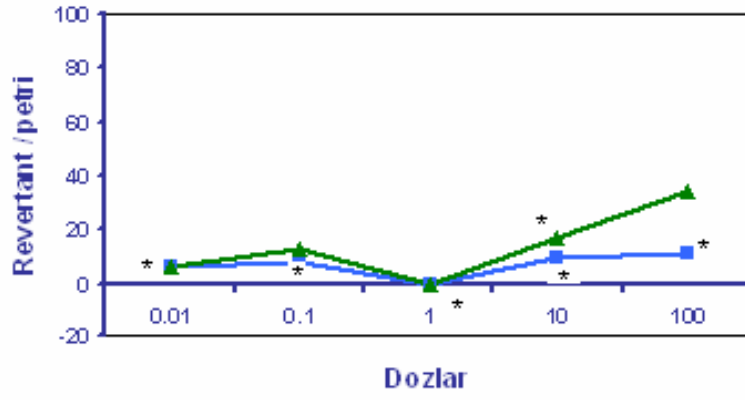
4-Hidroksi benzinidenilin



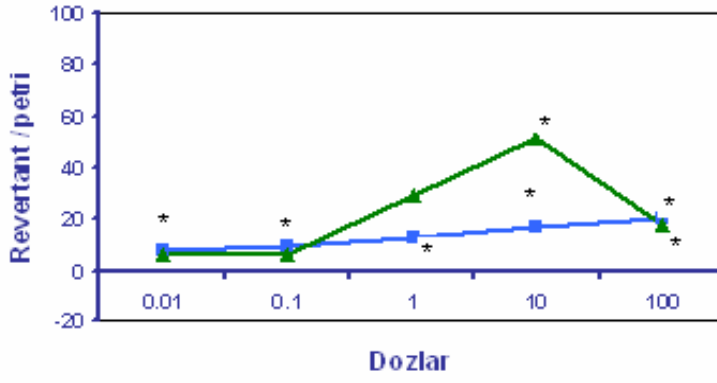
4-Kloro benzinidenilin



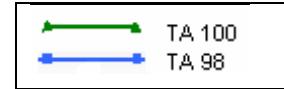
4-Metoksi benzinidenilin



2-Metoksi benzinidenilin



3-Nitro benzinidenilin



Şekil 4.2. TA 98 ve TA 100 suşlarının metabolik aktivasyon varlığında elde edilen sonuçları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günlük yaşamda, sık sık yüz yüze kalınan doğal ya da yapay kimyasal maddelerin bir kısmının mutajenik ve karsinojenik olabileceği uzun yıllardan beri tartışılmaktadır [86]. Son 20-30 yıllık süre içinde, insanların kullanımına sunulan yapay kimyasalların sayısı yaklaşık, 70.000'e ulaşmış olup, bu sayıya her yıl yaklaşık 70-3.000 yeni kimyasal madde eklenmektedir [87].

Son zamanlarda, kimyasal maddelerin mutajenik aktivite açısından araştırılması önem kazanmıştır [88].

Mutasyonlara yol açma yeteneği olan maddelerin teşhis edilmesi güvenilir değerlendirme için önemli bir prosedür haline gelmiştir. Mutasyonlara yol açabilen kimyasallar potansiyel olarak kanser gelişimine neden olabilirler ve pek çok klinik hastalıklara da yol açabilirler.

Bu çalışmada, bir grup benzinidenilin türevleri anilin ile, benzaldehitin etanol ile yer değiştirmesi sonucu reaksiyona sokularak sentezlenmiştir. Bu bileşimler, IR ¹H-NMR ve ilk analiz yoluyla açıklanmıştır.

Benzinidenilin türevleri hala şifa veren etkileri için araştırmakta olan ürünlerdir ve ilaç imalatında kullanılmaları düşünülmektedir, ancak mutajenik aktiviteleri hakkında bir gözlem yapılmamıştır.

Bu amaçla bu bileşiklerin mutajenik aktiviteleri Ames/Salmonella/Mikrozom testi yoluyla araştırılmıştır.

Bu test kimyasal olarak indüklenabilen mutasyonları belirlemek amacıyla Dr. Bruce Ames ve ark. (1975), tarafından özel olarak dizayn edilmiştir. Dünya çapındaki pek çok laboratuvarında yeni kimyasalların mutajenik potansiyellerini araştırmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır.

Deneyde *Salmonella typhimurium* bakterisinin LT-2 atasal suşundan in vitro mutasyonlar sonucu üretilen TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. Bu mutantlar his⁻ bakteriler olup, his operonunun değişik bölgelerinde farklı birer mutasyon içerirler. Salmonella/mikrozom testi ile kimyasal maddelerin bu test suşlarını his⁺ revertantlar haline dönüştürme özellikleri belirlenmektedir. TA 98 suşu çerçeve kayması mutasyonlarına (frameshift), TA 100 suşu ise baz-çifti değişimi mutasyonlarına (base-pair) karşı duyarlıdır. Çalışmalarımızda standart

plak inkorporasyon yöntemi uygulanmıştır [4]. Test kimyasallarının farklı konsantrasyonları (100, 10, 1, 0,1, 0,01 µg/petri) stok solüsyonları DMSO içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Bileşiklerin standart test suşları için toksik olmayan dozları Dean ve ark. (1982)'a göre belirlenmiş ve sitotoksik olmayan beş ayrı doz ile çalışılmıştır.

