

**MİKRONÜKLEUS TESTİ İLE BAZI
KİMYASAL MADDELERİN VE ÇEVRE
KİRLETİCİLERİN NEDEN OLDUĞU
KLASTOJENİK ETKİLERİN
ARAŞTIRILMASI**

KAMEL SALEH
Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
HAZİRAN – 1997

.....Kamel SALEH.....' in ...Yüksek Lisans..... tezi olarak hazırladığı
Mikronükleus Testi ile Bazı Kimyasal Maddelerin ve Çevre Kirleticilerin Neden
Olduğu Klastojenik Etkilerin Araştırılması..... başlıklı tez
03.07.1997 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Lisansüstü Öğretim
Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Üye (Tez Danışmanı)

: Yrd. Doç. Dr. Helya Zeytinoshu

Üye

: Prof. Dr. Ahmet ÖZATA

Üye

: Yrd. Doç. Dr. Mediha Canbek Wnbf -

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu' nun
04.07.1997 tarih ve 11/5 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Ersan PÜTÜN
Fen Bilimleri Enstitüsü
Müdürü

Anadolu Üniversitesi
Merkez Kütüphane

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

**MİKRONÜKLEUS TESTİ İLE BAZI KİMYASAL MADDELERİN VE
ÇEVRE KİRLETİCİLERİN NEDEN OLDUĞU KLASTOJENİK ETKİLERİN
ARAŞTIRILMASI**

KAMEL SALEH

**Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Yard. Doç. Dr. Hülya ZEYTİNOĞLU
1997, Sayfa 57**

Çeşitli faktörlerin mikronükleus oluşumu üzerine olan klastojenik etkileri, farklı organizmaların çeşitli hücrelerinde araştırılmıştır. Burada ilk olarak, Eskişehir ve Kütahya şehirlerinden geçen, sanayii ve zirai atıklarını taşıyan Porsuk çayı suyunun, kurbağa *Rana ridibunda* eritrosit hücreleri üzerindeki klastojenik etkilerini incelenmiştir. Porsuk suyunun azot, sümerbank tekstil ve şeker fabrikalarının bulundukları yerlerden alınan kurbağalarının incelenen kanları, Porsuk suyunun bu atıklarla kirlenmeyen kısmından alınan kurbağaların incelenen kanlarının MN (Mikronükleus) oranı 5-6 kere daha fazla olduğu gösterilmiştir. MN'deki bu artış, endüstriyel ve zirai atıklar, suda yaşayan organizmalar ve belki suyun çevresinde yaşayan insan popülasyonu üzerine klastojenik etki yapma potansiyaline sahip olduğu kanıtlanmıştır.

İkinci olarak, ilaç hammaddesi olarak kullanılan 2, 4, 5, trifenil imidazol'un memeli hayvanlardaki klastojenik etkileri yönünden araştırılmıştır. 2, 4, 5, trifenil imidazol'un 1 mg, 2 mg, 4 mg, 6 mg ve 8 mg dozları *Wistar* cinsi ratlara intreperitoneal enjeksiyon ile uygulanmıştır. 1, 2, 4, 6, 8 mg 2, 4, 5 trifenil imidazol enjekte edilmiş hayvanlarda kemik iliği yaymalarının incelenmesi sonucu, mikronükleus oluşumunun kontrol gruplarına göre 2-3 kat daha fazla olduğunu saptanmıştır. Mikronükleusundaki bu artış 2, 4, 5 trifenil imidazol'un ratlar üzerine klastojenik etkisi olduğunu ve bu ilaç hammaddesini kullanan insanlar üzerinde benzer etkilere sahip olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kurbağa Kanı, Mikronükleus Test, Rat Kemik İliği, Klastojenik Etki, 2, 4, 5, Trifenil İmidazol

ABSTRACT
Master of Science Thesis

**INVESTIGATION OF CLASTOGENIC EFFECTS CAUSED BY SOME
CHEMICALS AND ENVIRONMENTAL POLLUTION BY MICRONUCLEUS
TEST**

KAMEL SALEH

Anadolu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Program

Supervisor: Assoc. Prof. Hülya ZEYTİNOĞLU
1997, Page 57

Clastogenic effects of various factors on the formation of micronucleus have been investigated in a variety of cells of different organisms. Here, firstly clastogenic effects of industrial and agricultural contaminants of Porsuk stream flowing through Kütahya and Eskişehir cities, on the erythrocytes in peripheral blood cells of *Rana ridibunda* were investigated. Examination of blood smears showed that formation of micronuclei was 5-6 times more abundant in frogs from industrial sites where Nitrogen, Textile and Sugar factory were located than in animals from the least polluted sites of the stream. This increase in the formation of micronucleus indicates that industrial and agricultural pollution exerts clastogenic effects on organisms, may has similar effects on the human population located around the region.

Secondly, the influence of 2, 4, 5, tryphenyl imidazole, which is as medicine crude substance, was investigated in terms of clastogenic effects on mammalian animals. 1 mg, 2 mg, 4 mg, 6 mg and 8 mg dose of 2, 4, 5, tryphenyl imidazole was injected into *Wistar* kind of rats intraperitoneal. Examination of bone marrow smears showed that in animals injected with 4, 6 and 8 mg 2, 4, 5, tryphenyl imidazole the formation of micronuclei was 2-3 times more than the control groups. This increase in the formation of MN indicates that 2, 4, 5, tryphenyl imidazole exerts clastogenic effect on rats and may has similar effects on human population whom uses this medicine crude.

Keywords: Frog Blood, Micronucleus Test, Rat Bone Marrow, Clastogenic Effect, 2, 4, 5, Tryphenil İmidazole

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesinde, baştan bu yana değerli bilgilerini, yardımlarını ve önerilerini benden esirgemeyen, çalışmalarımda beni yönlendiren değerli danışman hocam sayın **Yrd. Doç Dr. Hülya ZEYTİNOĞLU**'na teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Tezimin histolojik preparatlarının boyama aşamasında değerli fikirlerini ve manevi desteklerini gördüğüm hocam sayın **Yrd. Doç. Dr. Melih ZEYTİNOĞLU**'na, laboratuvar olanaklarının kazanılmasında değerli çabaları olan Biyoloji Bölümü başkanı sayın **Prof. Dr. Merih KIVANÇ**'a ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı başkanı sayın **Prof. Dr. Ahmet ÖZATA**'ya, ayrıca yardımlarını gördüğüm tüm Biyoloji Bölümü elemanlarına teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmalarımın laboratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Biyolog **Mustafa UYANOĞLU**'na ve tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Altı yıl süren lisans ve yüksek lisans öğrenimi yapmamı ve tamamlamamı sağlayan maddi ve manevi, ellerinden geleni yapan, hiç bir isteğimi geri çevirmeyen sevgili **anneme** ve değerli ağabeyim sayın **Dr. Mahmud SALEH (ABU-TAMİM)**'e en içten şükran ve teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Mikronükleus Tanımı	4
2.2. Mikronükleus Oluşumu	4
I.BÖLÜM: MİKRONÜKLEUS TESTİ İLE ÇEVRE	
KİRLETİCİLERİNİN MUTAJENİK ETKİLERİNİN <u>Rana</u>	
<u>Ridibunda</u> KAN HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI.....	6
I.1. Su Kirliliğinin Tanımı	6
I.2. Porsuk Suyu ve Önemli Kirleticileri	7
I.2.1. Porsuk çayı hakkında genel bilgiler	7
I.2.2. Porsuk suyu kirliliği	8
I.2.3. Kirletici kuruluşlar ve aldıkları önlemler	9
I.2.3.1. Mezbahalar	9
I.2.3.2. Şeker fabrikaları	9
I.2.3.3. Sümerbank basma fabrikası	9
I.2.3.4. Kütahya azot fabrikası	10
I.I. Su Kirliliğinin İnsan ve Çevresine Etkileri	10
I.I.1. Kirleticilerin atıklarında bulunan moleküller ve toksisiteleri	10
I.I.1.1. Krom (Cr)	10
I.I.1.2. Fosfor (P)	11
I.I.1.3. Azot ve azotun bileşenleri	11

İÇİNDEKİLER (DEVAM)

Sayfa

II. BÖLÜM : MİKRONÜKLEUS TESTİ İLE 2, 4, 5, TRİFENİL İMİDAZOLGENOTOKSİSİTESİNİN <u>WİSTAR</u> RAT KEMİK İLİĞİNDE ARAŞTIRILMASI.....	12
II.1. Kemik İliği	12
II.1.1. Eritrositlerin Olgunlaşması (Eritropoesis)	12
II.1.1.1. Proeritroblast	13
II.1.1.2. Polikromatofilik eritroblast	13
II.1.1.3. Ortokromatofil	15
II.1.1.4. Retikülosit	15
II.1.1.5. Eritrosit	15
II.2. İmidazol'lerin Yapı ve Aktiviteleri	15
II.2.1. Kimyasal yapı	15
II.2.2. Biyolojik ve farmakolojik özellikleri	16
II.2.3. 2,4,5-Trifenil imidazol'un özellikleri ve sentezi	18
I.II. Çalışmanın Amacı	20
3. MATERYAL ve METOD.....	20
I. BÖLÜM: KURBAĞA KANINDA MN TESTİ.....	20
I. 1. Kurbağaların Toplanması	20
I.2. Kurbağadan Kan Alınması	20
I.3. Kan Preparatlarının Hazırlanması	20
II. BÖLÜM: RAT KEMİK İLİĞİNDE MN TESTİ.....	22
II.1.Kullanılan Hayvanlar	22
II.2. Kullanılan Madde	22
II.2.1. Deney Hayvanlarına 2, 4, 5, Trifenil imidazol'un Uygulanması	23
II.2.2. Kemik İliği Preparatlarının Hazırlanması	23
3.1. Mikroskopi ve Mikrofotografi	24
3.2. İstatistiksel Değerlendirmeler	24

İÇİNDEKİLER (DEVAM)

Sayfa

4.BULGULAR.....	25
I.BÖLÜM: PORSUK ÇAYINDAN TOPLANAN <u>Rana</u> <u>Ridibunda</u> ERİTROSİTLERİNDE MİKRONÜKLEUS OLUŞUMU.....	25
II. BÖLÜM : İMİDAZOL'A MARUZ KALAN RAT KEMİK İLİĞİ HÜCRELERİNDE MİKRONÜKLEUS OLUŞUMU.....	35
II.1. Deney ve kontrol grubunda MN oranı	35
5. TARTIŞMA.....	43
I. BÖLÜM: PORSUK ÇAYINDA TOPLANAN <u>Rana ridibunda</u> ERİTROSİTLERİNDE MİKRONÜKLEUS OLUŞUMU.....	43
II. BÖLÜM: 2, 4, 5, TRİFENİL İMİDAZOL ENJEKTE EDİLMİŞ RAT KEMİK İLİĞİNDE MN OLUŞUMU	46
6. KAYNAKLAR.....	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Kemik iliği hücrelerinin eritrosit hücresinin oluşumu (Junqueira et al., 1993) [89]	14
Şekil 2.2. İmidazol'un sentez basamakları	16
Şekil 2.3. 2, 4, 5, trifenil imidazol sentez basamakları	18
Şekil 3.1. Porsuk çayı ve incelenen örneklerin alındığı noktalar	21
Şekil 4.1. Kurbağaların eritrosit hücrelerinde gözlenen A tipindeki mikronükleus	26
Şekil 4.2. Kurbağaların eritrosit hücrelerinde gözlenen B tipindeki mikronükleus	26
Şekil 4.3. Kurbağaların eritrosit hücrelerinde gözlenen C tipindeki mikronükleus	27
Şekil 4.4. Kurbağaların eritrosit hücrelerinde gözlenen D tipindeki mikronükleus	27
Şekil 4.5. Kontrol grup olarak kabul edilen kurbağaların eritrosit hücrelerinin genel görünüşü	28
Şekil 4.6. Azot fabrikası civarında yakalanan kurbağaların ve kontrol grubunun kan preparatlarında gözlenen mikronükleus sayılarının grafiği	30
Şekil 4.7. Sümerbank tekstil fabrikası civarında yakalanan kurbağaların ve kontrol grubunun kan preparatlarında gözlenen mikronükleus sayılarının grafiği	31
Şekil 4.8. Şeker fabrikası civarında yakalanan kurbağaların ve kontrol grubunun kan preparatlarında gözlenen mikronükleus sayılarının grafiği	33
Şekil 4.9. Azot, sümer ve şeker fabrikalarının civarında yakalanan kurbağaların ve bunların kontrol gruplarında gözlenen mikronükleus yüzdeleri grafiği	34
Şekil 4.10. Negatif kontrol olarak hiç bir madde uygulanmamış normal ratların kemik iliği hücrelerinin genel görüntüsü	36

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.11. 8 mg 2, 4, 5, trifenil imidazol enjekte edilmiş ratların normokromatofil kemik iliği hücrelerinde gözlenen mikronükleuslar	37
Şekil 4.12. 8 mg 2, 4, 5, trifenil imidazol enjekte edilmiş ratların kemik iliği polikromatofil hücrelerinde gözlenen mikronükleuslar	37
Şekil 4.13. 8 mg 2, 4, 5, trifenil imidazol enjekte edilmiş ratların kemik iliği polimorf hücrelerinde gözlenen mikronükleuslar	38
Şekil 4.14. 8 mg 2, 4, 5, trifenil imidazol enjekte edilmiş ratların ve kontrol grubunun kemik iliği normokromatofil hücrelerinde gözlenen mikronükleusların grafiği	39
Şekil 4. 15. 8 mg 2, 4, 5, trifenil imidazol enjekte edilmiş ratların ve kontrol grubunun kemik iliği polikromatofil hücrelerinde gözlenen mikronükleusların grafiği	40
Şekil 3.16. 8 mg 2, 4, 5, trifenil imidazol enjekte edilmiş ratların ve kontrol grubunun kemik iliği polimorf hücrelerinde gözlenen mikronükleusların grafiği	40
Şekil 3.17. 8 mg 2, 4, 5, trifenil imidazol enjekte edilmiş ratların ve kontrol grubunun kemik iliği normokromatofil, polikromatofil ve polimorf hücrelerinde gözlenen mikronükleusların grafiği	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge No</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4. 1. Azot fabrikası civarında alınan kurbağaların ağırlıklarına göre MN çeşitleri ve oranı.	30
Çizelge 4. 2. Sümerbank tekstil fabrikası civarında yakalanan kurbağaların ağırlıklarına göre MN çeşitleri ve oranı.	31
Çizelge 4. 3. Gelin kayası köyü civarında ve Anadolu Üniversitesi kampüsünden kontrol grubu olarak yakalanan kurbağaların ağırlığına göre MN çeşitleri ve oranı.	32
Çizelge 4. 4. Şeker fabrikası civarında yakalanan kurbağaların ağırlığına göre MN çeşitleri ve oranı.	33
Çizelge 4. 5. Porsuk çayının değişik bölgelerinden toplanan kurbağaların eritrositlerinde taşıdıkları toplam MN sayısı ve yüzdeleri.	34
Çizelge 4. 6. 2, 4, 5, trifenil imidazol enjekte edilmiş ratlar ve bunların kontrol gruplarının kemik iliği preparatlarından elde edilen MN sonuçları.	39
Çizelge 4. 7. Deney ve kontrol gruplarına verilen farklı dozlar.	41

1. GİRİŞ

Günümüzde, insan sağlığına, biyolojik yapı, fiziksel ve kimyasal faktörlerin yanısıra çevresel faktörlerin de çok önemli etkisi olduğu şiddetle vurgulanmaktadır. Çünkü bu faktörlerden bazıları sağlığımızı tehdit etme boyutuna ulaşmıştır. Ciddi defektlere neden olan, hastalıklara zemin hazırlayan dış etkenlerin başında, günlük yaşamda farkında olarak yada olmadan karşı karşıya kaldığımız doğal veya sentetik kimyasal elemanlar gelmektedir. Kanseri doğuran nedenleri dış faktörlerde arama gereği ilk kez 18. yüzyıl sonlarında Sir Pervical'in klinik gözlemleri ile başlamıştır. Ayrıca kromozomların, bozulmalarının, daha sonra hücrenin yaşlanıp ölmesinin dış ve iç faktörlere bağlı olduğu Alexender tarafından 1967'de ortaya atılmıştır [1]. Günümüzde de çeşitli faktörlerin insan ve diğer canlılar üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar devam etmektedir [2-24].

Yukarıda sözü edilen çeşitli dış ve iç faktörlerin genotoksik yada mutajenik etkilerinin araştırılması için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. En önemlileri çeşitli sitogenetik yöntemler olup bunlar, **kardeş kromatid değişimi yöntemi** (SCE=Sister Chromatid Exchange), **Ames testi**, **Mikronükleus testi**, **kromozom bozulma testi** (CA=Chromosome aberration), **Comet testi** (Gen konversiyonu ve DNA kırılmaları) ve **E. coli testidir** [11, 16-19, 23-33].

SCE yönteminin temel prensibi, kardeş kromatidlerin birbirine kontrast sağlayacak şekilde boyanmasına dayanmaktadır. Bu sebepten dolayı kardeş kromatidler arasında meydana gelen bir parça değişimini, boyama farklılığından hemen anlamak mümkündür. Bu yöntem değişik amaçlar için günümüzde sık sık kullanılmaktadır [8, 11, 12, 22]. Bu yöntemle yalnızca kromozomlardaki yapısal düzensizlikler saptanabilmektedir. Bu yüzden SCE yönteminin sınırlı amaçlar için kullanılması söz konusudur.

Ames testi, mutant Salmonella strainlerini kullanarak uygulanan bir mutajenite test yöntemidir [31, 34]. Çeşitli kimyasal, fiziksel ve çevresel faktörlerin mutajenik etkilerini

araştırmak için geniş bir şekilde kullanılan yöntem olmasına rağmen, yüksek organizmalardaki etkiyi göstermesi bakımından yetersiz olmaktadır [29, 32, 33].

Aynı prensibe dayalı olarak *E. coli* ve *Sacharomycetes* suşları ile de benzer mutajenite testleri yaygın olarak yapılmaktadır [32]. **CA ve Comet** yöntemi ise hücrelerin metafaz safhasında incelenerek, kromozom hatalarının ortaya çıkarıldığı sitogenetik testlerdir [25, 28].

Mikronükleus testi diğer yöntemler ile yapılamayan bazı mitoz anomalileri ve kromozom kaybı gibi durumların ortaya çıkarılması için daha elverişli bir yöntem olup yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [23, 35, 36]. Kısa zamanda, geniş çapta genotoksik etkilerin incelenmesi için hem *in vivo* hemde *in vitro* olarak, farklı ortamlardaki ajanların mutajenik etkisini değerlendirmek için kullanılan sitogenetik bir testtir [19-21, 37-40]. Bu testin yardımı ile çok sayıdaki kimyasal, fiziksel, biyolojik faktörlerin, mitotik inhibitörlerin, çevre kirliliği ajanlarının, radyasyonun mutajenik aktiviteleri ve yaşlanmanın etkisi incelenmiştir [7, 12-19, 22-24, 41-52].

Mikronükleus, bölünme yeteneğine sahip olan bütün hücre ve dokularda meydana gelebilir [37]. Çeşitli çalışmalarda, kemik iliği ve periferik kanın yanı sıra karaciğer, fetüs, insan yanak mukoza hücreleri, exfoliya olan ağız hücreleri, exfoliya olan üriner kesesi hücreleri, keratanositlerde, splenositlerde, spermatoid, solungaç ve hepatoma hücrelerinde, değişik kimyasal ajanların genotoksik etkileri MN testi ile değerlendirilmiştir [3, 4, 6, 8-10, 12, 22, 26, 27, 30, 33, 52-64].

Değişik hücrelerde olduğu gibi değişik organizma çeşitlerinde de MN testi uygulanmaktadır. Örneğin insan hücrelerinin, kurbağa, balık, kuş eritrositleri ve bazı bitki hücreleri de çevre kirleticisi olan kimyasal ajanların ya da diğer çeşitli faktörlerin genotoksik etkileri bakımından MN testi ile değerlendirilmiştir [6, 7, 13, 16-21, 23, 24, 50, 54]. Ayrıca rastgele bir şekilde laboratuvar hayvanlarında veya diğer doğal canlılarda MN oluşma olasılığı yapılan bir çalışma ile saptanmıştır [24, 65].

Günümüzde canlıların kimyasal ve diğer faktörlere maruz kaldığı bir dünyada, hücre bölünmesi sırasında oluşan hatalar sonucu monosomi veya trisomi olan hücrelerin meydana geldiği, bu bölünme hatalarının değişik metabolik yanlışlıklara ve genetik hastalıklara hatta canlının yaşlanmasına yol açtığı bildirilmektedir [1, 39, 48, 66-70, 75]. Bu verileri göz önüne alacak olursak, her hangi bir faktöre maruz kalan canlılarda mitotik veya mayotik hataların oluşma olasılığı artar ve bu artışa bağlı olarak mikronükleus sıklığında bir artış söz konusu olabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mikronükleus Tanımı

İlk kez mikronükleus 1891'de, Howel ve arkadaşları tarafından insan periferik kan eritrositlerinde saptanmış, daha sonra bu çalışmalar Jolly tarafından tanımlanmıştır. İşte bu yüzden bazı kaynaklarda "Howel-Jolly body" olarak da tanımlanmaktadır [22,71-74].

Mikronükleuslar, hücre bölünmesi sırasında kutuplara çekilemeyen kromozom veya kromozom fragmentlerinin daha sonra ana nükleus yanında küçük kromatin partikülleri halinde görülen, yapı ve boyama bakımından ana nükleusa benzeyen yapılardır. Ancak büyüklüğü tartışmalara neden olmaktadır. Kimi kaynaklara göre ana çekirdeğin 1/5-1/20'si kadardır [75]. Kimilerine göre ise bu büyüklük ana çekirdeğin 0.5-0.8'i kadar olabilmektedir [23]. Mikronükleus değişik şekil yada sayılarda olabilir. Bir hücrede iki yada daha fazla mikronükleus bulunabilir. Bazı durumlarda birbirine yapışık durumda olabildiği gibi bazı durumlarda ise yüzey çıkıntıları oluşturan mikronükleuslar meydana gelebilir. Bu yapılar, ana çekirdeğe ince yada kalın bir bağla bağlı olabilirler. Bir ya da birden fazla damla şeklinde ya da şekillenmemiş nüklear materyal olarak kibrit çöpü şeklinde de gözlenebilirler. Bunlar değişik yoğunluklarda yuvarlak veya biraz basık yumaklar oluştururlar [23].

2.2. Mikronükleus Oluşumu

Hücre bölünmesi sırasında, meydana gelen kromozom anomalileri ya uzunlamasına bölünen kromozomların ayrılmayarak (Nondisjunction) bir kutba gitmesi ve diğer kutba kromozom gitmemesi şeklinde ya da kromozomların anafazda geri kalması (anafaz laggig) şeklinde olmaktadır [66, 68, 76].

Kromozomların anafazda geri kalmalarının nedeni, sentriollerden oluşan mikrotübüllere sentromerlerinden bağlanamamalarıdır. Herhangi bir sebepten dolayı kromozomlardaki bir kırılma sonucu oluşan kromozom parçaları sentromerden yoksun olabilirler ve bundan dolayı mikrotübüllere bağlanmaları mümkün olmayabilir [22, 35, 55, 77, 78]. Kromozomların anafazda geri kalmasının diğer bir nedeni de sentromerin özel bir bölgesinde meydana gelen nokta mutasyonu sonucunda, kinetokorun fonksiyonunun değişmesidir. Bu değişiklik sonucunda kromozomlar mikrotübüllere bağlanamaz. Sentromer içinde yer alan bu bölgede CCG bazlarından oluşan zincir, özellikle kinetokor fonksiyonu için önemli bir bölgedir [77]. Antimitotik maddelerle yapılan bir çalışmada, hücrelerin mikrotübülleri oluşturmama nedeni ile kromozom sayısındaki artışlar ve hücrelerin endomitoz geçirmesi aynı zamanda mikronükleus oluşumuna neden olmuştur [79-81].

Sözü edilen bu mekanizmalar sonucu kutuplara çekilmeyip ortada kalan kromozom veya kromozom parçaları daha sonra çekirdek zarı ile çerçevelenip MİKRONÜKLEUS'u oluştururlar. Mikronükleus ölçülerine bakılarak kromozomların üzerinde ne tip değişiklikler olduğunu söylemek mümkündür. Örneğin; büyük mikronükleus oluşması, genel olarak kromozomları sentromerlerinden tutan ve kutuplara çeken mikrotübüllerin bozulmasına bağlıdır. Bu durumda mikronükleus bir bütün veya bir kaç kromozomdan oluşma olasılığı vardır. Küçük mikronükleusların oluşması ise genel olarak kromozomun yapısal bozukluğu ile ilgilidir [23, 80].

I. BÖLÜM: MIKRONÜKLEUS TESTİ İLE ÇEVRE KİRLETİCİLERİNİN MUTAJENİK ETKİLERİNİN Rana ridibunda KAN HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI

Çeşitli çalışmalarda, değişik hücrelerde olduğu gibi, değişik organizma çeşitlerinde de MN testi uygulanmaktadır. Örneğin; İnsan, kurbağa, balık, kuş eritrositleri, midye ve bitkilerin çeşitli hücrelerinde de çevre kirleticisi olan kimyasal ajanların genotoksik etkileri MN testi ile değerlendirilmiştir. Söz konusu çalışmalarda elde edilen bulgulara göre, çevre kirleticilerinin ortamda bulunması o ortamda yaşayan canlıların MN sayısı ile doğru orantılı olarak bulunmuştur [7, 9, 13, 15-19, 23, 50, 60].

I.1. Su Kirliliğinin Tanımı

Yeryüzündeki sular güneşin sağladığı enerji ile sürekli bir döngü içinde bulunurlar. Bu döngüye “hidrolik çevrim” adı verilir. İnsanlar, yaşamsal ve ekonomik gereksinimleri için, suyu bu döngüden alır ve kullandıktan sonra tekrar aynı döngüye iade ederler. Bu süreçler arasında suya karışan maddeler, suların fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini değiştirerek, “su kirliliği” olarak adlandırılan olguyu ortaya çıkarırlar. Söz konusu özellik değişimleri, aynı zamanda sularda yaşayan çeşitli canlı varlıkları da etkiler. Böylece su kirlenmesi, sucul ekosistemlerin etkilenmesine, dengelerinin bozulmasına ve giderek doğadaki tüm suların sahip oldukları, kendi kendini temizleme kapasitesinin azalmasına veya yok olmasına neden olur [82].

Su kirliliği, evsel ve endüstriyel atıkların, su ortamlarına atılmaksızın boşaltılmaları, tarımda verimi artırma amacı ile kullanılan doğal ve yapay maddelerin su ortamına taşınmaları gibi sebeplerle gerçekleşir. Endüstri atık suları, ayrışmaz ya da güç ayrışabilir türden maddelerin yanı sıra toksik bileşenleri de içerdiklerinden, bu suların alıcı ortamlara boşaltılmalarının etkileri çok daha olumsuz ve kalıcıdır [82].

Tarımsal kirlenme, daha çok dağınık kaynak türünde olup pestisid olarak isimlendirilen ve her türlü zirai mücadele ilacını kapsayan maddelerle, ayrıca doğal ve yapay gübre kullanımından kaynaklanmaktadır [82].

Eskişehir'de çevre kirliliğine bakıldığında, kirliliğin büyük bölümünün devlet kuruluşları tarafından oluşturulduğu görülmektedir. Ülke ulaşım ağında birinci derecede önemli olan karayolları üzerinde yerleşen fabrikaların pek çok açıdan çevreye olumsuz etkileri olmaktadır. Yatırımları minimumda tutmak tek amaç olduğu için çevre kirliliğini önleyecek yatırımlardan kaçınılmaktadır [82].

I.2. Porsuk Suyu ve Önemli Kirleticileri

I.2.1. Porsuk çayı hakkında genel bilgiler

Porsuk çayı Kütahya şehrine 17 Km uzaklıkta bulunan Tokul köyünde, 1170 rakımlı Ahır Dağından doğmaktadır. Kaynaktaki debisi 1250 lt/sn dir. Kütahya şehrinin içme ve kullanma suyu bu çaydan temin edilmektedir. Yan derelerle beslenen Porsuk çayı Ağaç köydeki DSİ regülatörüne, gelince yaz aylarında Kütahya ovasının sulama ihtiyacı için 1200 lt/sn. su alınmaktadır. Geri kalan 500 lt/sn. su Porsuk yatağına verilmektedir. [83].

Kütahya şehri evsel ve sanayi atık sularını aldıktan sonra bazı yan kollarla da beslenerek Porsuk barajında toplanan su, buradan sulama mevsiminde Karaca şehirdeki DSİ regülatörüne gelmektedir. Burada Eskişehir'in içme ve kullanma suyu ile arazi sulama suyu ihtiyacını karşılamakta ve geri kalan 300 lt/sn. Porsuk yatağına verilmektedir. Şehir girişinde 100 lt/sn. debili Sarı su ile birleşen Porsuk suyu, Eskişehir'in evsel ve sanayi atık sularını alarak Alpu ve Beylikova ilçelerinden geçip 486 km yol kat ederek, 600 rakımlı Sazılar köyünde Sakarya nehri ile birleşmektedir [83].

1.2.2. Porsuk suyu kirliliği

Porsuk çayının, azot, tekstil, şeker fabrikaları atıklarından dolayı çok yoğun bir şekilde kirlenmiş olduğu bilinmektedir [84, 85]. Fakat bu çayın mutajenitesi hakkında hiç bir çalışma yapılmamıştır.

Eskişehir için büyük önem taşıyan Porsuk çayı iki bölümde incelenmektedir. Bu, kullanım amacına uygun kriterlerle karşılaştırılarak değerlendirme yapılmıştır. Birincisi, kaynağından Porsuk barajı gölüne kadar olan kısımdır ve Eskişehir'in içme ve kullanma suyu buradan sağlanmaktadır. İkinci bölüm ise Eskişehir'den sonraki akarsuyun atık özümseme kapasitesi olarak araştırılmıştır. Buna göre Porsuk çayı ancak Yunus Emre'den sonra kendi kendini temizlemeğe başlamakta olup Sakarya nehrine ulaştığında içinde halen bir miktar kirlilik bulunmaktadır [81,82].

Sonuçta biyokimyasal O_2 ihtiyacı (BOİ) yönünden değerlendirilerek sınıflandırıldığında Porsuk çayının görünümü şu şekildedir:

Porsuk çayını kirletici kaynaklar;

- 1-Kanalizasyon atıkları.
- 2-Kütahya ve Eskişehir Mezbahaları.
- 3-Kütahya ve Eskişehir Şeker Fabrikaları.
- 4-Kütahya Azot Fabrikası.
- 5-Sümerbank Basma fabrikası.
- 6-Havzadaki tarım alanlarıdır. Sulamadan dönen sularla organik maddeler, gübre kalıntıları, pestisitler ve herbisitler akarsuya karışmaktadır [81,82].

Bu kuruluşların yanı sıra bazı ufak kuruluşlar da bulunmaktadır. Örneğin; Seyitömer termik santrali, Kütahya porselen ve seramik fabrikası, Güral porselen fabrikaları, Tülomsaş fabrikası gibi.

I.2.3. Kirletici kuruluşlar ve aldıkları önlemler

I.2.3.1. Mezbahalar

Kütahya ve Eskişehir’de bulunan her iki mezbahada sıvı ve katı atıkları ile yıkama sularını şehir kanalizasyonuna ve oradan Porsuk suyuna vermektedir [82]. Bu işletmeler Porsuk suyunu kirleten önemli faktörler arasındadır. BOİ yükü yaklaşık 150 kg/gün olarak tespit edilmiştir [81,82].

I.2.3.2. Şeker fabrikaları

Kütahya şeker fabrikasının yıllık üretimi 35.000 ton şeker ve 12.000 ton küspe olup çeşitli işlemler sonucunda oluşan BOİ 630.000 kg/yıl, toplam azot 25.000 kg/yıl ve toplam fosfor 900 kg/ yıl olarak hesaplanmıştır [82]. Porsuk çayının ikinci bölümüne bakıldığında ise günlük toplam organik yükü 87581 kg'dır. Bunun % 93.3'ü Eskişehir şeker fabrikasından ve ispirto fabrikasından gelmektedir. Her iki şeker fabrikasının da atıkları doğrudan Porsuk çayına verilmektedir [82].

I.2.3.3. Sümerbank basma fabrikası

Sümerbank basma fabrikasının üretim kapasitesi 50.000-70.000 m/gün'dür. Yakıt olarak kalorisi düşük, kükürt oranı yüksek Seyitömer kömürleri kullanılmaktadır. Baca emilsiyonlarını kontrol için multi siklon toz tutucuları kullanılmaktadır [83]. Sümerbank fabrikasının ürünlerini Porsuk çayına boşaltması, söz konusu tesisin akarsuyu kirlettiği görsel olarak da kanıtlanmış ve halk arasında yaygın bir görüş kazanmıştır. Bu görüşe göre halk "Porsuk çayının rengine bakarak, bugün Sümerbankın ne renk boya kullandığı anlaşılır" demektedir [82].

Eskişehir girişinden itibaren kirletici kaynaklara bakıldığında ilk önce Eskişehir basma fabrikası gelmektedir. Porsuk çayına pH 10-12 arasında renkli atıklar veren bu

fabrikanın ortalama günlük debisi $55 \text{ lt/sn} = 3.500 \text{ ton/gün}$ [83]. Günde 1.600 Kg HCl atılmasından dolayı suyun rengi değişmektedir. Bu rengi gidermek amacıyla, 1.300 Kg sodyum hipoklorid kullanılmaktadır. Sular karıştırıcıdan sonra $6 \times 250 \text{ m}^3$ kapasitedeki çökeltme havuzlarına gider. Çökeltme havuzlarından sonra Porsuk ayına verilir.

I.2.3.4. Kütahya azot fabrikası

Bu fabrika iki türlü sanayi atığı bırakmaktadır. Kömürden elde edilen su gazından artan curuflu sıvı atıkları, bu atık DSI'nin yaptığı depolama barajında tutulmaktadır. İkinci tür atık, azotlu atıklardır. Yüksek oranda azot bulunduran bu atık madde hiç arıtılmadan doğrudan Porsuk ayına verilmektedir. Bir günde ortalama 6454 Kg dökülerek Porsuk ayı kimyasal yönden yoğun bir şekilde kirletilmektedir. Bu fabrikanın atık sularındaki en önemli kirletici unsurlar nitrat, nitrit, amonyak azotu, organik maddeler ve askıdaki partiküllerdir. Ortalama atık su debisi 220 lt/sn dir [83].

I.3. Su Kirliliğinin İnsan ve çevresine Etkileri

Porsuk ayının üzerinde kurulan fabrikaların atıklarını ele aldığımız zaman önemli kirleticiler olarak karşımıza krom, fosfor, azot ve bileşenleri, amonyum, nitrat ve nitrit çıkmaktadır.

I.3.1 Kirleticilerin atıklarında bulunan moleküller ve toksisiteleri

I.3.1.1. Krom (Cr)

Endüstride kroma maruz kalma en çok kromla elektroliz tekniği ile kaplamada olur. Endüstride başlıca absorbsiyon inhalasyon yoluyla olmaktadır. Suda znenleri deri ile absorba olabilir. Kromun Plasentadan geçerek fetüste konsantre olduğu gösterilmiştir. Krom deri, akciğer ve kas dokusunda biriktiği gibi. RES (Retiklo

Endotelial Sistem), karaciğer, dalak, testis ve kemik iliğinin kromite karşı affinitesi olduğu bilinmektedir. Kromatların ise daha çok kırmızı kan hücrelerine (Eritrosit) bağlandığı gözlenmiştir. Endüstride kronik kroma maruz kalma ile akciğer kanserleri sıklığının normale göre 14 kere ve zenci işçilerde ise 80 kere fazla olduğu gösterilmiştir [86].

I.3.1.2. Fosfor (P)

Çok toksik olan sarı fosfor oral olarak organizmaya girdiğinde gastrointestinal irritasyona yol açar. Bulantı, kusma (ekseri kanlı), dermansızlık, diyare ve kramp görülür. Fosfor buharlarına kronik şekilde maruz kalma sonucu çenede nitroz görülür. Hastalık, kibrit işçilerinde %3 oranında görülür. Ender olarak öldürücüdür fakat görünüşte çok kötü etkiler bırakır [87].

I.3.1.3. Azot ve azotun bileşenleri

Son 20 yıldan beri yüksek düzeyde nitrat yada nitrit tüketiminin insan ve hayvanlar açısından tehlike oluşturduğu ve bu tehlikenin insanlarda ağır hastalıklardan ölüme kadar vardığı, hayvancılıkta ise verim düşüklüğü ve ölüm yoluyla ekonomik zararlara yol açtığı sürekli vurgulanmaktadır. Bunun yanı sıra yüksek dozda gübre kullanımı; Avrupa topluluğu ülkelerinde nitrat tüketiminin insan ve hayvanlarda oluşturduğu rahatsızlıklar hakkında yoğun bir tartışmaya yol açmıştır. Bu tartışmalarda nitritin nitrata parçalanması ve sağlığa olan zararları ön planda tutulmaktadır [88].

Normal olarak nitrat çok yüksek dozajlarda toksik bir etki meydana getirirken ($LD_{50} = 8-15$ gr) nitrit çok düşük dozajlarda toksik olabilmektedir. WHO ve FAO'nun verilerine göre günlük 219 mg nitrit 60 Kg ağırlığındaki bir insan için tolere edilebilir olarak görülmektedir. Yüksek dozda nitrat tüketiminin tiroid bezini olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. Nitritin kana geçmesi durumunda hemoglobin ile reaksiyona girerek metahemoglobin oluşmakta bu da O_2 taşınmasını engellemektedir [88].

II. BÖLÜM : MİKRONÜKLEUS TESTİ ile 2, 4, 5 TRİFENİL İMİDAZOL'ÜN GENOTOKSİSİTESİNİN Wistar RAT KEMİK İLİĞİNDE ARAŞTIRILMASI

II.1. Kemik İliği

Kemik iliği organizmanın büyük dokularından biri olup normal şartlarda kan hücrelerinin üretilmesini organizmanın fonksiyonlarına uygun olarak düzenler. Bu organ vücudun gereksinim duyduğu kadar hücreyi kısa sürede üretebilir. Gerektiğinde kapasitesini bir kaç kat arttırarak aktivitesini hızlandırabilir. Kemik iliği uzun kemiklerin ortasında, yassı kemiklerin ise ağsı boşluklarında bulunan yumuşak ve çok sayıda hücre içeren bir dokudur. Görünüşüne göre iki tip kemik iliğinden söz edilebilir [89].

A) Kan hücreleri ve bunları yapan kök hücreleri bakımından zengin olan kırmızı kemik iliği,

B) Yağ hücreleri bakımından zengin olan sarı kemik iliğidir [89].

Kan hücrelerinin öncülleri, yağ hücreleri, makrofajlar, retiküler hücreler ve retiküler fibriller bulunur ve bunların oranları yaş ve hastalık etkenlerinde değişiklik gösterir. Kemik iliğinde kendi kendine bölünme ve farklılaşabilme özelliğine sahip kök hücreleri bulunur [89, 90].