Çalışmada kullanılan *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşlarının stoklarının hazırlanışı, genetik işaretlerinin kontrolü ve plak inkorporasyon yönteminin uygulanışı Maron ve Ames (1983)'e göre yapılmıştır.

Deneyler iki aşamalı olarak; S9 karaciğer enzimi olmadan ve S9 karaciğer enzimi varlığında yapılmıştır.

S9 fraksiyonu, 3-metilkolantren ile indüklenmiş Sprague – Dawley ırkı erkek ratların (180-200gr) karaciğerinden elde edilmiştir.

Standart plak inkorporasyon yönteminde 45 °C'deki su banyosunda tutulan eritilmiş 2 ml'lik üst agara 0,1 ml test bileşiği ve 0,1 ml bakteri kültürü (1-2x10⁹ bakteri / ml) eklenerek, minimal tuz ve glukoz içeren agar plaklarına dökülmüştür. S9 fraksiyonu varlığında yapılan deneylerde 0,5 ml S9 karışımı ilave edilmiştir. Plaklar 37 °C'de 48-72 saat inkübe edilmiş ve revertant kolonilerin sayımı yapılmıştır. Her deney negatif kontrol (spektrofotometrik derecedeki dimetilsülfoksit) ve pozitif kontrolleri (20 µg/petri NPD TA 98 için ve 1,5 µg/petri SAZ TA 100 için) içerecek şekilde üç paralel olarak uygulanmıştır. Metabolik aktivasyon içeren deneylerde 2AF (10 µg/petri) her iki suş içinde pozitif mutajen olarak kullanılmıştır.

Sonuçlar SPSS istatistiksel programı, student-t testi ile değerlendirilmiştir. Deneylerde elde edilen revertant koloni sayıları ve çözücü kontrol revertant koloni sayısı arasındaki istatistiksel açıdan anlamlı sayılabilecek farklılıklar ve revertant koloni sayılarındaki doza bağlı artış mutajenitenin kanıtı olarak kabul edilmiştir [11].

Yapı- aktivite ilişkileri mutajenler ve zayıf mutajenler olarak ele alınan benzilidenanilin için tartışılmıştır.

Bulgularda yer alan organizmaların doz-tepki eğrileri metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda benzilidenanilin türevleri uyarılmıştır. Sonuçlar üç tabakanın ortalamasıdır. Çözücü kontrol değerleri çıkarılmıştır. Her

bir konsantrenin sonucu çözücü kontrol ile student t-testi yoluyla karşılaştırılmıştır.

Aromatik yapısı olan bileşikler pek çok çalışmada mutajenik olarak rapor edilmiştir [89]. 4 Benzinidenilin türevleri farklı durumlarda farklı yer değişimleriyle *Salmonella typhimurium* nesilleri TA 100 ve TA 98'de mutajenik bulunmuştur. Her ne kadar bu farklı yer değişimler bu bileşiklerin mutajenitesi üzerinde farklı etkilere sahip olsa da, benzilidenanilin aromatik halkaları ile genel yapısı bu bileşimlerin mutajenitesi açısından ele alınmalıdır.

Daha öncede bahsedildiği üzere bu çalışmada benzilidenanilinden sentezlenen 8 ayrı madde çalışılmıştır. Bunlar; 4-Nitro benzinidenilin, 4-Kloro benzinidenilin, 4-Metil benzinidenilin, 4-Metoksi benzinidenilin, 4-Bromo benzinidenilin, 4-Hidroksi benzinidenilin, 2-Metoksi benzinidenilin ve 3- Nitro benzinidenilin'dir. Bunların deneylerde elde edilen sonuçları sırasıyla bakılarak mutajen olup olmadığı ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir.

1. Madde olan 4-Nitro benzinidenilin maddesi S9 varlığında ve yokluğunda 5 ayrı dozda incelenmiştir (100, 10, 1, 0.1, 0.01). Farklı bileşimlerin farklı durumlardaki nitro grupları içeren mutajenik aktivitesi önceki çalışmalarda rapor edilmiştir [90]. Nitrobenzenler ve nitroanilinler ile yaptıkları çalışmada, AB mann ve diğerleri (1997) Ames testini uygulamış ve *Salmonella typhimurium* nesilleri TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. Test ettikleri kimyasalların % 71'ini mutajenik bulmuşlardır.

Pozisyon 4'te bir nitro grubu içeren 4-Nitro benzinidenilin, S9 karışımı kullanılmadığından TA 98 için 100. dozda 0,04 standart sapma $P \leq 0,05$ 'in altında sonuç vermiştir. Yani anlamlı mutajeniktir. Frameshift (çerçeve kayması) mutasyonuna neden olmuştur. TA 100 için ise 10. dozunda 0,01, 1. dozunda ise 0,00 sonuçları elde edilmiştir. Bu sonuçlarda standart sapma ($P \leq 0,05$) değerinin altında olduğu için anlamlıdır yani mutajeniktir. Base-pair mutasyonuna neden olmuştur.

S9 karışımı kullanıldığında (metabolik aktivasyon varlığında) TA 98 için 100. dozunda 0,00 sonucu vermiş standart sapmanın altında sonuç elde edilmiştir.