II.1.1. Eritrositlerin olgunlaşması (Eritropoezis)

Eritrositlerin olgunlaşması esnasında çok sayıda önemli değişiklikler olur. Hücrelerin hacmi küçülür, çekirdekçik azalarak ışık mikroskop düzeyinde görülmeyecek küçüklüğe ulaşır. Çekirdeğin kromatin materyali yoğunlaşarak çapı küçülür ve piknotik (yoğun) şekli alır. Sonunda çekirdek hücreden koparak ayrılır. Sitoplazmada poliribozomların sayısı (bazofili) azalırken, hemoglobin miktarı artmaktadır (asidofili). Mitokondriler ise kademeli olarak kaybolurlar. Olgun eritrositler ile proeritroblast arasında aralıklı olarak 3-5 hücre bölünmesi geçirilir. Belirlenebilen ilk seri hücreden, kana verilen retikülosit aşamasına kadar yaklaşık 7 gün geçer. Eritrositlerin yapımında

eritropoetin hormonu ile demir, folik asid, ve vitamin B₁₂ gibi maddelere gereksinim vardır [89].

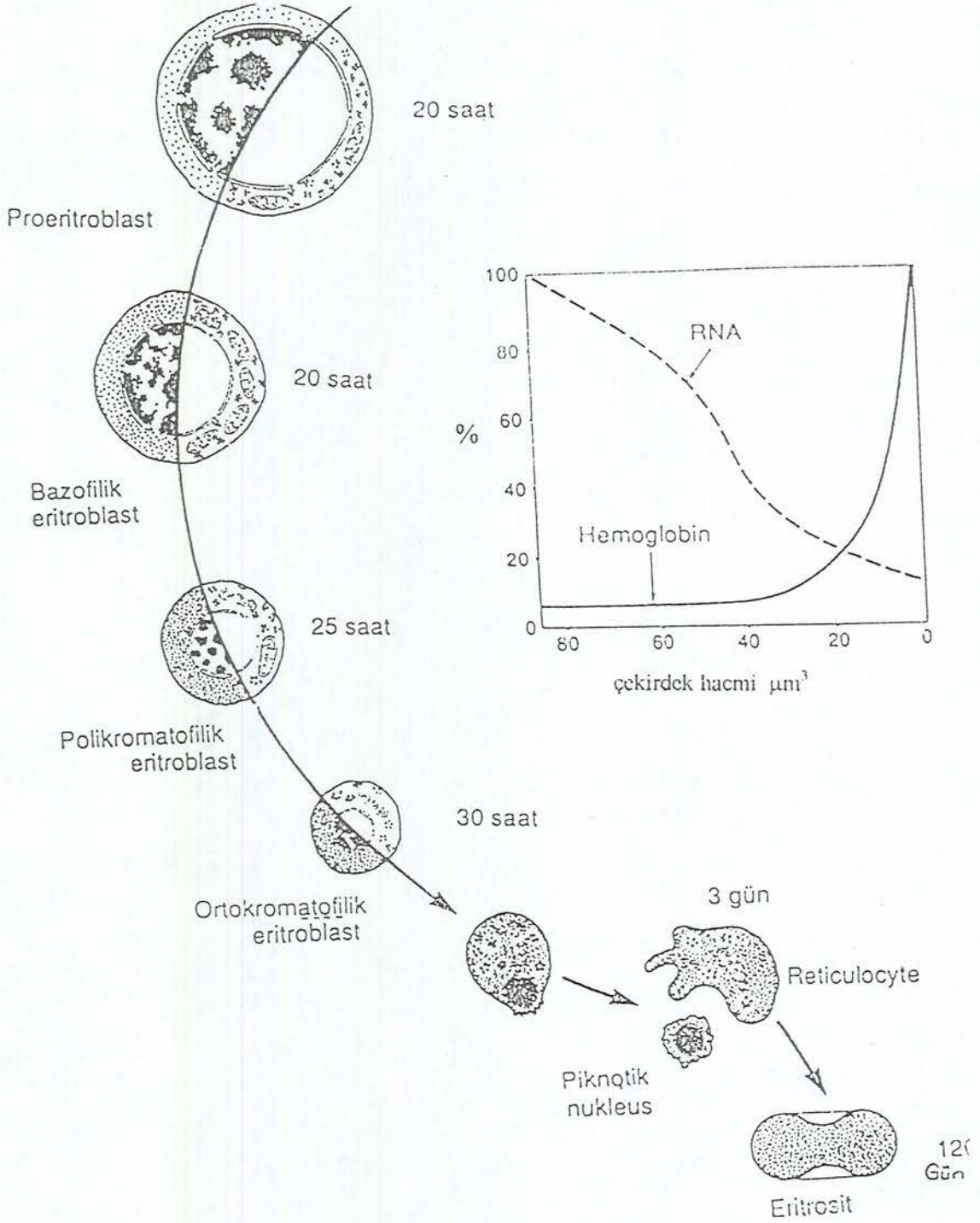
Bir eritrositin olgunlaşması sırasında geçirdiği farklılaşma safhaları şekil 1’de şematize edildiği gibidir. Farklılaşma ve olgunlaşma aşamalarında ilk belirlenen hücre proeritroblasttır. Eritrosit serisinin bu en genç hücresi için bazen proeritroblast veya megaloblast deyimleri de kullanılır. Proeritroblast, sırasıyla polikromatofilik eritroblast, ortokromatofilik eritroblast (normoblast veya normokromatofilik eritroblast), retikülosit ve eritrosit aşamalarından geçerek olgun hale gelir (şekil 1.1).[89].

II.1.1.1 Proeritroblast

Yalnız kemik iliğinde bulunurlar bu hücreler, gerek çapları, gerekse boyanma özellikleri bakımından beyaz serinin ana hücreleri ile büyük benzerlik gösterirler. Söz konusu hücreler myeloblasttan biraz daha büyüktür [89, 91-93].

II.1.1.2. Polikromatofilik eritroblast

Gelişmenin bir sonraki aşamasında poliribozom sayısı azalma göstererek sitoplazma hemoglobin ile dolmaya başlar. Bu nedenle boyanmış preparatlarda sitoplazma hem asidik hemde bazik boyanma özelliği gösterir. Bu çok renkli boyanma nedeniyle farklılaşan hücreye polikromatofil eritroblast adı verilir [89, 91, 92].



Şekil 2.1. İnsan kemik iliğinde eritrosit olgunlaşmasının şematik olarak gösterilmesi. Grafik, eritrositlerin olgunlaşması sırasında çekirdeğin hacminin küçülmesine paralel olarak hemoglobin ve RNA miktarlarında meydana gelen değişimleri göstermektedir (Juqueira et al., 1993)

II.1.1.3. Ortokromatofil eritroblast

Hücrelerin farklılaşması esnasında çekirdeğin yoğunluğu gittikçe artar ve sitoplazma bazofilik özelliğini kaybederek asidofil hale gelir. Bu aşamadaki hücelere de ortokromatofil eritroblast denilir [89, 91, 92].

II.1.1.4. Retikülosit

Sonunda çekirdek ince bir sitoplazma zarı ile sarılı olarak hücreden atılır. Çekirdeksiz kalan hücrede hala bir miktar poliribozom bulunur. Bu hücreler bryllant cresyl blue (parlak krezil mavisi) gibi bazik boya ile supravital olarak boyandıklarında ribozomlar bir ağ şeklinde kümelenme gösterir. O nedenle bu hücelere retikülosit adı verilir [89].

II.1.1.5. Eritrosit

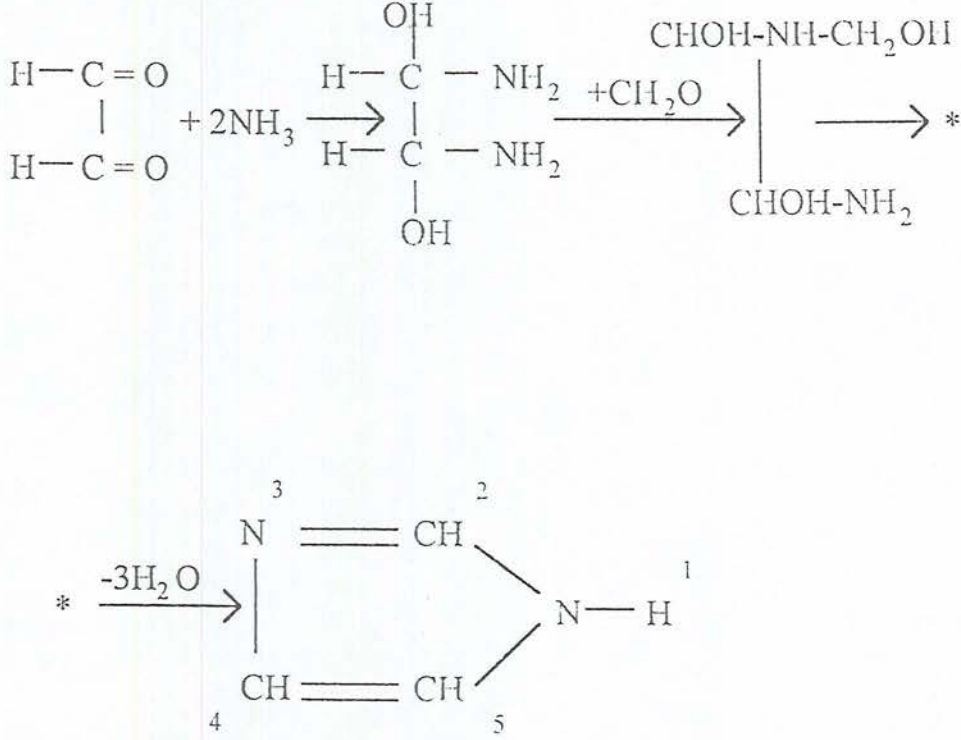
Kısa bir süre sonra poliripozom yapılarını kaybederek olgun kırmızı kan hücesine (eritrosit) dönüşürler [89].

II.2. İmidazollerin Yapı ve Aktiviteleri

II.2.1. Kimyasal yapı

İmidazol, e.n. 90 °C, k.n. 256 °C olan bir bileşiktir. Glioksal, formaldehit ve amonyaktan elde edilir (şekil 2.2). Bu reaksiyonda glioksal yerine disüstitüe türevlerinin yerine de başka bir aldehidin kullanılması ile çeşitli imidazol türevleri elde edilir. Yani α -dikarbonil bileşiklerinin amonyak ve bir aldehit ile muamelesi, imidazol türevlerinin elde edilmeleri için bir metodtur [94]. Bunları nispeten suda erimezler fakat

kloroform, polietilen glikol ve polietiloksilat, kastor yağı gibi organik çözücülerde eriyebilirler [86].



Şekil 2.2. İmidazol'un sentez basamakları

İmidazollerin kolaylıkla klorlandırılması, bromlandırılması ve iyonlandırılması mümkündür. İmidazoller zayıf asitler olarak hareket ederek NaNH_2 , KNH_2 ya da RMgBr ile halka NH ında deprotonasyona uğrayarak metal tuzları oluşturabilirler ve içerdikleri anyon elektrophil reaktiflerle kolaylıkla reaksiyon verebilirler [95].

II.2.2. Biyolojik ve farmakolojik özellikleri

İmidazol yapısına vitaminlerde, hormonlarda ve nükleik asit yapısına giren bazlarda doğal olarak rastlandığı gibi çoğu bitkilerde alkaloit yapısına girerek bitkiyi olumsuz koşullara karşı korumayı da sağlamaktadır [96]. Önemli bir imidazol türevi, hayat için

gerekli bir amino asit olan histidindir ve yapısı B-4-imidazolilinin'dir. Bunun dekarboksilasyonu ile 3-imidazoletamin yani vucuttaki çeşitli dokularda ve organlarda bulunan histamin oluşur. Biri etil grubunun ucunda ve diğeri imidazol halkası içinde olmak üzere iki amin grubu içerir. Histamin doğal olarak meydana gelen ve kuvvetli farmakolojik etkiye sahip amin yapısında bir maddedir. Çeşitli hayvan ve bitki türleri histamin sentez etme özelliğine sahiptirler. Histaminin fizyolojik olaylar ile allerji gibi patolojik olaylarda rol oynadığı gösterilmiştir. Hazım yolu ile alınmayıp vücuda enjekte edildiğinde son derece zehirlidir. Bundan dolayı vücutta proteinlerle beraber kombine halde olması gerekir [94, 97].

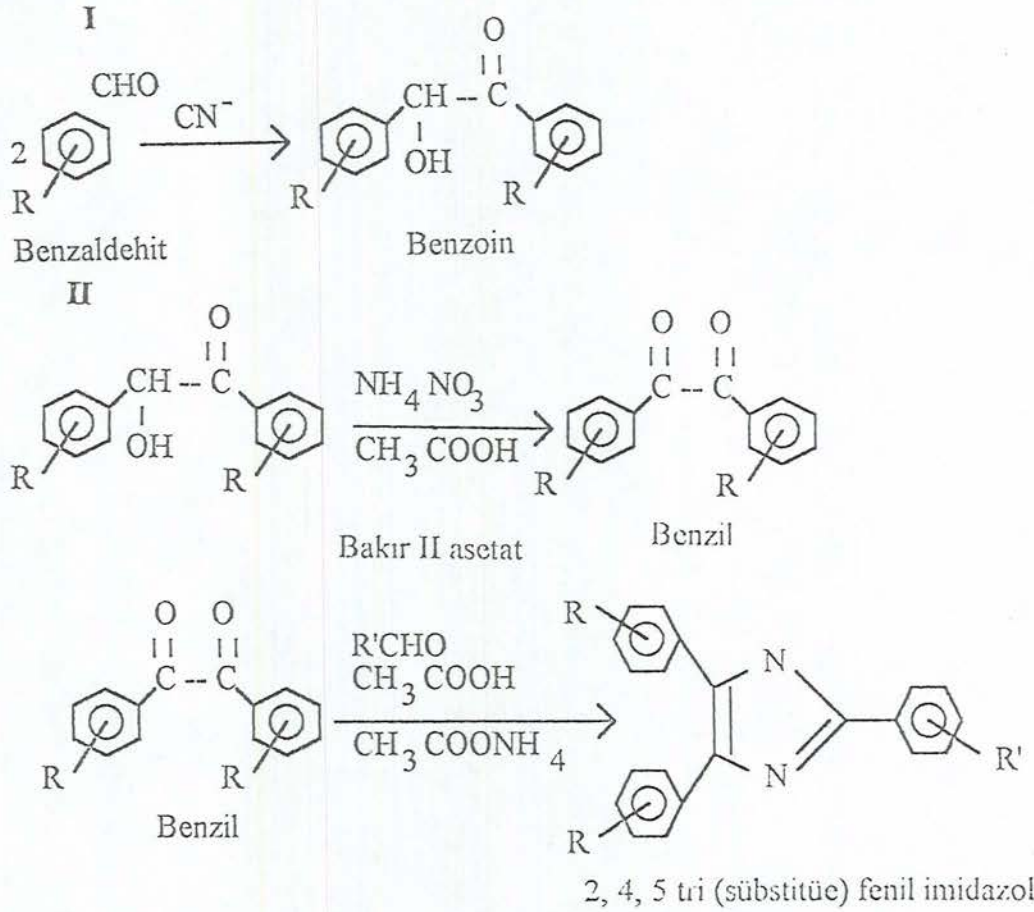
İmidazoller geniş spektrumlu fungistatik ilaçlardır. Antihelmantik olarak (ayrıca bazı bakterilere ve protozoalara karşı da) uzun yıllar kullanılmış; ama antifungal etkilerinin saptanması yaklaşık yirmibeş yıl almıştır . Cilt ve mukozaların mantar enfeksiyonlarında diğer ilaçlara göre üstünlük gösterirler. İmidazol türevi antifungal ilaçlar mantar hücrelerinin stoplazma membranında ana sterol bileşiği olan ergasterolun sentezini, 14-metillanosterolun desmetildihidrol-anosterola dönüşümü basamağında inhibe eder. Bu dönüşümü yapan 14 alfa-demetilase enzimi mikrozomal P-450 sitokromuna bağımlıdır. İmidazol türevi ilaçlar P-450 sitokromunu selektif olarak inhibe eder. Mantarların P-450 sitokromu bu ilaçlara memelilerin aynı enzimle kıyasla en az 1000 kez daha duyarlıdır. Adı geçen ilaçlar belirtilen etkileri sonucu mantar hücre membranının permeabilitesini bozarlar.

İmidazol türevi antifungal ilaçlardan klotrimazol, izokonazol, ekonazol, tiokonazol, ve bifonazol ile halen deneme döneminde bulunan terkonazol, sadece lokal uygulanır. Ketokonazol ise ağızdan uygulanan tek imidazol'dur [97, 98]. Tıpta göz damlası olarak kullanılan Naphazoline, Vicine; sinüzit tedavisinde kullanılan Tuamine; adrenarjik olarak kullanılan Tramazolin de birer imidazol türevidirler [99].

II.2.3. 2, 4, 5 Trifenil İmidazol'un Özellikleri ve sentezi.

Bu çalışmada mutajenik etkisi *in vivo* olarak araştırılmış olan imidazol türevi Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Bölümünde Işıkdag ve Uçucu tarafından, imidazol yapısına (2,4 ve 5 nolu konumlarına) fenil grupları yerleştirilerek sentez edilmiştir. Şekil 2.3'te I, II ve III basamaklar halinde verilmiştir. Bu bileşiğin fiziko kimyasal parametreleri ile spektral analizleri de ayrıca yapılmıştır [100].

2, 4, 5, Trifenil imidazol ve türevlerinin sentezinde aldehit türevlerinden benzoin kondensasyon ile benzoin türevlerine, bu bileşiklerin oksitlenmesi ile benzin türevlerine geçilmiştir. Son ürün olarak imidazol yapısını oluşturmak üzere benzil ve aldehit türevleri amonyum asetat ile reaksiyona sokulmuştur [100].



Şekil 2.3. 2, 4, 5, trifenil imidazol'un sentez basamakları

I. ve II. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, bir mitoz anomalisi olan mikronükleus oluşumu, çevre kirliliğine neden olan faktörlerin yada ilaç hammaddesi olarak sentezlenmiş bir kimyasal maddenin genotoksik etkisinin bir indikatörü olarak kullanılmıştır.

Mutajenite testleri içinde, en hızlı ve net sonuçları yüksek organizmaların hücrelerinin incelenmesi sonucunda verebilen bir test olan MN oluşumu, bize yukarıda sözü edilen faktörlerin mutajenite etkileri hakkında yeterli bilgileri verecektir.

3. MATERYAL ve METOD

1. BÖLÜM: KURBAĞA KANINDA MN TESTİ

1.1. Kurbağaların toplanması

Kurbağalar 29-7-1996, 09-8-1996 tarihleri arasında, Porsuk çayının farklı 4 bölgesinden toplanmıştır. Birinci bölge, en az kirlenmiş ve sanayiden uzak olan, Gelin kayası köyüne 1 Km uzaklıktaki bölge olup kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. İkinci bölge, Kütahya azot fabrikasının, üçüncü bölge Sümerbank basma fabrikasının ve dördüncü bölge ise Eskişehir şeker fabrikasının bulunduğu yerlerdir (Şekil 3.2). Sözü edilen bütün fabrikaların atıkları arıtılmadan Porsuk çayına atılmaktadır [82, 83]. Son olarak A.Ü. kampüsünde bulunan havuzlarda yaşayan kurbağalar ikinci kontrol grubu olarak toplanmıştır.