Sonuç olarak 4-Nitro benzinidenilin için ise S9 karışımı mutajenik aktiviteyi ortadan kaldırmıştır.

8. Madde olan Nitro gruplu olan başka bir bileşik, 3-Nitro benzinidenilin S9 varlığındaki ve yokluğunda 5 ayrı dozda (100, 10, 1, 0.1, 0.01) incelenmiştir. Metabolik aktivasyon yokluğunda S9'suz TA 98 için mutajenik değildir. TA 100 için ise 100. dozda 0.01, 1. dozda 0.00, 0.1. dozda 0.00, 0.01. dozda 0.00 değerleri elde edilmiş ve bu değerlerde $P \leq 0,05$ ' ten küçüktür anlamlıdır yani mutajeniktir. Base-pair mutasyonuna neden olmuştur.

Metabolik aktivasyon varlığında (S9'lu) TA 98 için 100. dozda 0,00, 10. dozda 0,00, 1. dozda 0,04, 0.1. dozda 0,01, 0.01. dozda 0,04 bu değerler $P \leq 0,05$ 'ten küçüktür anlamlıdır yani mutajeniktir. Frameshift (çerçeve kayması) mutasyonuna neden olmuştur. TA 100 için ise 100. dozda 0,04, 10. dozda 0,00 değerleri bulunmuş ve $P \leq 0,05$ ' ten küçüktür, anlamlıdır yani mutajeniktir. Base-pair mutasyonuna neden olur.

4. Madde olan 4-Metoksi benzinidenilin maddesi için S9 varlığında ve yokluğunda 5 ayrı (100, 10, 1, 0.1, 0.01) dozlarda incelenmiştir. Metabolik aktivasyon olmadan 100. dozda 0,00, 1. dozda 0,00, 0.1. dozda 0,00, 0.01. dozda 0,00 standart sapma değerinden ($P \leq 0,05$) küçüktür anlamlı yani mutajeniktir. Base-pair (nükleik asit çiftleri yer değişim) mutasyonuna neden olmuştur.

Metabolik aktivasyon varlığında (S9'lu) TA 98 için 100. dozda 0,04, 10. dozda, 0,04, 0.1 dozda 0,00, 0.01. dozda 0,01 sonuçları elde edilmiş ve standart sapma değerinden ($P \leq 0,05$) küçüktür anlamlıdır yani mutajeniktir. Frameshift (çerçeve kayması) mutasyonuna neden olmuştur. TA 100 için ise 100. dozda 0,00 ve 10. dozda 0,01 sonuçları elde edilmiş ve standart sapma değerinden küçüktür, anlamlıdır yani mutajeniktir. Base-pair mutasyonuna neden olmuştur.

7. Madde olan 2-Metoksi benzinidenilin maddesi için S9 varlığında ve yokluğunda 5 ayrı (100, 10, 1, 0.1, 0.01) dozlarda incelenmiştir. Metabolik aktivasyon yokluğunda (S9'suz) TA 98 için mutajenik değildir. TA 100 için ise 10. dozda 0,00, 1. dozda, 0,02, 0.1. dozda 0,00, 0.01. dozda 0,01 değerleri bulunmuş bunlarda $P \leq 0,05$ küçüktür, anlamlı yani mutajeniktir. Base-pair mutasyonuna neden olmuştur.

Sonuç olarak yukarıda incelenen 4 benzinidenilin bileşikleri metabolik aktivasyon yokluğunda biri TA 98'de TA 100'de ise hepsi mutajenik

bulunmuştur. Metabolik aktivasyon varlığında ise TA 98'de 4 bileşik de mutajenik, TA 100'de ise 3'ü mutajenik bulunmuştur.

3. Madde olan 4- Metil benzinidenilin maddesi için S9 varlığında ve yokluğunda 5 ayrı (100, 10, 1, 0.1, 0.01) dozlarda incelenmiştir. Metabolik aktivasyon olmadan (S9'suz) TA 98 için mutajenik değildir. TA 100 için ise 1. dozda 0,00, 0.1. dozda 0,00 sonuçları elde edilmiş ve standart sapma değerinden ($P \leq 0,05$) küçüktür, anlamlı yani mutajeniktir. Base-pair (nükleik asit çiftleri yer değişimi) mutasyonuna neden olmuştur.

Metabolik aktivasyon varlığında (S9'lu) TA 98 ve TA 100 için mutajenik değildir.

Hrelia ve diğerleri 1998'de bizimkine benzer çalışmasında *Salmonella typhimurium*'da 4-Nitroimidazol ve pirozolun yapı-mutajenite ilişkileri araştırılmıştır. Bir metil grubun varlığının, türeyiklerin mutajenik aktivitesine katkıda bulunduğu görülmüştür.

5. Madde olan 4-Bromo benzinidenilin maddesi için S9 varlığında ve yokluğunda 5 ayrı (100, 10, 1, 0.1, 0.01) dozlarda incelenmiştir. Metabolik aktivasyon yokluğunda (S9'suz) TA 98 için 0.1. dozda 0,01 ve 0.01 dozda 0,02 çıkmış standart sapma değerinden ($P \leq 0,005$) küçüktür, anlamlı yani mutajeniktir. Frameshift mutasyonuna neden olmuştur. TA 100 için mutajenik değildir.

Metabolik aktivasyon varlığında (S9'lu) TA 98 için 1.dozda 0,03 çıkmış bu değerinde standart sapma değerinden ($P \leq 0,05$) küçüktür, anlamlı yani mutajeniktir. Frameshift mutasyonuna neden olmuştur. TA 100'de ise mutajenik değildir.

2. Madde olan 4-Kloro benzinidenilin maddesi için S9 varlığında ve yokluğunda 5 ayrı (100, 10, 1, 0,1, 0,01) dozlarda incelenmiştir. 4-Kloro benzylideneanilin de ise metabolik aktivasyon yokluğunda (S9'suz) TA 98 de mutajenik değildir. TA 100 de ise 100. dozda 0,03, 10. dozda 0,00, 1. dozda 0,00, 0.1. dozda 0,00 sonuçları elde edilmiş bunlardan standart sapma değerinden küçük olduğu için anlamlı yani mutajeniktir. Base-pair mutasyonuna neden olmuştur.

S9 karışımı kullanıldığında ise TA 98 ve TA 100'de mutajenik değildir.

6. madde olan 4- Hidroksi benzinidenilin maddesi için S9 varlığında ve yokluğunda 5 ayrı (100, 10, 1, 0.1, 0.01) dozlarda incelenmiştir. Metabolik aktivasyon yokluğunda (S9'suz) TA 98 için 100. dozda 0,01, 10. dozda 0,03 değerleri bulunmuş bu da $P \leq 0,05$ değerinden küçüktür, anlamlı yani mutajeniktir. TA 100 için mutajenik değildir. Frameshift mutasyonuna neden olmuştur.

Metabolik aktivasyon varlığında (S9'lu) TA 98 ve TA 100 için mutajenik değildir.

Sonuç olarak bu son 4 bileşikte metabolik aktivasyon olmadan ikisi TA 98'de, bir tanesi TA 100'de mutajenik bulunmuştur. S9 karışımı varlığında TA 98'de dört bileşiğin üçü mutajeniktir. TA 100'dekilerin hiç biri mutajenik değildir.

Organizma sayılarında doza bağlı artışlar gözlemlenmiştir ve bunlar zayıf mutajenisite olarak düşünülmüştür. Deneysel ve çözücü kontrol grupları arasındaki önemli farklılıklar olumlu sonuçlar olarak düşünülmüştür.

Daha öncede bahsedildiği gibi Ames /Salmonella/mikrozom mutajenisite testleri, 20 yıldan daha uzun süredir dünya çapında araştırma laboratuvarlarında yeni kimyasalların mutajenik potansiyellerini tespit etmek için ilk perde olarak kullanılmaktadır ve ayrıca pek çok kimyasalın kabul edilmesi ya da tescil edilmesi için düzenleyici ajanlara veri önerisi amacıyla kullanılmaktadır [91]. Bu testin devam eden popularitesi DNA'ya zarar veren tehlikelerin teşhis edilmesi ve yüksek hassasiyetteki mutajenesis biyokimyasal mekanizmalarının açıklanması yeteneği ile bağlantılıdır [11].

Ames testi birçok kimyasal üzerinde uygulanmıştır. Bu çalışmada uygulanan benzinidenilinden başka ames testi birçok kimyasal üzerinde uygulanmıştır. Bunlardan bazıları şunlardır:

Salmonella/Mikrozom testi ile Quinolin ve tüm Monohidroksiquinolinlerin mutajenliği incelenmiş ve kimyasal olarak sentezlenen quinolin türevlerinden hiçbirinin mutajenik olmadığı gösterilmiştir [91].

Bu test ile safra asitlerinin [92] 30 ayrı kimyasalın, gıda katkı maddesi olan azo boyalarının [82], sodyum benzoat ve sodyum nitratın, hava kirliliği oluşturan partiküllerin, fabrika atmosferindeki kirli havanın ve klorlu sularla

hazırlanan meyve sularındaki malik asit ve tartarik asit komplekslerini ve içme sularının, mutajenliği araştırılmıştır.

Benzinidenilin yapılan bu çalışma sonuçları ve diğer kimyasallar ile yapılmış olan araştırmalar göstermiştir ki insanoğlu için gerekli kimyasal maddelerin aynı zamanda mutajenik olabileceği ve bu mutajenitenin araştırılması gerekliliğinin önemi bir kez daha vurgulanmıştır.

Ames testi yüksek duyarlılıkta iyi yapılandırılmış bir metottur ve Ames testinde kullanılan *Salmonella*'yı mutasyona uğratabilen her kimyasal aynı zamanda hayvanlarda da kansere sebep olabilmektedir.

Şu anki çalışma sonucunda bulunanların yanı sıra farklı kısa-dönem testleriyle yapılacak daha ileriki çalışmalar, ilaç ön maddesi olarak benzinidenilin ve türevlerinin kullanımının faydalı olabileceği yönündedir.