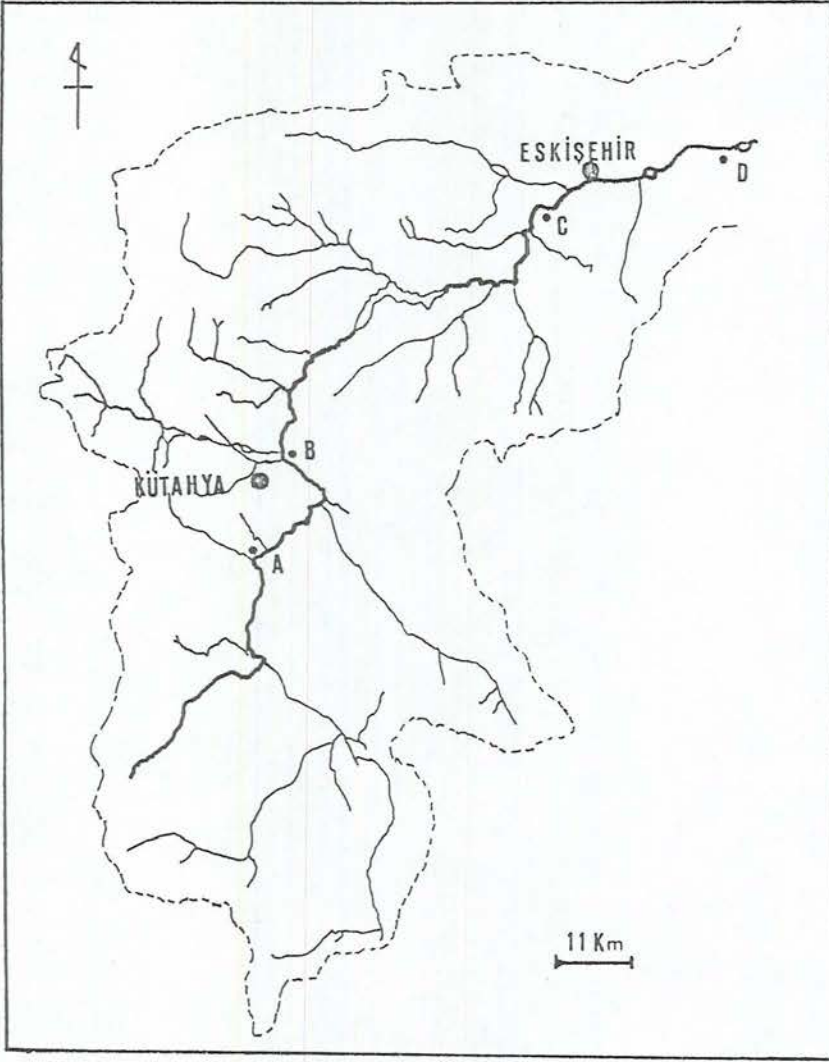
Her bölgeden yaklaşık 10 tane kurbağa toplanmıştır. Laboratuvara canlı olarak getirilen hayvanlar en geç 24 saat sonra disseksiyon işlemine tabi tutulmuşlardır.

1.2. Hayvanlardan kan alınması

Kurbağaların periferik kanını toplamak amacıyla kafaları kesilmiş ve steril injektörler ile kan alınmıştır. Heparin (Roche) içeren tüplerde toplanan periferik kan ya hemen preparasyon işlemine tabi tutulmuştur, yada daha sonra preparat hazırlanması için +4°C saklanmıştır.

1.2.1. Kan preparatlarının hazırlanması

Toplanan periferik kan lam üzerine alınıp froti yöntemi ile yayıldıktan sonra havada 2-3 saat kurutmaya bırakılmıştır. Boyama işlemi Clark'a göre yapılmıştır. Buna göre havada kuruyan preparatlar (-20°C) %96 metanolde 1-2 dakika fikse edilmiştir.



Şekil 3.1: Porsuk çayı ve incelenen örneklerin alındığı noktalar

- A) Gelin kayası
- B) Azot fabrikası
- C) Sümerbank tekstil fabrikası
- D) Şeker fabrikası

Fikse edilen preparatlar May-Grünwald (Sigma) boyası içine alınıp, 1-3 dk. bekletildikten sonra, boyanın yarısı alınarak preparatların üzerine eşit miktarda distile su eklenmiştir. 1-2 dakika sonra, Giemsa (Merck) boyası içinde 8-10 dakika kadar bekletilmiştir [101].

Preparatlar musluk suyu ile yıkanıp havada iyice kurutulduktan sonra entellan ile kapatılarak incelenmeye hazır daimi preparat haline getirilmiştir. Her hayvandan iki preparat hazırladıktan sonra, her iki preparattan toplam 2000 eritrosit hücresi sayılmıştır [23].

II. BÖLÜM : RAT KEMİK İLİĞİNDE MN TESTİ

II.1. Kullanılan Hayvanlar

Çalışmamızda, deney hayvanı olarak, laboratuvar koşullarına iyi uyum sağlaması, kısa sürede fazla nesil vermesi, üretiminin ucuz ve kolay olması, uygulanan kimyasal maddelere karşı kolaylıkla reaksiyon vermesi nedeni ile rat kullanılmıştır. Bu ratlar, *wistar* cinsi olup, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim dalı'ndan temin edilmiştir. Deney hayvanları, Eskişehir yem sanayinin ürettiği yemlerle beslenmiştir.

Deneylelerimizde üç aylık ve ortalama ağırlığı birbirine yakın 250-300gr olan 21 adet rat kullanılmıştır. Deneye alınan dişi ve erkek hayvanların çiftleşmesini engellemek amacı ile ayrı kafeslere alınmışlardır.

II.2. Kullanılan madde

İlaç hammaddesi olarak kullanılan 2, 4, 5 *trifenil* imidazol, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik bölümünde Işıkdag tarafından sentezlenerek bize verilmiştir. Bu madde *DMSO* (Dimetilsülfoksit) içinde çözülerek çeşitli konsantrasyonlarda kullanılmıştır. 2, 4, 5 *trifenil* imidazol'un verilen dozlardaki (1, 2, 4, 6

ve 8 mg) etkisinin yanısıra, *DMSO*'in de etkisinin olup olmadığını anlamak için kontrol grubu hayvanlara sadece paralel konsantrasyonlarda *DMSO* verilmiştir.

II.2.1. Deney hayvanlarına 2, 4, 5 Trifenil İmidazol'un uygulanması

Farmakoloji Anabilim dalı'nda fare için saptanan antibiyotikler dozuna (4 mg/ kg) uyularak 1, 2, 4, 6 ve 8 mg dozları *DMSO*'da çözünüp, serum fizyolojik ilavesi ile 0.5 ml olacak şekilde hayvanlara intraperitoneal enjeksiyonla [21] her gün bir defa olmak üzere 7 gün verilmiştir. 8. gün ise hayvanlar kalplerine enjeksiyon iğnesi ile hava verilmek sureti ile öldürülmüşlerdir. Çalışmamızda kullanılan 21 hayvanın, 10'u deney 11'i kontrol grubu olarak seçilerek 6 gruba ayrılmıştır.

II.2.2. Kemik iliği preparatlarının hazırlanması

Femuru saran kas tabakası bistüri ucu ile kemikten ayrılarak femur ortaya çıkarılmıştır. Femur kemiğinin ekleme yakın kısmı keskin bir makas yardımıyla kesilmiş ve kemik içinden transfer iğnesi yardımıyla femoral kemik iliği incelenmek üzere alınmıştır [59].

Deney hayvanlarından alınan kemik iliği 0.5ml. RPM 1640 medyumunu (Sigma) içine alınıp önce 1000 devir/ dakika'da 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernetant atılıp yerine 0.5ml. (fosfat buffer saline) PBS (137 mM NaCL, 2.7 mM KCL, 1.5 mM KH_2PO_4 , 8 mM Na_2HPO_4 , pH 7.3) [102] ilave edilerek ikinci kez 1000 devir/ dakika'da 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernetant tekrar atılıp yerine (3:1) absolü metanol : glasiyal asetik asit karışımından 0.5ml. ilave edilerek santrifüj tekrarlanmıştır. Süpernetant atılıp yerine absolü metanol : glasiyal asetik asit karışımından (3:1) tekrar ilave edilerek myeloid doku örneğinin fiksasyonu sağlanmıştır [75]. İçinde fikse edilen örneğin bulunduğu tüp çalkalanarak bir damla alınan myeloid doku temiz bir lam üzerine froti edilmiştir.

Havada 20-30 dakika kurutulan preparatlar May-Grünwald (Sigma) ile 3-5 dakika süre ile boyanmıştır. Boyanan örneklerdeki boyanın yarısı alınıp kalan yarısına distile su ilave edilerek 1-2 dakika daha boyanması sağlanmıştır. May-Grünwald ile boyamanın ardından distile su ile yıkanan örnekler, Giemsa ile 5-10 dakika süre ile boyanmıştır [101]. Preparatlar musluk suyu ile yıkanıp havada iyice kurutulduktan sonra entellan ile kapatılarak incelenmeye hazır daimi preparat haline getirilmiştir. Her hayvandan iki preparat hazırlanarak toplam 2000 Polikromatofilik, Normokromatofilik ve Polimorf hücresi sayılmıştır.

3.1. Mikroskopi ve Mikrofotografi

Yapılan preparatlar Olympus BX50 mikroskobu ile değişik büyütmelerde incelenerek Olympus PM-30 otomatik fotomikrografi ve Kodak film aracı ile fotoğrafları çekilmiştir.

3.2. İstatistiksel Değerlendirmeler

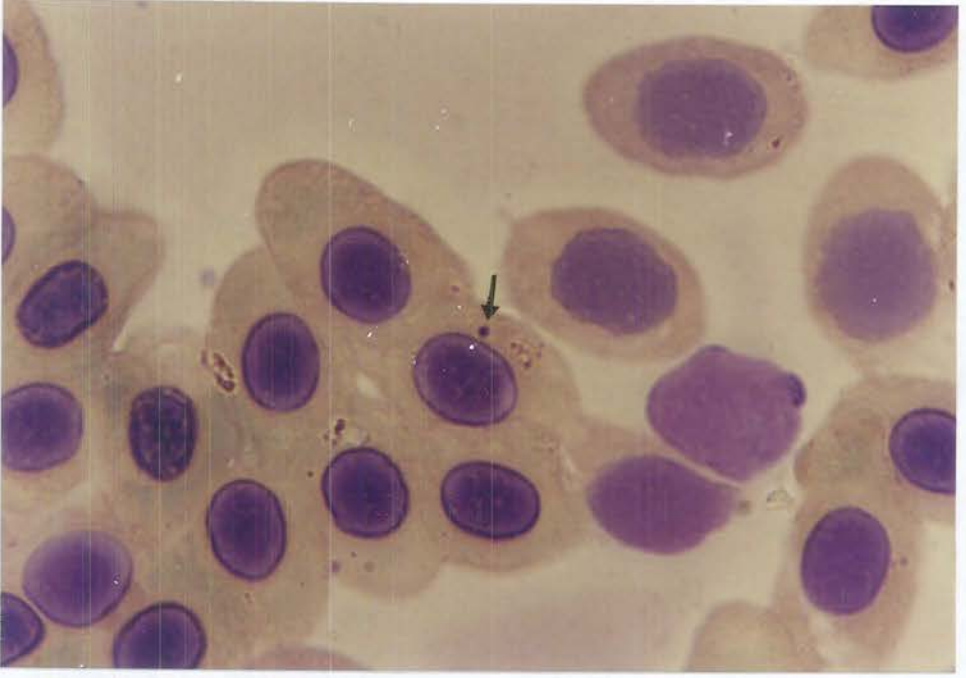
Bu çalışmada her hayvandan 2000 hücre sayılmış ve MN pozitif olanlar belirlenmiştir. Deney ve kontrol grupları arasında MN bakımından farklılığın olup olmadığının değerlendirilmesinde, farklı dozların ve bölgelerin karşılaştırılması için Student t-testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

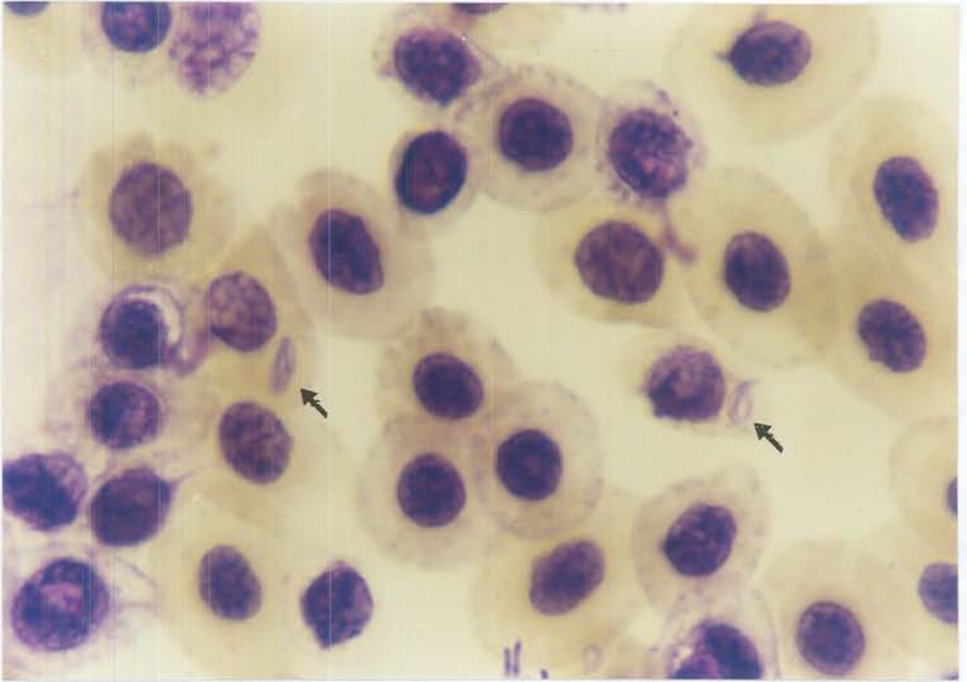
I. BÖLÜM: PORSUK ÇAYINDAN TOPLANAN *Rana ridibunda* ERİTROSİTLERİNDE MİKRONÜKLEUS OLUŞUMU

Porsuk çayı üzerindeki dört farklı bölge olan Gelin kayası köyü, azot fabrikası, sümerbank tekstil fabrikası ve şeker fabrikası yanından ve ayrıca Anadolu Üniversitesi kampüsündeki büyük havuzdan yakalanan kurbağalar çevre kirliliğinin mutajenik etkisinin araştırılması için incelenmiştir. Bunun için her bir kurbağadan iki adet kan preparatı hazırlanmıştır ve her bir preparattan 1000 hücre içindeki mikronükleuslar sayılmıştır. Ayrıca mikronükleuslar sayı ve şekillerine göre incelenerek fotoğrafları çekilmiştir. Çalışmamızda incelenen mikronükleuslar şekil ve sayılarına göre 3 grupta toplanmıştır. Birincisi A tipi olarak belirlediğimiz değişik büyüklükte, her bir eritrosit içinde bir tane yuvarlak olarak gözlenmiştir (Şekil 4.1). İkincisi B tipi olarak her bir eritrosit içinde bir tane olmak üzere şekilsiz yada çubuksu nüklear mareyal şeklinde gözlenmiştir (Şekil 4.2). Üçüncüsü ise C ve D olmak üzere bir eritrosit içinde birden fazla yuvarlak mikronükleuslar olarak gözlenmiştir (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4).

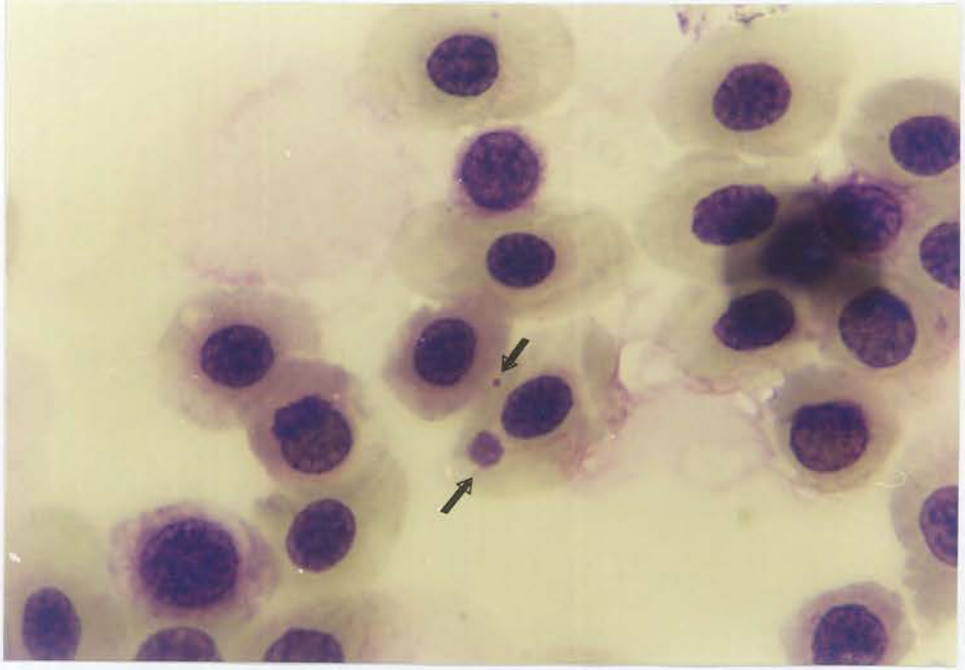
Kontrol olarak incelenen Gelin kayası köyünden alınan kurbağaların kan hücreleri şekil 4.5’da gösterilmektedir. Gelin kayası köyünden ve Anadolu Üniversitesi havuzundan alınan kurbağa kan preparatların incelenme sonuçları Çizelge 4.1 de verilmektedir. Gelin kayası köyü yakınlarından toplanan kurbağaların kanı incelenmesi sonucu toplam 12,000 hücreden 70 hücrenin mikronükleus taşıdığı tesbit edilmiştir. Bu mikronükleusların 52 tanesi A tipinde ve 18 tanesi B tipinde olduğu bulunmuştur. C ve D tipinde ise hiç mikronükleusa rastlanılmamıştır. İkinci kontrol olarak kabul edilen Anadolu Üniversitesi kampüsünden toplanan kurbağalarının kanı incelenmesi sonucu ise toplam 8.000 hücreden 64 hücrenin mikronükleus taşıdığı ve bunların 47 tanesinin A tipinde 17



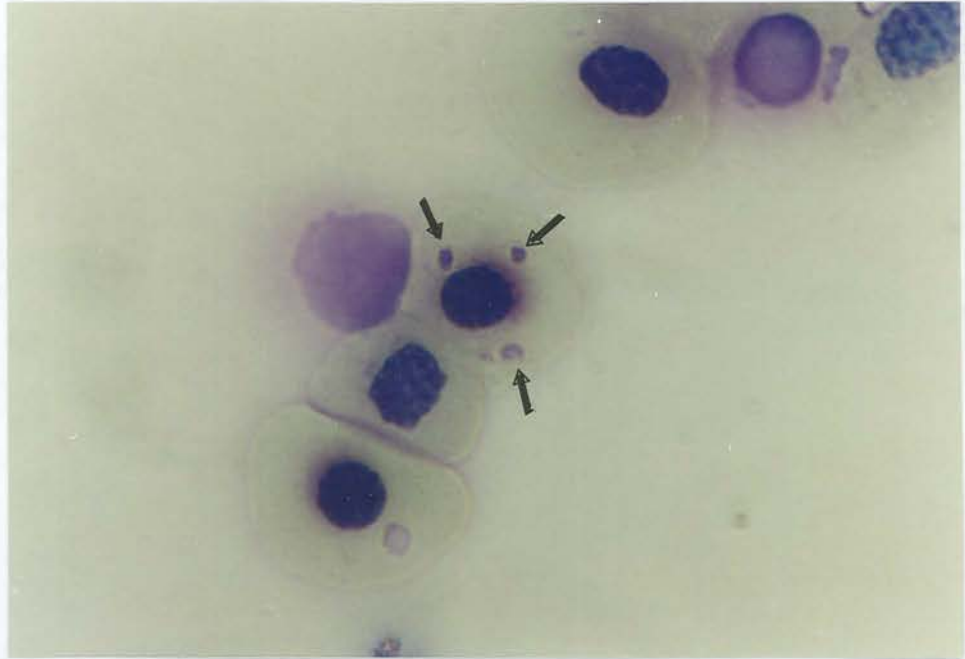
Şekil 4.1. Azot fabrikası civarında, Porsuk çayından yakalanan kurbağaların eritrositlerinde saptanan A tipindeki mikronükleusların görünümü (ok). X330.



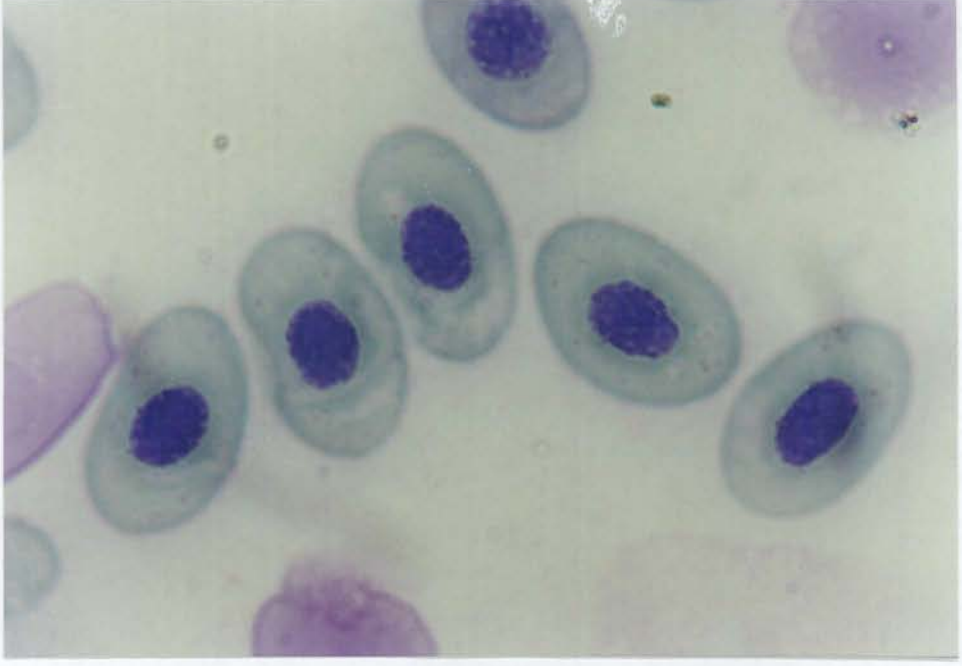
Şekil 4.2. Azot fabrikası civarında, Porsuk çayından yakalanan kurbağaların eritrositlerinde saptanan B tipindeki mikronükleusların görünümü (ok). X330.



Şekil 4.3. Sümerbank tekstil fabrikası civarında, Porsuk çayından yakalanan kurbağaların eritrositlerinde saptanan C tipindeki mikronükleusların görünümü (ok). X 330.



Şekil 4.4. Sümerbank tekstil fabrikası civarında, Porsuk çayından yakalanan kurbağaların eritrositlerinde saptanan D tipindeki mikronükleusların görünümü (ok). X330.



Şekil 4.5. Porsuk çayının Gelin kayası bölgesinden ve Anadolu Üniversitesi kampüsünün büyük havuzundan alınan ve kontrol olarak kabul edilen kurbağalarının eritrosit hücrelerinin görünümü. X 330.

tanisinin B tipinde olduğu bulunmuştur. C ve D tipinde ise yine hiç mikronükleusa rastlanılmamıştır (Çizelge 4.1).

Kütahya azot fabrikasının yanından toplanan 10 adet kurbağanın kan preparatlarının incelenmesi sonucu toplam 20.000 hücreden 967 hücrede mikronükleus bulunmuştur. Bunların 569 tanesi A tipinde, 392 tanesi B tipinde, 6 tanesi C tipinde olup D tipinde hiç mikronükleus bulunmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.2).

Porsuk çayı üzerindeki bir sonraki çalışma alanı olarak seçilen sümerbank fabrikası civarından toplanan kurbağaların eritrositlerinin incelenmesi sonucu toplam 20.000 hücreden 668 hücrenin mikronükleus taşıdığı tespit edilmiştir. Bu mikronükleusların 480 tanesi A tipinde, 167 tanesi B tipinde 12 tanesi C tipinde ve 9 tanesi D tipinde gözlenmiştir (Çizelge 4.3).

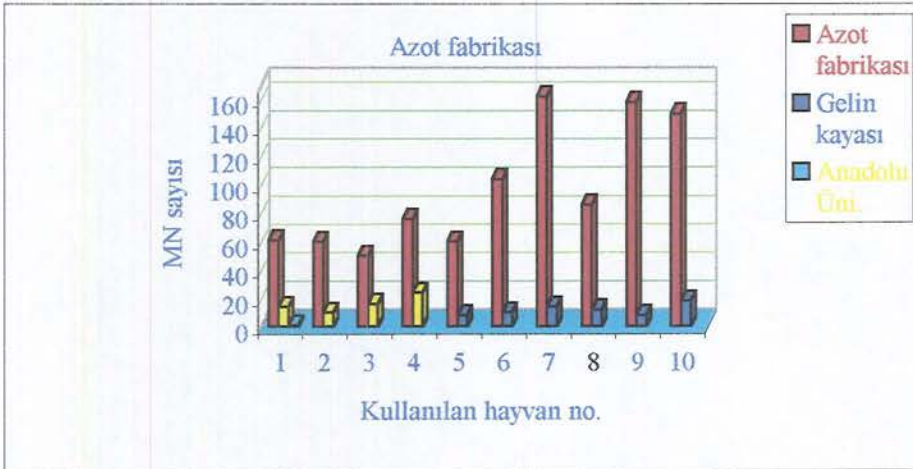
Son çalışma alanı olarak seçilen şeker fabrikası yanından toplanan kurbağaların eritrositlerinin incelenmesi sonucu toplam 20.000 hücreden 638 hücrenin mikronükleus taşıdığı tesbit edilmiştir. Bu mikronükleusların 398 tanesi A tipinde, 238 tanesi B tipinde, 2 tanesi C tipinde D tipinde ise hiç mikronükleus bulunmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.4).

Kan preparatları hazırlamadan önce, laboratuvara getirilen kurbağaların ağırlıkları ve boyları ölçülerek kayıt edilmiştir. Elde edilen mikronükleus sayılarının, ağırlık ve uzunluğuna paralel olarak artış gösterdiği bulunmuştur. Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da görüldüğü gibi bu fark kontrollere göre azot, sümerbank ve şeker fabrikasının bulunduğu bölgeden toplanan kurbağalarda daha belirgin olarak gözlenmiştir.

Bölüm 1

Çizelge 4.1 . Azot fabrikası civarında yakalanan kurbağaların ağırlıklarına göre MN çeşitleri ve oranı.

Ku.H. No.	Uzunluğu (cm)	Ağırlığı (gr)	MNE/ 2000Eri	MN Çeşitleri				MNE/ Eri. %
				A	B	C	D	
1	13,5	22,7	61	47	14	0	0	3,05
2	14	23,5	60	38	22	0	0	3
3	12,5	29,5	50	32	18	0	0	2,5
4	15,5	31	76	58	18	0	0	3,8
5	12	35,3	60	40	18	1x2	0	3
6	15	36,3	104	68	36	0	0	5,2
7	18	43,8	162	48	114	0	0	8,1
8	19	50,1	86	52	34	0	0	4,3
9	22	100,5	158	100	58	0	0	7,9
10	21	112,3	150	86	60	2x2	0	7,5



Şekil 4.6. Porsuk çayı kirleticilerinin birinci bölgesi olan azot fabrikası civarında yakalanan kurbağaların ve bunların kontrol gruplarının eritrosit hücrelerindeki MN sayısı. Kurbağalar çizelge 4.2'de verildiği gibi ağırlıklarına göre küçükten büyüğe göre sıralanmıştır.

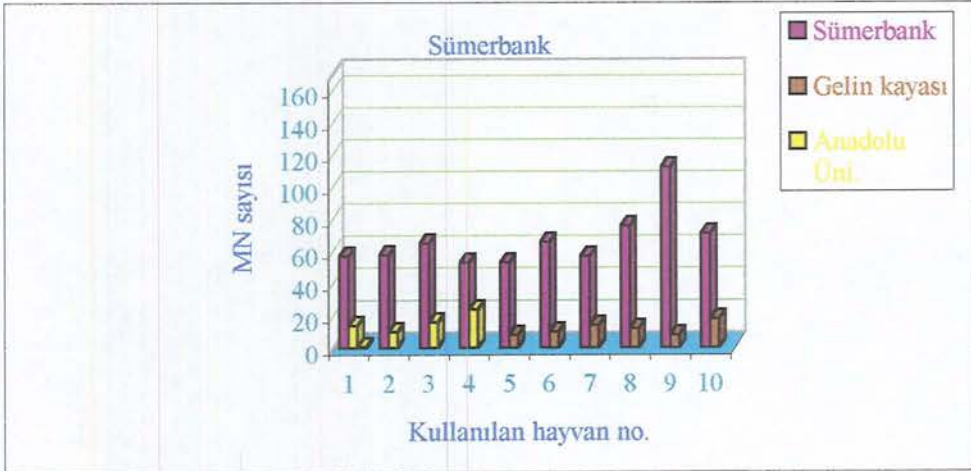
Çizelge 4.2. Sümerbank tekstil fabrikası civarında yakalanan kurbağaların ağırlıklarına göre MN çeşitleri ve oranı.

Ku.H. No.	Uzunluğu (cm)	Ağırlığı (gr)	MNE/ 2000 Eri.	MN Çeşitleri				MNE/ Eri.%
				A	B	C	D	
1	21	64	57	45	12	0	0	2,85
2	19	70,1	58	52	4	1x2	0	2,9
3	20	72,8	65	51	12	1x2	0	3,25
4	18	73,4	53	34	19	0	0	2,65
5	18	73,5	53	36	17	0	0	2,65
6	18,5	75,4	66	36	28	1x2	0	3,3
7	17	75,8	57	46	8	0	1x3	2,85
8	18	82,3	76	52	24	0	0	3,8
9	21,5	123	112	70	30	3x2	2x3	5,6
10	23,5	130,5	71	58	13	0	0	3,55

Eri. : Eritrosit.

MNE. : Mikronükleus taşıyan eritrosit hücreleri.

MN. : Mikronükleus.



Şekil 4.7. Porsuk çayı kirleticilerinin ikinci bölgesi olan sümerbank tekstil fabrikası civarında yakalanan kurbağaların ve bunların kontrol gruplarının eritrosit hücrelerindeki MN sayısı. Kurbağalar çizelge 4.3'de verildiği gibi ağırlıklarına göre küçükten büyüğe göre sıralanmıştır.

Çizelge 4.3. Gelin kayası köyü civarında ve Anadolu Üniversitesi kampüsünden kontrol grubu olarak yakalanan kurbağaların ağırlığına göre MN çeşitleri ve oranı.

Ku.H. No.	Uzunluğu (cm)	Ağırlığı (gr)	MNE/ 2000Eri.	MN Çeşitleri				MNE/ Eri. %
				A	B	C	D	
1	10,5	20	14	10	4	0	0	0,7*
2	10	20,5	10	6	4	0	0	0,5*
3	11,5	22,5	16	14	2	0	0	0,8*
4	12	23	24	17	8	0	0	1,2*
5	15	29,7	8	6	2	0	0	0,4**
6	13,4	30,3	10	10	0	0	0	0,5**
7	13	31,3	14	8	6	0	0	0,7**
8	15	35	12	12	0	0	0	0,6**
9	18	41,8	8	6	2	0	0	0,4**
10	19,2	45,6	18	10	8	0	0	0,9**

* : Anadolu Üniversitesi kampüsünün büyük havuzundan alınan kurbağalar.

** : Gelin kayası köyü civarından alınan kurbağalar.

Eri. : Eritrosit.

MNE : Mikronükleus taşıyan eritrositler.

Ku. H. : Kullanılan hayvan.

MN : Mikronükleus.

Çizelge 4.4. Şeker fabrikası civarında yakalanan kurbağaların ağırlığına göre MN çeşitleri ve oranı.

Ku.H. No.	Uzunluğu (cm)	Ağırlığı (gr)	MNE/ 2000 Eri.	MN Çeşitleri				MNE/ Eri.
				A	B	C	D	
1	12	20,6	48	40	6	1x2	0	2,4
2	13,1	23	52	36	16	0	0	2,6
3	14,3	27,2	50	34	16	0	0	2,5
4	13,5	32	62	44	18	0	0	3,1
5	15	33	76	32	44	0	0	3,35
6	18,5	40,3	60	36	24	0	0	3
7	16	43,2	68	44	24	0	0	3,4
8	17,5	45,8	62	42	20	0	0	3,1
9	18	55,7	60	26	34	0	0	3
10	20	105,3	100	64	36	0	0	5

KU. H : Kullanılan hayvan.

MNE : Mikronükleuslu eritrosit.

Eri. : Eritrosit.

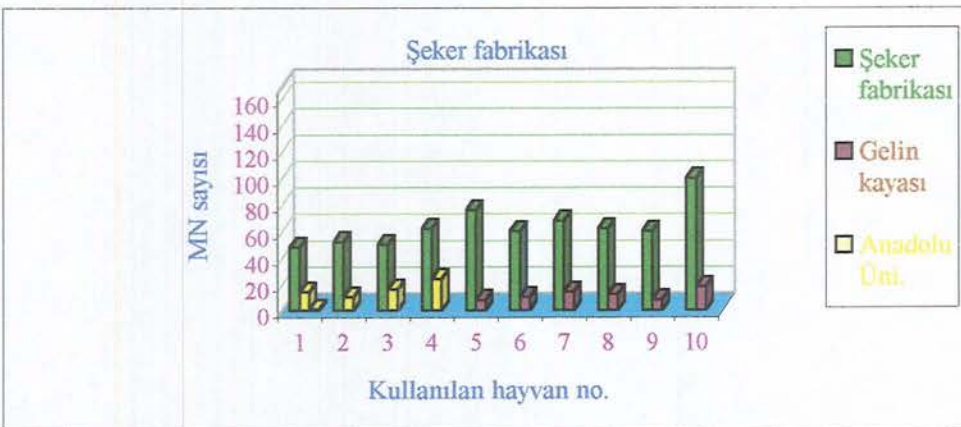
MN : Mikronükleus.

A : Tek yuvarlak MN.

B : Çubuk şeklindeki MN

C : İki tane MN

D : Üç tane MN



Şekil 4.8. Porsuk çayı kirleticilerinin üçüncü bölgesi olan şeker fabrikası civarından alınan kurbağaların ve bunların kontrol gruplarının eritrosit hücrelerindeki MN sayısı. Kurbağalar çizelge 4.4'te verildiği gibi ağırlıklarına göre küçükten büyüğe göre sıralanmıştır.

Çizelge 4.5 . Porsuk çayının değişik bölgelerinden toplanan kurbağaların eritrositlerinde taşıdıkları toplam MN sayısı ve yüzdeleri.

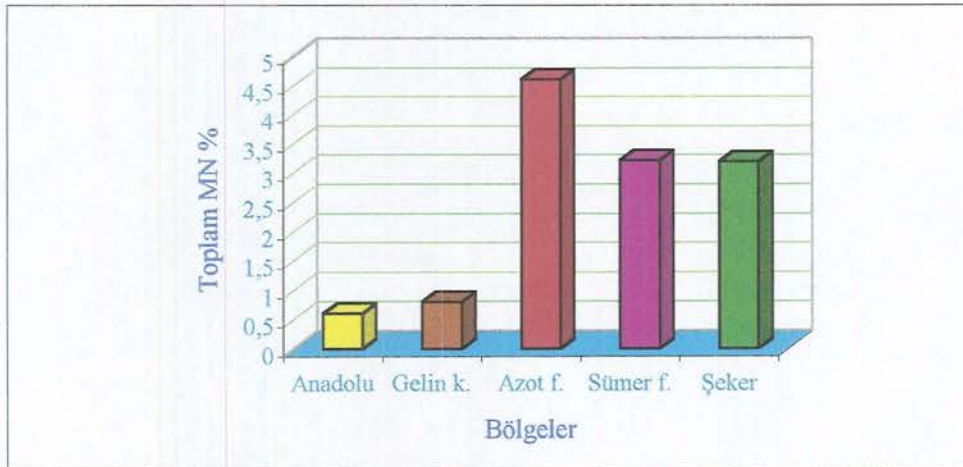
Bölge	Hayvan sayısı	Sayılan eri. sayısı	MNE/eri.	MNE/eri. %
Anadolu Üniversitesi kampüsü	6	12000	70	0,6
Gelin Kayası	4	8000	64	0,8
Azot fabrikası	10	20000	967	4,6*
Sümerbank tekstil fabrikası	10	20000	668	3,21**
Şeker fabrikası	10	20000	638	3,19**

Eri : Eritrosit.

** : $P < 0,05$

MNE : Mikronükleus taşıyan eritrositler * : $P < 0,01$

İstatistiksel hesaplamalar Student t- test ile yapılmıştır.



Şekil 4.13 . Porsuk çayı kirleticilerinin değişik bölgelerinden yakalanan kurbağaların ve bunların kontrol gruplarının eritrosit hücrelerinde sayılan MN oranları.

- Anadolu Üniversitesi kampüsü büyük havuzundan alınan kurbağalar.
- Gelin kayası köyü yakınlarından alınan kurbağalar.
- Azot fabrikası civarından alınan kurbağalar.
- Sümerbank tekstil fabrikası civarından alınan kurbağalar.
- Şeker fabrikası civarından alınan kurbağalar.

II. BÖLÜM : İMİDAZOL'A MARUZ KALAN RAT KEMİK İLİĞİ HÜCRELERİNDE MİKRONÜKLEUS OLUŞUMU

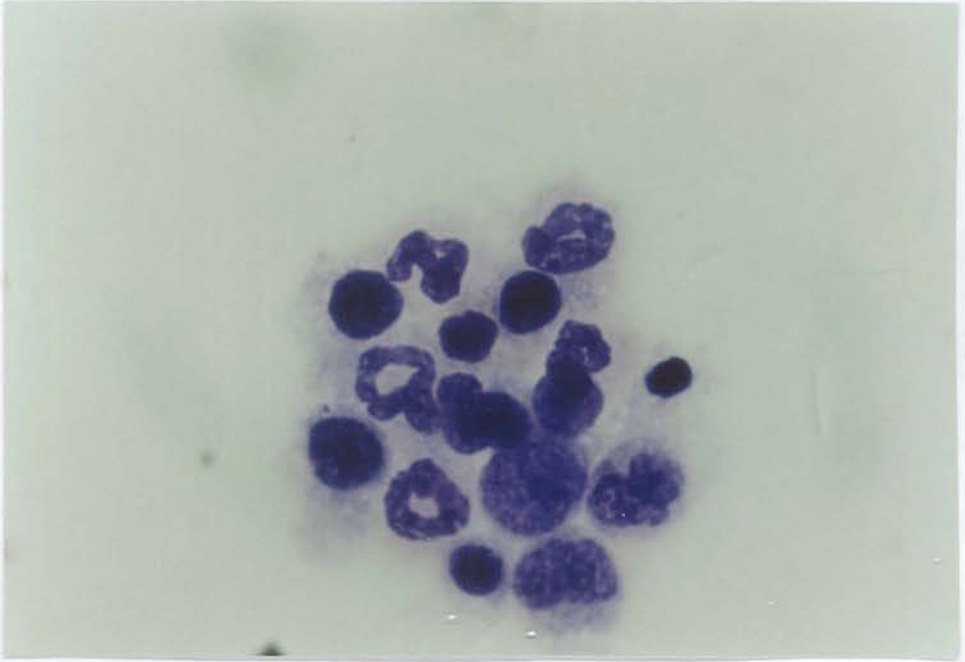
Bu çalışmada bazı ilaçların (klotrimazol, izokonazol, ekonazol, tiokonazol ve ketokonazol) ham maddesi olarak kullanılan imidazol türevi olan 2, 4, 5 trifenil imidazol maddesi MN kemik iliğinde oluşumu ile bağlantılı olup olmadığı değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bunun için bu maddenin artan değişik dozları her gün *Wistar* cinsindeki ratlara enjekte edildikten 7 gün sonra kesilen hayvanlarının polikromatofilik, normokromatofilik ve polimorf hücrelerinin elde edilmesi için kemik ilikleri toplanmıştır. Söz konusu hücrelerde, MN frekansı saptanarak pozitif kontrol, negatif kontrol ve araştırma grubu bireyleri kendi aralarında karşılaştırılmışlardır. Uygulanan 2, 4, 5, trifenil imidazol maddesinin pozitif kontrol olarak uygulanan DMSO dozları çizelge 4.6'da gösterilmektedir.