KAYNAKLAR

- [1] JAGETIA, G.C., JAYAKRISHNAN, A., FERNANDES, D. ve VIDYASAGAR, M.S., *Evaluation of Micronuclei Frequency in the Cultured Peripheral Blood lymphocytes of Cancer Patient Before and After Radiation Treatment*, Mutation Research, **491**, 9-16 (2001).
- [2] *Review of Potentially Harmful Substances Carcinogens, Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution (GESAMP)*. World Health Organization, Reports and Studies, **46**, Geneva (1991).
- [3] WYSZYNSKA, K. ve LIRO, W.C., *The Use of Cytogenetic Tests for Evaluation of Mutagenic Properties of Selected Dyes Applied in Textile and Cosmetic Industry*, Genetica Polonica, **32(3)** (1991).
- [4] MARON, D.R. ve AMES, B.N., *Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test*, Mutation Research, **113**, 173-215 (1983).
- [5] DEBNATH, A.K., COMPADRE, R.L., DEBNATH, G., SHUSTERMAN, A.J. ve HANSCH, G., *Structure-Activity Relationship of Mutagenic Aromatic and Heteroaromatic Nitro Compounds Correlation with Molecular Orbital Energies and Hydrophobicity*, Journal of Medicinal Chemistry, **34(2)**, 786-797 (1991).
- [6] PAI, C.A., *Foundation of Genetics*, A Science for Society, Keyford Press, Singapur (1985).
- [7] TEMİZKAN, G., *Moleküler Genetik*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul (1996).
- [8] GALLI, A. ve SCHIESTL, R.S., *Effects of Salmonella Assay Negative and Positive Carcinogens on Intrachromosomal Recombination in G₂-Arrested Yeast Cells*, Mutation Research, **370**, 209-221 (1996).
- [9] TROSKO, J.E., *Challenge to the Simple Paradigm that "Carcinogens" are "Mutagens" and to the In Vitro and In Vivo Assays, Used to Test the Paradigm*, Mutation Research, **373**, 245-249 (1997).
- [10] JOSEPHY, P.D., GRUZ, P. ve NOHMI, T., *Recent Advances in the Construction of Bacterial Genotoxicity Assays*, Mutation Research, **386**, 1-23 (1997).
- [11] LEE, H., BIAN, S.S. ve CHEN, Y.L., *Genotoxicity of 1,3-Dithiane and 1,4-Dithiane in the CHO/SEC Assay and the Salmonella / Mikrosomal Test*, Mutation Research, **312**, 213-218 (1994).
- [12] HAMASAKI, T., SATO, T., NAGASE, H. ve KITO, H., *The Genotoxicity of Organotin Compounds in SOS Chromotest and Rec Assay*, Mutation Research, **280**, 195-203 (1992).

- [13] TUTGUN, S., *Kadın ve Erkeklerde Yaşlanmayla Birlikte Artan Mikronükleus Oranının Saptanması*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (1996).
- [14] MAJONE, F., BRUNETTI, R., FUMAGALLI, O., GABRIELA, M. ve LEVIS, A.G., *Induction of Micronuclei by Mitomycin C and Colchicine in the Marine Mussel mytilus Galloprovincialis*, Mutation Research, **244**, 147-151 (1990).
- [15] BAKALE, G. ve MC CREARY, R.D., *Response of Ke Test to NCI / NTP - Screened Chemicals Non – Corcinogenens*, Carcinogenesis, **11 (10)**, 1811-1818 (1990).
- [16] HAYASHI, M., TICE, R.R., MAC GRE GOR, J.T., ANDERSON, D., BLAKEY, D.H., VOLDERS, M.K., OLESON, F.B., PACCHIEROTTI, F., ROMAGNA, F., SHIMADA, H., SUTOU, S. ve VANNIER, B., *In Vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay*, Mutation Research, **312**, 293-304 (1994).
- [17] ZHULEVA, L.Y. ve DUBININ, N.P., *Use of the Micronucleus Test for Ecological Monitoring in Astrachan Oblast*, TEHETNKA, **30(7)**, 999-1004 (1994).
- [18] FORSTER, R., BLOWERS, S.D., CINELLI, S., MARQUARDT, H. ve WESTENDORF, J., *Mutagenicity Testing of Imidazole and Related Compounds*, Mutation Research, **292**, 71-79 (1992).
- [19] JARVIS, A.S., HONEYCUTT, M.E., MC FARLAND, V.A., BULICH, A.A. ve BOUNDS, H.C., *A Comparison of the Ames Assay and Mutatox in Assessing the Mutagenic Potantial of Contaminated Dredged Sediment*, Ecotoxicology and Environmental Safety, **33**, 193-200 (1996).
- [20] GRIFFOLL, M., SOLANAS, A.M. ve BAYONA, J.M., *Characterization of Genotoxic Compounds in Sediments by Mass Spectrometric Techniques Combined with Salmonella/Microsome Test*, Arch. Environ. Contam, Toxicol, **19**, 175-184 (1990).
- [21] Mediterranean Action Plan Med. Pol. United Nations Environment Programme (UNEP), *Assessment of the State of Pollution in the Meidterranean Sea by Carcinogenic, Mutagenic and Teratogenic Substance*, World Healt Organization, MAP Technical Reports Series, **92**, Athens (1995).
- [22] WYSZYN SKA, K., PRZYBOJEWSKA, B., SPIECHOWICZ, E., LIRO, W.C., DZIUBALTOWSKA, E. ve RYDZYNSKI, K., *Cyanuric Chloride Has No Genotoxic and Mutagenic, Proreties İn Bacteria and Bone Marrow Cells*, International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health, **7(3)**, 281-289 (1994).
- [23] BHUNYA, S.P. ve JENA, G.B., *Studies on the Genotoxicity of Monocrotophasphat and Organophasphate Insecticide, in the Chick İn Vivo Test System*, Mutation Research, **293**, 231-239 (1993).