Kimyasal maddenin doz artışı ile birlikte MN artışını saptayabilmek amacıyla değişik dozlarla muamele edilen hayvan gruplarından kemik iliği hücreleri alınarak her hayvandan ikişer preparattan en azından toplam 1000 hücre içindeki MN sayısı tespit edilmiştir (çizelge 4.7). çizelgede görüldüğü gibi kimyasal madde ile enjekte edilen hayvanlarda MN oranının dozun artışı ile doğru orantılı olarak arttığı ve özellikle 6, 8, dozlar ile enjekte edilen hayvanlarda bu artışın belirgin hale geldiği saptanmıştır (Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 13).

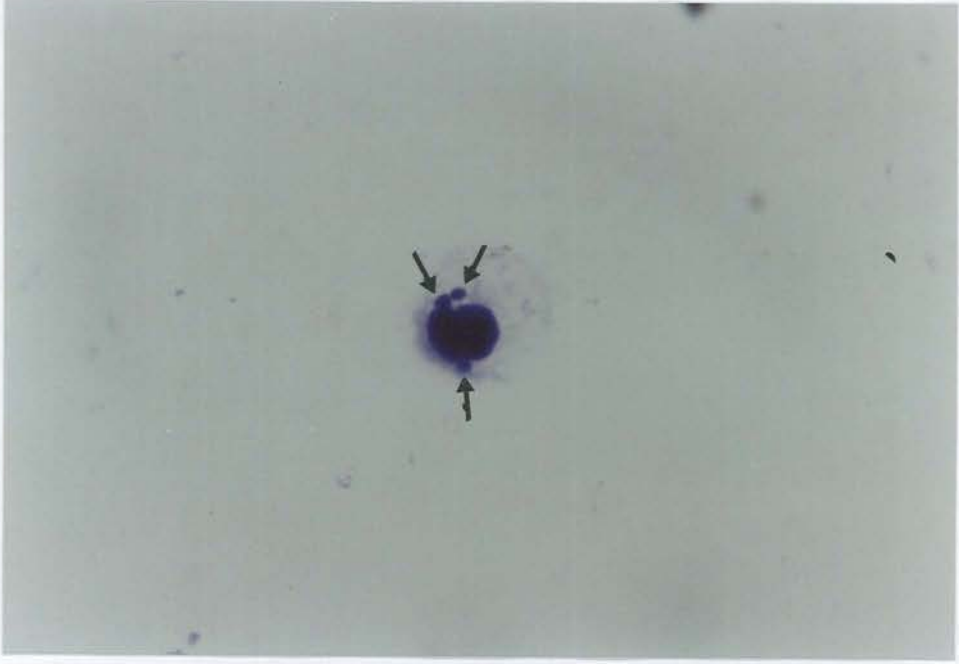
II.1. Deney ve Kontrol Grubunun MN Oranı

Araştırma grubunu oluşturan 10 rat ile kontrol grubunu oluşturan 11 ratta gözlenen MN oranları karşılaştırıldığında, deney grubu MN oranları toplamı 8.8 iken pozitif kontrol grubu MN oranları toplamı 3.12 negatif kontrol ise yalnızca 0.1 olarak bulunmuştur. Gruplar arasında görülen bu farklılık istatistiksel olarak Student t-testi kullanılmasıyla değerlendirilmiştir. Bunun sonucunda gruplar arasındaki farklılığın pozitif

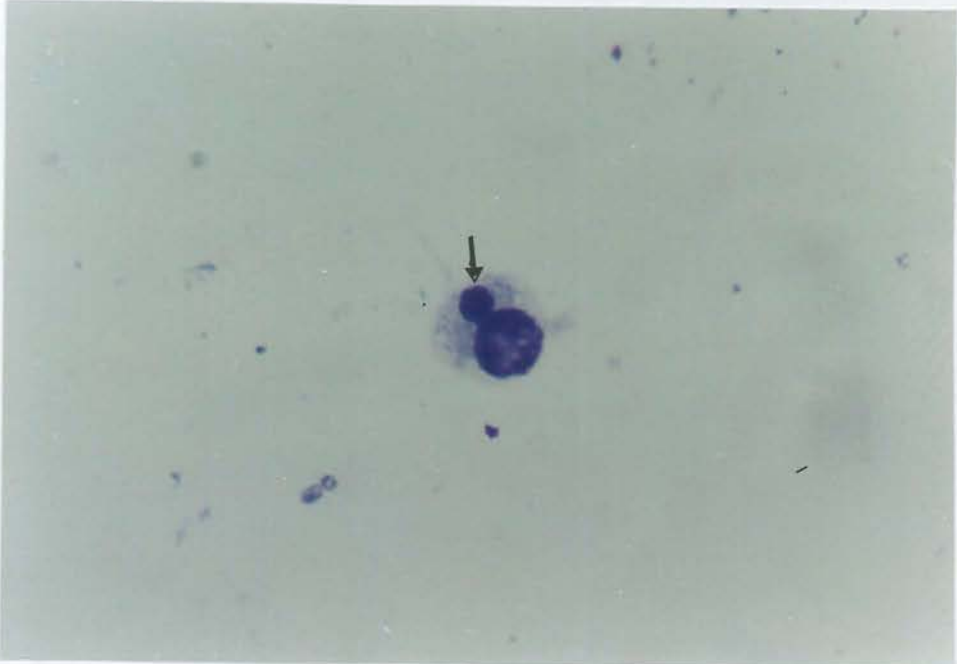
kontrol için $p<0.05$ ve negatif kontrol için $p<0.01$ olarak bulunmuş ve anlamlı olarak kabul edilmiştir. Ayrıca çizelge 4.6’da verilen dozlara karşılık gelen yüzde değerleri, farklılığı daha iyi gözlemleyebilmek için şekil 4.14, şekil 4.15, ve şekil 4.16, Şekil 17’de grafik ile gösterilmiştir.



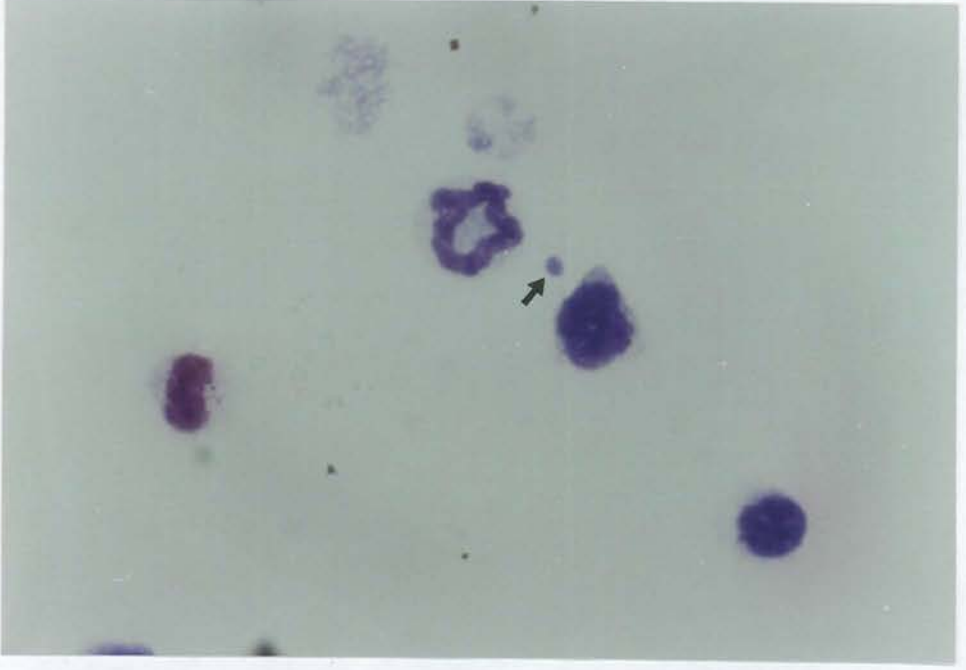
Şekil 4.10 . Negatif kontrol olarak hiç bir madde uygulanmamış normal ratların kemik iliği hücrelerinin 1056 kez büyütülmüş görünümü.



Şekil 4.11 . 8 mg 2, 4, 5 trifenil imidazol enjekte edilmiş ratların kemik iliği normokromatofil eritrosit hücrelerinde mikronükleusların görünümü (ok). X 330.



Şekil 4.12 . 8 mg 2, 4, 5 trifenil imidazol enjekte edilmiş ratların kemik iliği polikromatofil eritrosit hücrelerinde gözlenen mikronükleusların görünümü (ok). X 330.



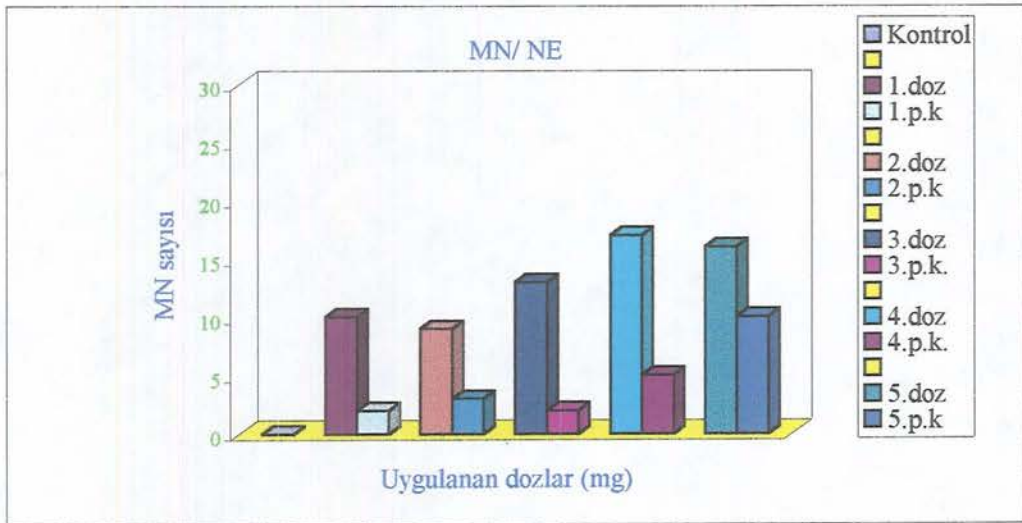
Şekil 4.13 . 8 mg trifenil imidazol enjekte edilmiş ratların kemik iliği polimorf hücrelerinde saptanan mikronükleusların görünümü (ok). X 330.

Bölüm 2.

Çizelge 4.6 . 2, 4, 5, trifenil imidazol enjekte edilmiş ratlar ve bunların kontrol gruplarının kemik iliği preparatlarından elde edilen MN sonuçları.

Sayılan Ç.H.	DOZLAR										
	İmidazol**					Kont*	Kontrol (DMSO)**				
	1.	2.	3.	4.	5.		1.	2.	3.	4.	5.
NE	508	423	397	467	429	563	453	603	492	512	519
MN/NE	10	9	13	17	16	0	2	3	2	5	10
PE	1362	1427	1480	1416	1429	1315	1432	1295	1410	1302	1323
MN/PE	13	11	15	17	30	2	4	5	7	7	16
PM	130	150	123	117	142	122	115	102	98	186	158
MN/PM	0	6	5	3	5	0	0	0	0	0	0
MNtoplamı	23	26	33	37	51	2	6	8	9	12	26
MN%	1,2	1,3	1,7	1,9	2,6	0,1	0,3	0,4	0,45	0,6	1,3

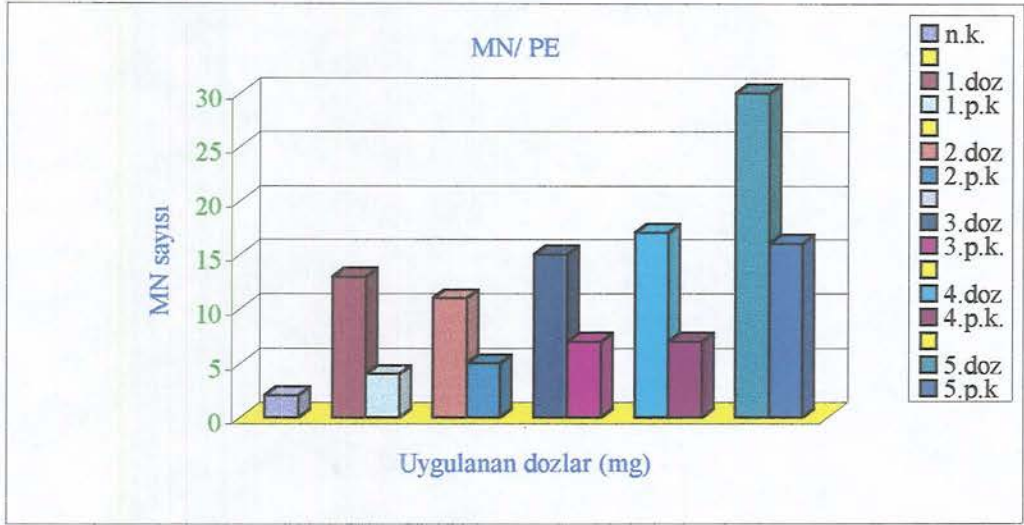
* : Hiç bir şey uygulanmamış negatif kontrol. MN: Mikronükleus
 NE: Normokromatofil Eritrosit. Ç.H. : Çekirdekli hücreler
 PE: Polikromatofil Eritrosit. PM: Polimorf hücresi



Şekil 4.14. 2,4,5 trifenil imidazol enjekte edilmiş ratların ve bunların kontrol gruplarının kemik iliği preparatlarındaki NE hücrelerinde sayılan MN sayıları.

MN : Mikronükleus

NE : Normokromatofil eritrosit

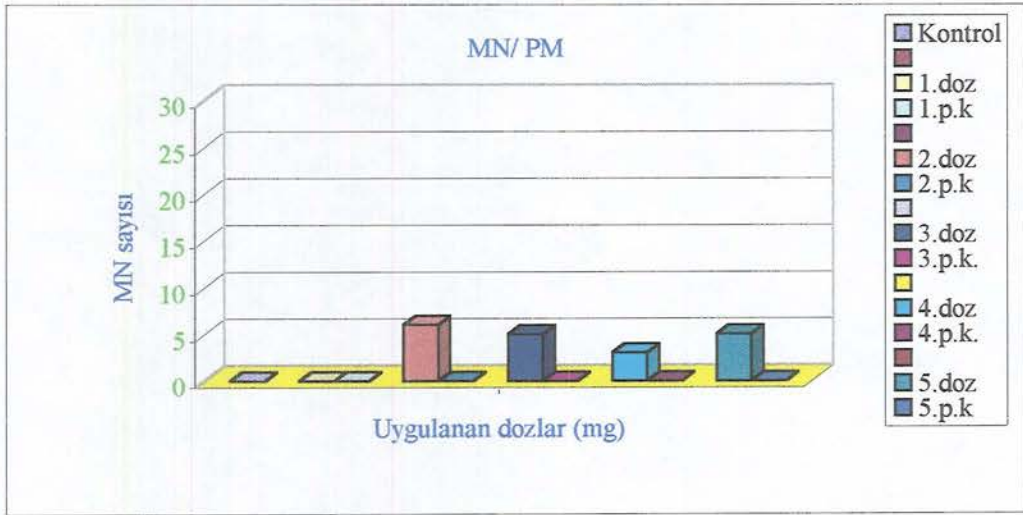


Şekil 4.15 . 2,4,5 trifenil imidazol enjekte edilmiş ratların ve bunların kontrol gruplarının kemik iliği preparatlarındaki PE hücrelerinde sayılan MN sayıları.

p.k. : Pozitif kontrol

PE : Polikromatofil eritrosit

n.k. : Negatif kontrol



Şekil 4.16 . 2,4,5 trifenil imidazol enjekte edilmiş ratların ve bunların kontrol gruplarının hücrelerinde kemik iliği preparatlarındaki polimorf hücrelerinde sayılan MN sayıları.

Kontrol : Negatif kontrol.

p.k. : Pozitif kontrol

Çizelge 4.7. Deney ve kontrol gruplarına verilen farklı dozlar.

UYGULANAN DOZLAR			
K. grup		D. grup	
1.Doç	0,028 ml DMSO +	1.Doç	1 mg İm.+ 0,028 ml
	0,472 ml S.F		DMSO + 0,472 ml S.F
2.Doç	0,057 ml DMSO +	2.Doç	2 mg İm.+ 0,57 ml
	0,443 ml S.F		DMSO + 0,443 ml S.F
3.Doç	0,114 ml DMSO +	3.Doç	4 mg İm.+ 0,114 ml
	0,386 ml S.F		DMSO + 0,386 ml S.F
4.Doç	0,172 ml DMSO +	4.Doç	6 mg İm.+ 0,172 ml
	0,328 ml S.F		DMSO + 0,328 ml S.F
5.Doç	0,230 ml DMSO +	5.Doç	8 mg İm.+ 0,230 ml
	0,270 ml S.F		DMSO + 0,270 ml S.F

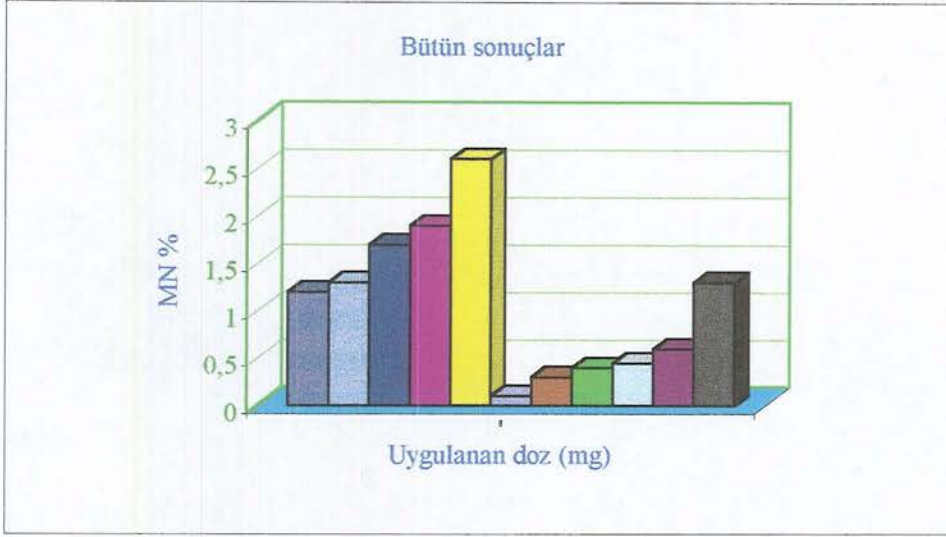
D.: Deney.

K.: Kontrol.

S.F : Serum fizyoloji.

İm. : 2, 4, 5, trifenil İmidazol.

DMSO : Dimetil sülfoksid.



Şekil 4.17 . 2, 4, 5, trifenil imidazol enjekte edilmiş ratların ve bunların kontrol gruplarının kemik iliği preparatlarından sayılan toplam 2000 hücredeki bunların MN sayısının yüzdeleri.

- | | |
|---|------------------|
| Deney 5 | Kontrol (DMSO) 5 |
| Deney 4 | Kontrol (DMSO) 4 |
| Deney 3 | Kontrol (DMSO) 3 |
| Deney 2 | Kontrol (DMSO) 2 |
| Deney 1 | Kontrol (DMSO) 1 |
| Kontrol 0 : Hiç bir şey uygulanmamış negatif kontrol. | |

5. TARTIŞMA

Bu çalışmanın kapsamına dahil olan iki araştırma alanı, bu tezin diğer kısımlarında anlatıldığı gibi iki bölümde de tartışılacaktır.