- [24] MENG, Z. ve ZHANG, L., *Cytogenetic Damage Induced in Lymphocytes by Sodium Bisulfite*, Mutation Research, **298**, 63-69 (1992).
- [25] WU, F.Y., TSAI, F.J., KUO, H.W., TSAI, C.H., WU, W.Y., WANG, R.Y. ve LAI, J.S., *Cytogenetic Study of Workers Exposed to Chromid Compounds*, Mutation Research, **464**, 289-296 (2000).
- [26] GASIOROWSKI, K., BROKOS, B. ve SZYBA, K., *Antimutagenic Activity of Fluphenazine in Short-Term Tests*, Mutation Research, **169**, (2001).
- [27] ALEJANDRO ve BIANCHI, M.S., *Genotoxicity of Streptonigrin*, Mutation Research, 35-37, (2001).
- [28] LEONARD, A. ve GERBER, G.B., *Mutagenicity, Carcinogenicity and Teratogenicity of Antimony Compounds*, Mutation Research, **366**, 1-8 (1996).
- [29] LUMBLEY, C.E., PARKINSON, C. ve WALKER, S.R., *An Intenational Appraisal of the Minimum Duration of Chronic Animal Toxicity Studies*, Human&Experimental Toxicology, **11**, 155-162 (1992).
- [30] GUPTA, R.L., VATS, V. ve JUNEJA, T.R., *Activation of Tinidazole, an Antiprotozoal Drug to a Mutagen by Mamalian Liver S9*, Mutation Research, **3701**, 195-201 (1996).
- [31] SPIECHOWICZ, E.J., BORANSKI, B., DZIUBALTOWSKA, E., WYSZYNSKA, K., PRZYBOJEWSKA, B., LIRO, W.C. ve PRZONDO, J., *Genotoxicity Assesment of Rokanol B₂ and Rokamid R₁*, International Journal of Occupational Medicine and Environ Mental Health, **7(2)**, 51-57 (1994).
- [32] HERA, C. ve PUEYO, C., *Response of the L-Arabinose Forward Mutation Assoy of Salmonella Typhimurium to Fromeshift Type Mutagens*, Mutation Research, **203**, 39-45 (1988).
- [33] JUNG, R., ENGELHART, G., HERBOLT, B., JÖCKH, R. ve MÜLLER, W., *Collaborative Study of Mutagenicity with Salmonella Typhimurium TA 102*, Mutation Research., **278**, 265-270 (1992).
- [34] TORTORA, FUNKE, C., *Microbiyology in Introduction*, Fourth Edition, 207-215 (1992).
- [35] ALCAMA, I.E., *Fundamentals of Microbiology*, Third Edition, 175-185 (1991).
- [36] KUSAMRAN, W.R., WAKABAYASHI, K, OGORI, A., TEPSUWAN, A., NAGAO, M. ve SUGIMURA, T., *Mutagenicities of Bangkok and Tokyo River Waters*, Mutation Research, **325**, 99-104 (1994).

- [37] FRANCISSO, M.N., LEONE, R., BRUNELLO, F., MONOSTRA, C., TEZZA, F. ve STORTI, P.W., *Mutagenic Activity in Waste Water Concentrates From Dye Plants*, Mutation Research, **298**, 91-95 (1992).
- [38] SMITH, C.J., MC KARN, S.C., DAVIS, R.A., LIVINGSTON, S.D., BOMBICK, B.R., AVALOS, J.T., MORGAN, W.T. ve DOOLITTLE, D.J., *Human Urine Mutagenicity Study Comparing Cigarettes Which Burn or Primarily Heat Tobacco*, Mutation Research, **361**, 1-9 (1996).
- [39] WAGNER, E.D., WASILEWSKA, A.C., CONNOLY, S. ve PLEWA, M.J., *Mutagenic Analysis of 2,3-Diaminophenazine and 2-Amino-3-Hydroxyphenazine in Salmonella Strains Expressing Different Levels of O-Acetyltransferase with and without Plant and Mamalian Activation*, Mutation Research, **372**, 65-74 (1996).
- [40] WATANABE, K., SAKAMOTO, K. ve SASAKI, T., *Comparisons Chemically-Induced Mutagenicity Among Four Bacterial Strains, Salmonella Typhimurium TA 102 and TA 2628 and E.Coli Wp₂, PKM 101 and WP2A CPKM 101 Colloborative Study I*. Mutation Research, **361**, 143-155 (1996).
- [41] FORMAN, D. ve AMES, B., *The Ames Test and The Causes of Cancer Reprinted From The British*, Medical Journal, **303**, 428-429 (1991).
- [42] YVON, T., WILLIAM, I.W. ve ALAN, A., *The Detection of Promutagen Activation by Extracts of Cells Expressign Cytochrome P450A₂ cDNA: Preincubation Dramatically İnceases Revertant Yield in te Ames Test*, Mutation Research, **281**, 39-45.
- [43] DEMİRİSOY, A., *Kalitim ve Evrim*, Meteksan Yayınları, **5**, 902, Ankara (1988).
- [44] KLUG, W.S. ve CUMMINGS, M.R., *Concept of Genetics*, 6 th Edition, 0-13-081626-4 (Çev. ÖNER, C. *Genetik Kavramlar*, Palme Yayıncılık, 816, 2002).
- [45] ERKAN, S., *Moleküler Biyoloji*, Bornova / İzmir (1992).
- [46] AKMAN, M., *Bakteri Genetiği*, Cumhuriyet Üniversitesi Yayını, 2. Baskı, Sivas (1983).
- [47] DEMİRİSOY, A., *Yaşamın Temel Kuralları*, Genel Biyoloji, **1(1)**, Ankara (1992).
- [48] BAĞCI, H., *Comparions of the Promutagen-Actwaty Capacity of S9 Liver Preperation From Rat and Fish, Using the in Vitro Salmonella Mutagenicity Test*, Mutation Research, 195-201 (1989).
- [49] ORALLER, G., *Genetik*, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi, 125-177, İstanbul (1990).

- [50] SALEH, K., *Mikronükleus Testi ile Bazı Kimyasal Maddelerden ve Çevre Kirleticilerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (1997).
- [51] CARIELLO, N.F. ve PIEGORSCH, W.W., *The Ames Test: The Two-Fold Rule Revisited*, *Mutation Research*, **369**, 23-31 (1996).
- [52] SUZUKI, GRIFFITHS, MILLER ve J.H., LEWONTIN, *An Introduction to Genetic Analysis*, Fourth Edition, New York, USA (1989).
- [53] STRACHAN, T. ve READ, A.P., *Human Molecular Genetics*, Bios Scientific Publishers Limited, (1996).
- [54] VURAL, N., *Toksikoloji*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fak. Yayınları, **73**, 115-124 (1984).
- [55] ŞAHİN, Y., *Genel Biyoloji II.*, Bilim Teknik Yayınevi, 334-349 (1995).
- [56] TATLI, A., *Evrin ve Yaratılış*, Damla Matbaacılık, 95-107, Konya (1992).
- [57] THERMAN, E., *Human Chromosomes, Structure Behavior Effects*, Second Edition, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, Tokya (1986).
- [58] BOLZAN, A.D. ve BIANCHI, M.S., *Genotoxicity of Streptonigrin, Areview*, *Mutation Research*, **488**, 25-37 (2000).
- [59] BAŞARAN, N., *Tıbbi Genetik*, Anadolu Üniversitesi Basımevi, 152-168, Eskişehir (1983).
- [60] POPESCU, N.C. ve ZIMONJIC, D.B., *Molecular Cytogenetic Characterization of Cancer Alterations*, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **93**, 10-21 (1997).
- [61] RUSSELL, P.J., *Genetics*, The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc., Canada, USA (1998).
- [62] BİLGE, E., *Genetik*, Ar Yayın Dağıtım, **4**, 220-231, İstanbul (1981).
- [63] MURRAY, R.K., MAYES, P.A., GRANNER, D.D.K. ve RODWELL, V.W., *Haper'in Biyokimyası*, Çev. Gülriz Menteş, Barış Kitabevi, 811-917, İstanbul (1993).
- [64] WATSON, J.D., GILMAN, M., WITOWSKI, J. ve ZOLLER, M., *Recombinant DNA*, Second Edition, (1997).
- [65] ROLLAS, S., *İlaçların Metabolizması*, Marmara Üniversitesi Yayını, **525**, İstanbul (1992).
- [66] KAYAALP, O., *Tıbbi Farmakoloji*, Hacettepe Taş Yayınları, Ankara (1995).

- [67] YENSON, M., *İnsan Biyokimyası*, İstanbul Tıp Fakültesi, Rektörlük, Sermet Matbaası, **2819**, 766-771, Kırklareli (1984).
- [68] PERLOW, R.A. ve BROYDE, S., *Evadign the Proufreading Machinery of a Replicative DNA Polymerase İnduction of a Mutation by an Enviromental Carcinogen*, J.Mol. Biol., **309**, 519-536 (2001).
- [69] EISEN, J.A. ve HANAWALT, P.C., *Phylogenomic Study of DNA Repairgenes Proteins and Processes*, Mutation Research, **435**, 171-213 (1999).
- [70] THOMA, F., *Light and Dark in Cromatin Repair: Repair of Uvr – İnduced DNA Lesions by Photolyase and Nucleotide Excision Repair*, EMBO, **18**, 6585-659 (1999).
- [71] CALLEJA, F., JANSEN, J.G., VRIELING, H., LAVAL, F. ve VANZEELAND, A.A., *Modulation of the Toxic and Mutagenic Effects İnduced by Methyl Methane Sulfonate in Chinese Hamster Ovary Cells by Ovary Cells by Overexpression of the Rat N-Alkyl-Purine-DNA Glycosylase*, Mutation Research, **425**, 185-194 (1999).
- [72] THEIS, K., SKORNAGA, M., MACHIUS, M., MAKAGAWA, N., VANHOUTEN, B. ve KISKER, C., *The Nucleotid Excision Repair Protein Uvr B, ∞ Helicase-like Enzyme with Acatch*, Mutation Research, **460**, 277-300 (2000).
- [73] GRZESIUR, E., GOZDEK, A. ve TUDEK, B., *Contribution of E.Coli AIKA, TagA Glycosylases and Uvr ABC-Excinuclease in MMS Mutagenesis*, Mutation Research, **480-481 (1-2)**, 77-84 (2001).
- [74] GATEHOUSE, D., G., ROWLAND, I.R., WILLOX, P., DANDER, R.D. ve FOSTER, R., *Baterial Mutation Assay, Basic Mutagenic Recommended Procedure (Ed: Kirklandı, D.J.) The Bath, Press, Avon Research, 227-234 (1998)*.
- [75] HAACK, T., ERDINGER, L. ve BOCHE, G., *Mutagenicity in Salmonella Typhimurium TA 98 and TA 100 of Nitroso and Respective Hydroxylamine compounds*, Mutation Research, **491**, 183-193 (2001).
- [76] DİRİL, N., İZBIRAK, A., SÜMER, S. ve SARAÇBAŞI, T., *Ames Mutajenite Testinde Mutand Sayılarını Etkileyen Bazı Faktörlerin Araştırılması*, Anadolu Tıp Dergisi, **12**, 149-160 (1990).
- [77] ABMANN, N., EMMRICH, M., KAMPF, G. ve KAISHER, M., *Genetoxic Activity of İmportant Nitrobenzenes and Nitroanilines in the Ames Test end their Structure Activity Relationship*, Mutation Research, **395**, 139-144 (1997).
- [78] SUTER, W., HARTMANN, A., POETTER, F., SAGELSDORFF, P., HOFMANN, P. ve MARTUS, H.J., *Genotoxicity Assesment of the Antiepileptic Drug AMP 397, an Ames-positive Aromatic Nitro Compounds*, Mutation Research, 181-194 (2002).
- [79] PARLAK, H. ve BOYACIOĞLU, M., *İzmir Körfezine Akan Dere Sedimentlerinin Mutajenitesi*, Ege Üniversitesi, **18(3-4)**, 323-331 (2001).