I. BÖLÜM: PORSUK ÇAYINDAN TOPLANAN *Rana ridibunda* ERİTROSİTLERİNDE MİKRONÜKLEUS OLUŞUMU.

Bascomb (1982) [41] bildirdiğine göre sucul ortamların kirlenmesi değişik nedenlerden dolayı olmaktadır. Bu nedenlerin en önemlilerinden bir tanesi insan popülasyonunun neden olduğu teknolojik aktivitelerdir. Çok sayıda kimyasal madde günlük olarak denizlere, tatlı göl, göletler ve akarsulara atılmaktadır. Bu atıkların miktarı, az da olsa büyük ve yüksek seviyeli toksik etkileri olabilmektedir [16-19]. Bu da suyun ekosisteminin bozulmasına neden olmaktadır. Bu yüzden ekolojik ortamların kirlenmesine neden olan ksenobiyotik, mutajenik veya karsenogenik ajanları incelemek amacı ile değişik testler ve değişik organizmalar kullanılmıştır [7, 16-19, 47, 55]. Philips ve arkadaşlarının (1978) bildirdiklerine göre kirleticiler incelemek için en uygun indikatör söz konusu ortamda yaşayan canlılardır [16, 51].

Bu çalışmanın amacı tatlı su kurbağası olan *Rana ridibunda*'nın içinde yaşadığı Porsuk çayı kirleticilerinin bir indikatörü olarak kullanılmasıdır. Kurbağalar bu amaç için çok uygun bir örnek teşkil etmekte olup, günün büyük bir kısmı su içinde geçirdiğinden dolayı kirletici maddelere (ağır metaller, pestisidler ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar) maruz kalma olasılığı yüksektir .

Çalışmamızın iki kontrol hayvan grubu olmuştur. Birinci grup kurbağalar negatif kontrol olup Porsuk çayının en temiz bölgelerinden, sayılan Gelin kayası köyü civarı ve ikinci pozitif kontrol Anadolu Üniversitesi kampüsünden toplanmıştır.

Diğer çalışmalarda kontrol grubu olarak kullanılan kurbağa kanı eritrositlerinin MN oranı % 0.45 olarak belirlenmiştir [23]. Oysa bizim negatif kontrol grubunda MN

oranı % 0.51 olup pozitif kontrol grubunda ise % 0.6 olduğu tespit edilmiştir. Bu elde ettiğimiz sonuçlarda kurbağaların eritrositlerindeki MN oranlarının olduğu kabul edilebilir. Çünkü hayvanların sayılarının paralellik göstermemesi, istatistiksel hata payını arttırmıştır. Bizim pozitif gruptan 6 tane ve negatif gruptan 4 tane kurbağa toplandığı halde Zhuleva ve arkadaşları (1994) yaptıkları çalışmada toplam 10 tane kurbağa kullanılmıştır. Bu yüzden her iki çalışmanın arasındaki sayısal farklılık istatistiksel hatayı büyötmüştür.

Porsuk çayı üzerindeki bölgelerden alınan Azot fabrikası civarından alınan ilk deney grubu 20.000 hürede MN oranı % 4.6 bu da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak büyük fark taşımaktadır ($P<0.001$). Sümerbank fabrikası civarından alınan ikinci deney grubu MN oranı ise % 3.21 ($P<0.001$). Şeker üçüncü deney grubu MN oranı ise % 3.2 ($p<0.001$). Oysa Zhuleva ve arkadaşları (1994) yaptıkları çalışmada kurbağa kanındaki MN oranı bir deney grubu için % 2.84 ve bunun elde ettiği sonuç “ Bu bölgenin durumu çok kötü ve zararlıdır ” diye yorumu yapmıştır. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç Zuhleva’nın elde ettiği sonucun nerede ise iki katına denk gelmektedir. Durumu en iyi olan bölge Zuhleva ve arkadaşlarının (1994) sonuçlarından daha fazla kötü olarak bulunmuştur. Bu şekilde Porsuk suyu ne kadar kötü bir şekilde kirlendiği çok açık bir şekilde karşımıza çıkmaktadır.

Bu çalışmada Porsuk çayının durumu sadece elde edilen MN oranları ile değerlendirmek eksik olur. Çünkü MN çeşitliliği de kirlilik tespitinde önemli yer almaktadır. A şeklindeki MN’lar genellikle doğal olarak her tür için kabul edilmiştir [85]. Fakat sayılarındaki artış bölgenin aşırı kirlenmesi durumunu işaret eder. Yalnız MN’larda B, C ve D tiplerinin oluşması kromozomların sitogenetik tahribat görmesinden kaynaklanmaktadır ve bozulmanın ana nedeni çevre kirliliği ve içerdiği mutajenlerdir [23]. Mikronükleusların ölçülerine bakılarak kromozomların üzerinde nasıl değişiklik olduğu söylemek mümkündür. Büyük mikronükleus oluşması genel olarak kromozomları kutuplara çeken miktotübüllerin bozulmasına, küçük mikronükleusların oluşumu ise kromozomların yapısal bozulma ve asentrik bir bölge meydana gelmesi ve dolayısı ile mikrotübüllere bağlanamamasından kaynaklanabilir.

Buna dayanarak A, C ve D tipindeki MN'lar kromozomlarda oluşan tahribatların sonucu, B tipi MN oluşumu ise kromozomların metafazda ve anafazda biraz gecikmesine bağlı olduğu söylenebilir [23].

Bu sonuçlara göre azot fabrikasının atıkları en tehlikeli atıklar olup, Porsuk çayını önemli ve tehlikeli derecede kirletmektedir. Onun ardından Sümerbank tekstil fabrikası ve son olarak şeker fabrikası yer almaktadır. Fakat gözden kaçmayan bir gerçek var ki her üç fabrikanın atıkları çok toksik ve mutajenik olduğu ve gerek Porsuk suyu ekolojik sistemini gerekse insan sağlığını çok ciddi bir şekilde tehdit etmektedir.

Değişik ortamlarda yaşayan canlılar, laboratuvar koşulları altında değişik kimyasal maddelerin toksisitelerinin MN testi ile incelendiğinde MN oranındaki artışın dokudan dokuya farklılık göstermiştir. Bir deneyde kullanılan *Dreissena polymorpha* dokularında yapılan inceleme sonucu MN oranları kan hücrelerinde % 3.2 ve % 6.9 arasında olduğu, diğer dokularda ise MN oranı % 5.4 ve % 6.7 arasında olduğu tespit edilmiştir [16]. Bu araştırmada, elde edilen bu oranların kullanılan maddenin mutajenik potansiyele sahip bir madde olduğunu söylediği bildirilmiştir. Bizim sonuçlarımız bu oranların arasında yer aldıklarına göre çok rahat bir şekilde Porsuk çayının suyu mutajenik potansiyele sahip olduğu söylenebilir.

Kurbağaların eritrositlerindeki bu ciddi MN oranındaki artış şu sebeplere bağlanabilir: Ağır metallerin yüksek düzeylerde bulunmaları ve hatta bazı ağır metallerin Porsuk çayının genelinde izin verilmeyen seviyelerde bulunması [85]. Ağır metallerin yanı sıra bitkileri ve zirai ürünleri gübrelemek için veya zararlı parazitlerden korumak için kullanılan pestisidler ve insektisidler de yer almaktadır [82]. Pestisidlerden DDVP (Dichlorvos) *Vicia faba* kök ucu hücrelerinde mitoz anomalilerine neden olduğu tespit edilmiştir [101]. Diğer taraftan DDPV intraperitoneal olarak ratlara enjekte edildiğinde MN oranını arttırdığı da gözlenmiştir [55]. Cypermethrin i.p. enjeksiyonu MN sayısının kontrole göre önemli ölçüde artmasına neden olmuştur [54, 55]. Malathion'un yüksek oranda klastojenik aktivite gösterdiği belirtilmektedir [55]. Deltamethrin hayvanlara enjekte edildiğinde hem kromozom bozulmalarına ve hem de

MN oranının artmasına neden olmuştur [4]. Ayrıca deltamethrin *Allium cepa* kök hücrelerinin kromozomlarının bozulmalarına neden olmuştur [4]. Pyrethroid insektisidleri de in vivo MN oranı kontrole göre yüksek seviyeye artmasına neden olmuştur [6].

Sonuç olarak, Porsuk çayı boyunca büyük yerleşim merkezleri olan Kütahya ve Eskişehir illeri dahil bir çok yerleşim merkezleri kullanma ve içme sularını buradan kullanmaktadır. Bunun için bu çalışmada gözlenen etkiler burada yaşayan insan popülasyonu içinde söz konusu olabilir. Bu gibi etkilerin daha detaylı olarak çalışılacak, Porsuk suyunun kirliliğinin asgariye indirilmesi çok önem taşımaktadır.

11. BÖLÜM: 2, 4, 5, TRİFENİL İMİDAZOL ENJEKTE EDİLMİŞ RAT KEMİK İLİĞİNDE MN OLUŞUMU

MN oluşumu bir çok çalışmada, çeşitli maddelerin klastojenik etkisini göstermek amacı ile incelenmiştir. Balık ve koyun etinin ekstra edilmesi sonucu elde edilen quercetin ve luteolin tuzlarının yüksek konsantrasyonunun hem hayvan hem insan kromozomları üzerine etkileri PCE hücrelerinde oluşan MN oranı ile belirlenmiştir. Bu çalışmanın, tuzların etkisinin istatistiksel sonuçta göre $p < 0.001$ olduğu gösterilmiştir [64]. Diğer bazı çalışmalarda ise çok geniş çapta fungusit olarak kullanılan Metalaxil maddesi MN testi ile gerek insan ve gerekse hayvan kromozomlarında in vivo uygulandığında bir etki oluşturmadığı ve negatif sonuçlar verdiği ancak in vitro olarak uygulandığında aynı sonuçlar vermediği tespit edilmiştir [60]. Bu sonuca göre in vitro olarak uygulanan her madde in vivo olarak uygulandığında, veya in vivo olarak uygulanan her madde in vitro olarak uygulandığında aynı sonuç vermeyebilir. Higgins, (1971)[46] Lave and Liskin (1970) [49] bildirdiklerine göre çevre kirleticilerinin önemli unsurlarından biri olan sülfür dioksit bir kaç solunum hastalığına yol açtığı belirlenmiştir [12]. Daha sonra bu maddenin etkisi üzerine yapılan çalışmalarda insan kromozomları üzerinde klastojenik bir etki yaptığı kanıtlanmıştır [12]. Başka bir çalışmada, yaşlanmanın bir etkisi olarak spermatid ve lenfoid hücrelerinde MN oranının arttırıldığı kanıtlanmıştır [5, 22]. Diğer

çalışmalarda yeni sentezlenen kimyasal maddelerinin genotoksisiteleri yine MN testi ile değerlendirilmiş olup bazı kimyasal maddeler positif sonuç verirken bazıları negatif sonuç vermektedir. Bir ilaç hammaddesi olan imidazol türevi 2, 4, 5, trifenil imidazol'un farklı dozlarının yedi gün enjekte edilmesinden sonra elde edilen kemik iliği hücrelerinde, bu maddenin klastojenik etkisi MN testi ile değerlendirilmiştir.

Bu amaç için hazırlanan hayvanların kontrol grubunda tespit edilen MN oranı % 0.3 olarak oldukça küçük bulunmuştur. Bu oran diğer çalışmalarda MN spontan oluşumu hakkında ve kontrol gruplarında verilen sonuçlara benzerlik göstermektedir [10, 24, 36, 45]. Bu oran sözü edilen çalışmalarla uyum sağladığına göre bizim çalışmamızda kullanılan hayvanlarında deney amaı için ne kadar elverişli olduğunu göstermektedir. Çünkü MN oranının bazı hastalıklarda, yaşlanma, bazı kimyasal ajanlardan dolayı ve evre kirleticilerine maruz kalma gibi durumlarda arttığı tesbit edilmiştir [16-19, 22, 36, 38, 47, 70]. Bu yüzden bizim kontrol grubunda elde edilen oranın diğer çalışmalarda da mevcut olması, çalışmamızda kullanılan hayvanların gerek beslenme yöntemleri ve gerekse diğer koşulları bakımından olması gereken şartlarda yaşatıldığı ve MN oluşumunun deney amaı dışından gelen bir faktör nedeni ile olmadığı kanıtlanmıştır.

İmidazoln pKa değeri 7 civarındadır. Bu onun için değişik pH ortamlarında elektron alış verişini kolaylaştırır. İmidazol, Nishie'ye (1969)[103] göre düşük toksisiteye sahip olan bir madde olup LD₅₀ değeri 1.88 g / kg olarak raporlanmıştır [9]. İmidazol basit bir heterosiklik molekül olup değişik organik birleşikleri oluşurmaktadır. Bu molekül su içinde çözülür ve oral yolla alındığı taktirde gastrointestinal yerden kolayca absorba edilebilir. İmidazol vücuda girdikten sonra metabolik yollarla hidantoin, hidatoik asid ve N-asetil İmidazol'a çevrilmekte ve daha sonra üre ile birlikte atılmaktadır [9]. İmidazol ve onun metabolik türevleri olan hidantoin, hidatoik asid, N-asetil İmidazol ve histamin mutajenik ve karsenojenik etkileri olmadığı in vivo ve in vitro da tespit edilmiştir [9]. Ancak imidazol'un başka elementlerin (cobalt ve bakır) bulunduğu taktirde imidazol'un etkisini arttırdığı, ayrıca

bazi imidazol türevleri olan 2-mercaptoimidazol'ün ve burada sayamayacağımız 48 imidazol'ün türevi mutajenik etkisi olduğu kanıtlanmıştır [34, 53, 57].

Bizim çalışmamızda değişik miktarlarda (1, 2, 4, 6, 8) mg/ Kg i.p olarak enjekte edilen 2, 4, 5 trifenil' imidazol'ün etkileri incelendiğinde, MN oranında doz artışı ile birlikte kontrol gruplarına göre önemli artış gözlenmiştir. Bu artış yapılan istatistiksel değerlendirmede pozitif kontrole göre $p < 0.05$ ve negatif kontrol $p < 0.001$ anlamlı olarak bulunmuştur. Mikronükleus çalışmalarında görülen doz farklılıkları, kullanılan maddenin aktif madde konsantrasyonuna ve LD_{50} değerine göre değişmektedir. Diğer taraftan PCE sayısını kontrole göre önemli ölçüde arttırmadığı gözlenmiştir. Memelilerde, kemik iliğinde PCE sayısının artması, bir toksisite belirtisi olarak ele alınmaktadır [91, 28]. Bizim deneyimizde PCE sayıları değerlendirildiğinde kontrole göre bir artış gözlenmemiştir. Bu sonuca göre 2, 4, 5 trifenil imidazol ratlara toksik etkisi olmadığı fakat klastojenik etkisi olduğu bulunmuştur. Bu artış Forster'in elde ettiği sonuçlara göre ters düşmektedir. Ancak 2, 4, 5 trifenil İmidazol Ames testi ile pozitif sonuçlar verdiği gibi ratlara i.p. yolla enjekte edildiğinde değişik dokuların hasarına ve defekt görmelerine neden olduğu saptanmıştır [104, 105].

İmidazol ve metabolik türevleri olan hidantoin, hidantoik asid, N-asetil-imidazol ve histaminin molekül ağırlıkları küçüktür. Fenil grubunun molekül ağırlığı, yaklaşık bir imidazol halkasının molekül ağırlığı kadardır. Bir fenil grubu imidazole bağlandığında meydana gelen molekülün ağırlığı iki katına çıkmış olur. İki fenil bağlandığı taktirde molekül ağırlığı 3, üç fenil bağlandığında ise 4 katına çıkmış olmaktadır. Ayrıca kimyacılar arasında bilinen bir gerçek var ki; kimyasal maddede karbon sayısı arttıkça, karbonun artışına paralel olarak o maddenin. etkisi artmaktadır [106]. Bu yüzden Froster ve arkadaşları tarafından elde edilen sonuçlar ile bizim elde etmiş olduğumuz sonuçlar toksisite yönünden birbirine uymamaktadır. 2, 4, 5 trifenil imidazol ile metabolizma reaksiyonları arasında moleküler düzeyde nasıl bir etkileşimin olduğu hakkında şimdiye kadar hiç bir çalışma yapılmamıştır. Bu maddenin hangi seviyelerde nasıl bir etki mekanizmasına sahip olduğu değişik yöntemlerle de gösterilecek, burada elde edilen bulguların desteklenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. HOLMES, E.G., Bernstein, C. and Brenstein, H., *Oxidative and Other DNA Damages as the basis of Aging : a review*. Mutation Res., 219, 263-266, 1989.
2. AARON, C.S., Perty, T.W., Branstetter, D.G., Wickrema-Sinha, A.J., Yu, R., Sorg, R., Thilagar, A., Kumaroo, P.V., Sams, J.P., Thornburg, B.A., Brown, P.K. and Trozis, T.J., *Comparative Mutagenicity Testing of Bropiramine does not Induce Cytogenetic Damage In vivo in Rat But does Produce Micronuclei in the Mouse*. Mutation Res., 252, 239-246, 1991.
3. AARON, C.S., Sorg, R. and Zimmer, D., *The Mouse Bone Marrow Micronucleus test; Evaluation of 21 Drugs Candidates*. Mutation Res., 223, 129-140, 1989.
4. AGARWAL, D.G., Cauhan, L.K.S., Gupta, S.K. and Sundaraman, V., *Cytogenetic Effects of Deltamethrin on rat bone marrow*. Mutation Res., 313, 133-138, 1994.
5. ALLEN, J.W., Collins, B.W. and Setzer, R.W., *Spermatid Micronucleus Analysis of Aging Effects in Hamsters*. Mutation Res., 316, 261-266, 1996.
6. BHUNYA, S.P. and Jena, G.B., *Studies on the Genotoxicity of Monocrotophos, An organophosphate Insecticide, in the Chick In vivo test system*. Mutation Res., 292, 231-239, 1993.
7. CHU, S., Xi, Z., Xu, X., Zhang, Y. and Xu, Y., *Induction of Micronuclei in Peripheral Erythrocytes of Misgurnus anguillicaudatus by Polychlorinated Biphenils*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 57, 179-182, 1996.
8. DARROUDI, F. and Natarajan, A.T., *Induction of Sister Chromatid Exchanges, Micronuclei and Gene Mutations by Indirectly Acting Promutagens Using Human Hepatoma Cells as an Activation System*. Atla., 22, 445-453, 1994.
9. FORSTER, R., Blowers, S.D., Cinelli, S., Marquardt, H. and Westendorf, J., *Mutagenicity Testing of Imidazole and Related Compounds*. Mutation Res., 298, 71-79, 1992.
10. HAYASHI, M., Kodama, Y., Awogi, T., Suzuki, T., Asita, A.O. and Sofoni T., *The Micronucleus assay Using Peripheral Blood Reticulocytes from Mitomycin C- and Cyclophosphamide- Treated Rats*. Mutation Res., 278, 209-213, 1992.
11. JAGDT, B., Warncke, K., Auer, H. and Rüdiger, H.W., *Sleep Deprivation does not Induce Sister Chromatid Exchange in Humans*. Mutation Res., 361, 11-15, 1996.
12. MENG, Z. and Zhang, L., *Cytogenetic Damage Induced in Lymphocytes by Sodium Bisulfite*. Mutation Res., 298, 63-69, 1992.

KAYNAKLAR (devam)

13. MERSCH, J., Beauvais, M.N., and Nagel, P., *Induction of Micronuclei in Haemocytes and Gill Cells of Zebra Mussels, Dreissena polymorpha, Exposed to Clastogens*. Mutation Res., 371, 47-55, 1996.
14. MIGLIORE, L., Parrini, M., Sbrana, I., Battaglia, A. and Lopriano, N., *Micronucleated Lymphocytes in People Occupationally Exposed to Potential Enviromental Comtaminants: The Age effect*. Mutation Res., 256, 13-20, 1991.
15. MÜLLER, W.U., Nüsse, M., Miller, B.M., Slavotinek, A., Viaggi, S. and Streffer, C., *Micronuclei: a Biological Indicator of Radiation Damage*. Mutation Res., 366, 163-169, 1996.
16. RUÍZ, E.F., Rabopo, V.M., Zecona, S.V., Perez, A.B. and Ma, T.H., *Tradiscantia-Micronucleus (Trad-MCN) Bioassay on Clastogenicity of Waste Water and In Sitti Monitoring*. Mutation Res., 270 (1), 45-51, 1992.
17. SCARPATO, R. and Migliore, L., *Comparison of Spontaneous Structural Chromosome Aberration Frequency in 48 h-Cultured Human Lymphocytes Mitotically Arrested by different Colcemid Treatments*. Mutation Res., 361, 35-39, 1996.
18. SCARPATO, R., Migliore, L. and Barale,R., *The Micronucleus Assay in Anodonta Cygnea for the Detection of Drinking Water Mutagenicity*. Mutation Res., 245, 231-237, 1990.
19. SCARPATO, R., Migliore, L., Alfinito-Cognetti , G. and Barale,R., *Induction of Micronuclei in Gill Tissue of Mytilus galloprovincialis Exposed to Polluted Marine Waters*. Marine Pollution Bulletin, Vol 21, No, 2, 74-80, 1990.
20. SOHER, M.A. and Enaam, M.A., *Cytological Effectes of Pesticides, XVII, Effects of Dichlorvos on Root-Mitos of Vicia faba*. Cytologie, 51, 21-25, 1986.
21. SOHER; M.A. and Ezzat, I.A., *Cytogenetics Effects of Pesticides, III, Induction of Micronuclei in Mouse Bone Marrow by the Insecticide Cypermethrin and Rotenon*, Mutation Res., 155, 135- 142, 1985.
22. TUTGUN, S., *Kadın ve Erkeklerde Yaşlanmayla Birlikte Artan Mikronükleus Oranın Saptanması*. Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 1996.
23. ZHULEVA, L.Y. and Dubinin, N.P., *Use of the Micronucleus test for Ecological Monitoring in Astrakhan' Oblast'*. ГЕХЕТІКА, Vol, 30, No, 7, 999-1004, 1994.
24. ZÚÑİGE, G., Bugarín, O.T., Ramírez-Muñoz, M.P., Ramos, A., Fanti-Rodirguez, E., Portilla, E., García-Martínez, D., Cantú, J.M., Gallegos-Arreola, M.P. and

KAYNAKLAR (devam)

- Sánchez-Corona, J., *Short Communication Spontaneous Micronuclei in Peripheral Blood Erythrocytes from 35 Mammalian Species*. Mutation Res., 369, 123-127, 1996.
25. CHETALAT, A.A., Albertini, S. and Gocke, E., *The Photomutagenicity of Fluoroquinolones in Test for Gene Mutation, Chromosomal Aberration, Gene Conversion and DNA Breakage (Comet Assay)*. Mutagen., 5 (11), 497-504, 1996.
26. CHORVATOIČOVÁ, D. and Navarova, J., *Suppressing Effects of Glucan on Micronuclei Induced by Cyclophosphamide in Mice*. Mutation Res., 282, 147-150, 1992.
27. DEGRASSI, F. and Tanzarella, C., *Immunofluorescent Staining of Kinetochores in Micronuclei; a New Assay for Reactive Protein Oxidation Products*. Mutation Res., 203, 339-345, 1992.
28. KASAMATSU, T., Kohda, K. and Kawazoe, Y., *Comparison of Chemically Induced DNA Breakage in Cellular and Subcellular Systems using the Comet Assay*. Mutation Res., 369, 1-6, 1996.
29. KUSAMRAN, W.R., Wakabayashi, K., Oguri, A., Tepsuwan, A., Nagao, M. and Sugimura, T., *Mutagenicities of Bangkok and Tokyo River Waters*. Mutation Res., 325, 99-104, 1994.
30. LUDWIKÓW, G., Hofer, K.G., Bao, S.P. and Ludwików, F., *The Effect of ¹²⁵I Decay at Different Stages of S-Phase on Survival, Expression of Micronuclei and Chromosome Aberration in CHO Cells*. Int. J. Radiat. Biol., Vol 70, No 2, 177-187, 1996.
31. MARON, D.R., and Ames, B.N., *Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test*. Mutation Res., 113, 173-215, 1983.
32. ORTZ, A.I., Pollastini, M.T., Barea, M. and Ordonez, D., *Bacterial Mutagenic Evaluation of Luxabendazole, a New broad spectrum Anthelmintic, with the Salmonella typhimurium His⁺ and the Escherichia coli Tryp⁺ Reversion tests*. Mutagen., 11 (1), 27-31, 1996.
33. XIAO, W., Nowak, M., Laferta, S. and Fontanie, T., *Mutagenicity and Toxicity of the DNA Alkylation Carcinogens 1, 2-Dimethylhydrazine and Azoxymethane in Escherichia coli and Salmonella typhimurium*. Mutagenesis, 11 (3), 241-245, 1996.
34. De, M.M., Vanelle, P., Bernadini, E., Laget, M. and Maldonado, J., *Evaluation of the Mutagenic and Genotoxic Activities of 48 Nitroimidazoles and Related*

KAYNAKLAR (devam)

Derivatives by the Ames Test and the SOS Chromotest. Environ. Mol. Mutagen. 19 (2), 167-181, 1992.

35. SCHMID, W., *The Micronucleus Test.* Mutation Res., 31, 9-15, 1975.
36. SLAVOTINEK, A., Thomson, A., Eynaud, P., Perry, P., Michael Steel, C. and Eden, O.B., *The Frequency of Micronuclei, in Bone Marrow Erythroblasts During the Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia.* Mutation Res., 303, 11-18, 1993.
37. HEDDLE, L.A., *A rapid In vivo Test for Chromosomal Damage.* Mutation Res., 18, 187-190, 1973.
38. HEDDLE, L.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., Vanparys, Ph. and Mac-Gregor, J.T., *Micronuclei as an Index of Cytogenetic Damage: Past, Present and Future.* Environmental Mol. Mutagen., 18, 127-131, 1980.
39. MIGLIORE, L., Nieri, M., Amodio, S., and Loprieno, N., *The Human Lymphocyte Micronucleus Assay: a Comparison between Whole-Blood and Separated Lymphocyte Cultures.* Mutation Res., 227, 167-172, 1989.
40. ONO, T., and Yoshimura, H., *Analysis of Micronucleus Induction of Pyrimethamine in In vitro CHL Cells and In vivo Mouse Bone Marrow.* Mutagenesis, Vol 11, No 1, 85-88, 1996/
41. BASCOMB, W., *The effects of Waste Disposal on the Coastal Waters of Southern California.* Environ. Sci. Technol., 16, 226-235, 1982.
42. CATENA, C., Villani, P., Conti, D. and Righi, E., *Micronuclei and 3AB Index in X-irradiated human lymphocytes in G0 and G1 Phases.* Mutation Res., 311, 231-237, 1994.
43. COURDI, A., Mari, D., Marcie, S., Gioani, J. and Chauvel, P., *Micronucleus Induction in 10 Human Tumour cells after High- and Low Dose Radiation.* Radiother-Oncol., 37 (2) 117- 23, 1995.
44. FRACASSO, M.E., Leone, R., Brunello, F., Monastra, C., Tezza, F. and Storti, P.V., *Mutagenic Activity in Waste Water Concentrates from Dye Plants.* Mutation Res., 298, 91-95, 1992.
45. HEDDLE, L.A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavourin, K., Mac-Gregor, J.T., Newell, G.W. and Salamone, M.F., *The Induction of Micronucleus as a Measure of*

KAYNAKLAR (devam)

Genotoxicity, Areport of U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutation Res., 123, 61-118, 1983.

46. HIGGINS, I.T.T., *Effects of Sulfur Dioxides and Particulates on Health. Arch. Environ. Health*, 22, 584-590, 1971.
47. HYİNSKİKH, N.N., Eremich, A.V., Ivanchuk, I.I. and Hyinskikh, E.N., *Micronucleus test of Erythrocytes and Lymphocytes in the Blood of the People Living in the Radiation Pollution Zone as a Result of the Accident at the Siberian Chemical Plant on April 6, 1993. Mutation Res.*, 361, 173-178, 1996.
48. KIRKWOOD, T.B.L., *Review DNA, Mutation and Aging, Mutation Res.*, 219, 1-7, 1989.
49. LAVE, L.B., and Liskin, *Air Pollution and Human Health. Science*, 169, 723-733, 1970.
50. MA, T.H., Harris, M.M., Anderson, V.A., Ahmed, I., Mohammed, K., Bare, J.L. and Lin, G., *Tradiscantia-Micronucleus (Trad-MCN) Tests on 140 Health Releated Agents. Mutation Res.*, 138, 157-167, 1984.
51. PHILIPS, D.J.H., *Use of Biological Indicator Organisms to Quatitate Organochlorine Pollutants in Aqyatic Environments. Environ. Pollut.* 16, 167-202, 1978.
52. ROSİN, M.P., *The Use of the Micronucleus Test on Exfoliated Cells to Identify Anticlastogenic Action in Humans: a Biological Marker for the Efficacy of Chemopreventive agents. Mutation Res.*, 267, 246-276, 1992.
53. BASU, A.K., Wood, M.L., Niedernhofer, L.J., Ramos, L.A. and Essigmann, J.M., Essigmann, J.M., *Mutagenic and Genotoxic of Three Vinyl Chloride Induced DNA Lesions: 1,N6-ethanoadinine, 3,N4-ethanocytosine, and 4-Amino-5-(İmidazol-2-yl) İmidazole. Biochemistry*, 32(47), 12793-801, 1993.
54. BHUNYA, S.P. and Pati, P.C., *Gennotoxic effects of a Synthetic Pyrethroid İnsecteside, Cypermethrin, in Mice İn vivo. Toxicology Lett.*, 41, 223-230, 1988.
55. EMECEN, G. ve Ünlü, H., *Memelilerde Pestisitlerin Sitogenetik Etkilerinin "Mikronükleus Testi" ile Araştırılması.. Tr. J. of Biology*, 19, 1-9, 1995.
56. FUJIE, K., Ito, Y. and Maeda, S., *Acute Cytogenetic Effects of Benzene on Rat Bone Marrow Cells İn vivo and the effect of Inducers or Inhibitors of Drug-Metabolizing Enzymes. Mutation Res.*, 298, 81-90, 1992.

KAYNAKLAR (devam)

57. HARTMAN, Z. and Hartman, P.E., *Copper and Cobalt Complexes of Carnosine and Anserine: Production of Active Oxygen Species and it's Enhancement by 2-Mercaptoimidazoles*. Chem-Biol-Interact., 84 (2), 153-168, 1992.
58. HAYNES, P., Lambert, T.R., De, I. and Mitchell, G., *Comparative In vivo genotoxicity of Antiviral nukleoside Analogues; Penciclovir, Acyclovir, and the Xanthine Analogue, Caffeine, in the Mouse Bone Marrow Micronucleus Assay*. Mutation Res., 369, 65-74, 1996.
59. HENDERSON, L., Fadyk, J., Windbank, S. and Smith, M., *Induction of Micronuclei Assay in Rat Bone Marrow and Peripheral Blood Following Acute and Subchronic Administration Azathioprine*. Mutation Res., 291, 79-85, 1993.
60. HRELIA, P., Maffei, F., Fimognari, C., Vigagni, F. and Cantelli-Forti, G., *Cytogenetic Effects of Melataxyl on Human and Animal Chromosomes*. Mutation Res., 369, 81-86, 1996.
61. KONOPACKA, M., *Evaluation of Frequency of Micronuclei in Exfoliated Cells from Bladder of Mice Treated with Bezo(A)pyrene, 2-Acetylaminfluorene and Cyclophosphamide*. Cell Biology International, Vol 18, No, 6, 669-672, 1994.
62. LEE, C.K., Brown, B.G., Reed, E.A., Lowe, D.G., McKarns, S.C., Fulp, C.W., Coggins, C.R.E., Ayres, P.H. and Doolittle, D.J., *Analysis of Cytogenetic Effects in Bone Marrow Cells of Rats Subchronically Exposed to Smoke from Cigarettes which Burn or Only Heat Tobacco*. Mutation Res., 240, 251-257, 1990.
63. MENG, Z. Q. and Zhang, L.Z., *Observation of Frequencies of lymphocytes with Micronuclei in Human Perpheral Blood Cultures from Warkers in Sulphuric Acid Factor*. Environ. Mol. Mutagene. 15, 218-220, 1990.
64. TAJ, S. and Nagarajan, B., *Inhibition by Quercetin and Luteolin of Chromosomal Alterations Induced by Salted, Deep Fried Fish and Mutton in Rat*. Mutation Res., 369, 97-106, 1996.
65. KRISHNA, G., Kropko, M.L., Ciaravino, V. and Thesis, J.C., *Simultaneous Micronuclei and Chromosome Aberration Assessment in the Rat*. Mutation Res., 264, 29-35, 1991.
66. BAŞARAN, N., *Tıbbi Genetik*, Bilim teknik yayınevi, Eskişehir, 1994.
67. GÖZÜKARA, E.M., *Biyokimya*. Evin matbaası, Malatya, 1994.
68. GUTTENBACH, M., Schakowski, R. and Schmid, M., *Aneuploidy and Ageing : X Chromosome Exclusion into Micronuclei*. Hum. Genet., 94, 295-298, 1994.

KAYNAKLAR (devam)

69. GÜNALP, A., Ayter, Ş., Lülecı, G., Kart, A. ve Sakızlı, M., *Tıbbi Biyoloji*. Meteksan matbaası, Ankara, 1986.
70. NISITANI, S., Hosokawa, M., Sasaki, M.S., Yasuoka, K., Naiki, H., Matsushite, T. and Takeda, T., *Acceleration of Chromosome Aberrations in Senescence-Accelerated Strains of Mice*. Mutation Res., 237, 221-228, 1990.
71. CORAZZA, K.D., Ginaldi, L., Zoli, G., Frosni, M., Lalli, G., Gasbarrini, G. and Quaglino, D., *Howell-Jolly Body Counting as a Measure of Splenic function areassessment*. Clin. Lab. Hematology, 12, 269-275, 1990.
72. OTHMAN, A.M., *Cell Biology*. El-ettihad Matbaası, Suriye, 1992.
73. EASTMOND, D.A. and Tucker, D.J., *Identification of Aneuploidi-Inducing Agents using Cytokinesis-Blocked Human Lymphocytes and an Antikinachore Antibody*. Environmental and Molecule Mutagen., 13, 34-43, 1989.
74. FATAYIR, A., *Hematology; Theory and Practice*. Dar-elthakafa, Amman, Ürdün, 1991.
75. ROONEY, U.E. and Czepulkowski, B.H., *Human Cytogenetics, A practical Approach*. Oxford University Press, New York, 2. Ed. 1992.
76. MURAD, A., *Genetics*. Darulmaaref, Suriye, 1986.
77. LEWIN, B., *Genes V*. Oxford University Press, New York, 1994.
78. STEBBINGS, H., and Hyams, J. S., *Cell Motility*. Longman Group Limited, London and New York, 1989.
79. EL-BANHAWY, M.A., Khattab, F.I., El-janzori, M.A. and Sharshabi, A.M., *Cell Biology*. Dar-elmaarif, Ürdün, 1991.
80. JENSEN, C.G., Davison, E.A., Bowser, S.S. and Rieder, C.L., *Primary Cilia Cycle in PtK₁ Cells: Effects of Colcemid and Taxol on Cilia Formation and Resorption. Cell Motility and the Cytoskeleton* 7, 187-197, 1987.
81. RUDD, N.L., William, S.E., Evans, M., Hennig, U.G.G. and Hoar, D.I., *Kinatochore Analysis of Micronuclei Allows Insights into the Actions of Colcemid and Mitomycin C*. Mutation Res., 261, 57-68, 1991.
82. *TÜRKİYEİN ÇEVRE SORUNLARI*. Türkiye Çevre Sorunlarının Vakfı Yayınları, Türkiye, 1991.

KAYNAKLAR (devam)

83. Rapor: Sağlık bakanlığı, *Porsuk Suyu Kirliliği ve Önleyici Tedbirler*. Eskişehir, 1992.
84. TANATMIŞ, M., *The Preliminary Studies on Limnofauna of Invetabrate in Enne Stream (Porsuk River)* (Türkçe). I, J. Anadolu University, Scieances and Art Facullty, 1, 15-23. 1989.
85. YÜCEL, E. Doğan, F. ve Öztürk, M., *Porsuk Çayında Ağır Metal Kirlilik Düzeyleri ve Halk Sağlığı İlişkisi*. Ekoloji Çevre Dergisi, 17, 29-31, 1995.
86. PRADHAN, S.N., Maikel, R.R. and Dulta, S.N., *Pharmacology in Midicine: Principles and Practice*. 1986.
87. VURAL, N., *Toksikoloji*. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları No:56, Ankara, 1984.
88. ALİÇİÇEK, A. ve Başlar, S., *Bitki ve Sularda Aşırı Nitrat Birikiminin Sonuçları*. Ekoloji Çevre Dergisi, 14 (4), 15-18, 1995.
89. JUNQUEİRAR, C.L., Carniero, J., Kelly, R.O.,(çeviren Aytekin,Y. ve Solakoğlu, S.), *Temel Histoloji*. Barış kitapevi, İstanbul, 1993.
90. NOYAN, A., *Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji*. Meteksan Anonim Şirketi, Ankara, 1993.
91. BERK, A.Ö., *Atlaslı Kan Hastalıkları Tanı ve Tedavi İlkeleri*. Türkiye Klinikleri Yayınevi, Ankara, 1989.
92. ERKOÇ, A., *Genel Histoloji*. İstanbul, 4. Baskı, 1983.
93. WILLİAM, J.W., *Hematology*. International Edition, New Tork, 4 th Edition, 1989.
94. ÜN, R., *Halkalı Organik Bileşikler*. İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 1977.
95. LINSTROMBERG, W.W., *Modern Organik Kimya* (Çev: Uyar, T.). Hacettepe Taş Kitapçılık, 1083.
96. BAYTOP, T., *Farmakognazi*. İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 1980.
97. KAYAALP, O.S., *Tıbbi Farmakoloji*. Cilt 1, Ankara, 1991.

KAYNAKLAR (devam)

98. KATZUNG, G.B., *Basic and Clinical Pharmacology*. Appleton and Lange, 4 th ed. 1989.
99. CANAY, O., *Tibbi Farmakoloji ilaç tanıtımı-İlaç İndeksi*. İstanbul, 1981.
100. IŞIKDAĞ, İ., Uçucu, Ü. ve Çakır, B., *Studies on the Synthesis of Some 4, 5, Di and 2, 4, 5 Trisubstituted İmidazole Derivatives*. Gazi Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi, 6 (1), 49-62, 1989.
101. CLARCK, G., *Staining Procedures*. William & Wilkins, Baltimore, 1981.
102. ZEYTİNOĞLU, M., *Changes in Cytoskeletal Organisation During Myotube Formation in vitro*. University of East Anglia, U. K. Doktora tezi, 1992.
103. NISHIE, K., Waiss, A.C. and Keyl, A.C., *Toxicity of Methylimidazoles*. Toxicol. Appl. Pharmacol., 14,301-307, 1969.
104. KILIÇ, S., *Bazı İmidazol Türevlerinin Ratlarda Yapmış Olduğu Histopatolojik Bulgular*. Yüksek Lisans Tezi, 1996.
105. AYAZ, B., 2, 4, 5, Trifenil İmidazol ve Türevlerinin Mutajenik Aktivitesinin Ames/ Salmonella/ Mikrozom testi ile araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir 1993.
106. MEVLÜT, E., Şafak, C. ve Dalkara, S., *Farmasötik Kimya*, Özbek Matbaası, Ankara, 1991.