- [80] UMBUZEIRO, G.A., ROUBICEK, D.A., SANCHEZ, P.Z. ve SATO, M.I.Z., *The Salmonella Mutagenicity Assay İnsurface Water Quality Monitoring Program Based on a 20 Year Survey*, Mutation Reserch, **491**, 119-126 (2001).
- [81] DİLEK, B., *Porsuk Nehri'nin Genetoksik Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Türkiye (2004).
- [82] İPEK, M.F. ve GÜLLE, B., *Tekstil Endüstrisinde Kullanılan Boya Maddelerinin Ames Test Sistemi ile Mutajenite Etkilerinin Araştırılması*, Fatih Üniversitesi, İstanbul (2004).
- [83] DİKMEN, C. ve ERGENER, L., *Organik Kimya Laboratuvarı*, Çağlayan Kitabevi, **199**, İstanbul (1971).
- [84] İKİZLER, A., *Organik Kimyaya Giriş*, Karadeniz Üniversitesi Basımevi, Trabzon (1985).
- [85] NOVAK, P., MEİC, Z., TOPIC-VIKIC, DRAZEN, SMRECKI, V. ve PLAVEC, J., *Structural Dependence of İsoptope Effect in ¹H and ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectra of the Trans- N-Benzylideneaniline İmino Group Spectrochimica Acta Part A54*, 327-333 (1998).
- [86] TOMATIS, L., *The Predictive Volue of Rodent Carcinogenicity Tests in the Evaluation of Human Risks*, Ann. Rev. Pharmacol, Toxicol, **19**, 511-530 (1979).
- [87] SCHREİNER, C.A., *Application of Short Term Tests to Safety Testing of İndustrial Chemicals Cellular Systems for Toxicity Testing in Annals New York Academy of scienes*, Editors: Williams, G.M., Dunkel, V.C. and Ray, V.A. New York (1983).
- [88] AMES, B.N. ve MC. CANN, J., *Validation of Salmonella Test: Areply to Riskus and Legator*, Cancer Research, **41**, 4192 (1981).
- [89] GLENDE, C., SCHMITT, H., ERDINGER, L., ENGELHARDT, G. ve BOCHE, G., *Transformation of Mutagenic Aromatic Amines into Non-Mutagenic Species by Aykyl Substituents Part I, Alklkylation Ortho to the Amino Function*, Mutation Research, **498**, 19-37.
- [90] HRELIA, P., FIMOĞNARI, C., MAFFEI, F., BRIGHENTI, B., GARUTI, L., BURNELLI, S. ve CANTELLI-FORTI, G., *Synthesis, Metabolism and Structure Mutagenicity Relationships of Novel 4-Nitro-(İmidazoles and Ryrazoles)in Salmonella Typhimurium*, Mutation Research, **397**, 293-301 (1998).
- [91] HAKURA, A., SUZUKI, S., SWADA, S., SUGIHARA, T., HORI, Y., UCHIDA, K., KENS, WD., SAGAMI, F., MOTOOKA, S. ve SATOH, T., *Use of Human liver S9 in the Ames Test Assay of Three Procarcinogens Using Human S9 Derieved From Multiple Donors*, Regulatory Toxicology and Pharmacology, **37**, 20-27 (2003).

- [92] WILLEMS, M.I., DUBOIS, G., BOYD, D.R., DAVIES, R.J.H., HAMILTON, L. ve MC CULLOUGH, *Mutagenicity of Quinaline and All Monohydroxquinolines with a Series of Arene Oxide, Transdihydrodiol, Epoxide, N-Oxide and Arene Hydrate Derivatives of Quilonilen in the Ames/Salmonella/Microsome Test*, Mutation Research, **278**, 227-236.