

**BAZI İLAÇ ÖNCÜL MADDELERİNİN
MUTAJENİK ETKİLERİNİN BAKTERİYAL
VE HÜCRE KÜLTÜRÜ TESTLERİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

BERRİN AYAZ TÜYLÜ
Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Eylül-2001

**Bu Tez Çalışması Anadolu Üniversitesi Araştırma Fonunca
Desteklenmiştir.
Proje No: 00 10 50**

**BAZI İLAÇ ÖNCÜL MADDELERİNİN
MUTAJENİK ETKİLERİNİN BAKTERİYAL
VE HÜCRE KÜLTÜRÜ TESTLERİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

BERRİN AYAZ TÜYLÜ
Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Eylül-2001

Bu Tez Çalışması Anadolu Üniversitesi
Araştırma Fonunca Desteklenmiştir.
Proje No: 00 10 50

Berrin AYAZ-TÜYLÜ'nün "Bazı ilaç Öncül Maddelerinin Mutajenik Etkilerinin Bakteriyolojik ve Hücre Kültürü Testleri ile Araştırılması" başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi 04.10.2001 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Yrd.Doç.Dr.Hülya ZEYTİNOĞLU

Üye : Prof.Dr.Cumhur ÇÖKMÜŞ.

Üye : Doç.Dr.Sevilhan ARTAN

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 10.10.2001 tarih ve 31/2.. sayılı kararıyla onaylanmıştır.

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI İLAÇ ÖNCÜL MADDELERİNİN MUTAJENİK ETKİLERİNİN BAKTERİYAL VE HÜCRE KÜLTÜRÜ TESTLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

Berrin AYZAZ TÜYLÜ

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yard. Doç. Dr. Hülya ZEYTİNOĞLU
2001, 113 sayfa

Bu çalışmada, antibakteriyal, antifungal, antiinflamatuvar, analjezik ve antitümör etkileri bilinen ve bir ilaç öncül maddesi olarak sentezlenen 2-süstitüe fenil benzotiyazolün BT-3, BT-10, BT-15, BT-18 ve BT-26 kodlarıyla isimlendirilen 5 türevinin çeşitli dozlardaki olası mutajenik aktivitesi bakteriyal ve hücre kültürü testleri ile araştırılmıştır. Bakteriyal yöntem olarak kullanılan Salmonella mikrozom testi sonuçlarına göre fenil halkasına orto ve para konumunda nitro grubu bağlı BT-18 ve BT-26 kodlu benzotiyazol türevleri metabolik aktivasyon enzimlerinin bulunduğu ve bulunmadığı koşullarda oldukça etkili mutajenik aktivite göstermiştir. Diğer yandan test maddelerinin insan lenfosit kültürü kromozomlarında kardeş kromatid değişimini BT-3, BT-15 ve BT-18 kodlu türevlerin 48 saat uygulanan 300 µg/ml'lik dozları ile anlamlı ölçüde arttırdığı tesbit edilmiştir. Aynı hücreler üzerinde yapılan kromozom bozulma analizinde bazı maddelerin birkaç dozunda çözücü kontrole göre yüksek çıkan değerler elde edilmiştir. Ayrıca benzotiyazol türevlerinin lenfosit hücrelerinin replikasyonu ve mitoz bölünme indekslerini çok önemli ölçüde düşürerek hücre döngüsünü engelleyici antimitotik etkileri belirlenmiştir. Bu verilere göre test edilen benzotiyazol türevlerinin, farklı test sistemi ve organizmalar için farklı mutajenik aktivite gösterebileceği ve mutajenik etkinin fenil grubuna bağlı R yan grubunun özelliğine göre değişebileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler : Mutajenite, Ames, SCE, CA, RI, benzotiyazol

ABSTRACT**PhD Thesis****INVESTIGATION OF MUTAGENIC EFFECTS OF SOME
PRODRUG SUBSTANCES BY USING BACTERIAL AND CELL
CULTURE TESTS****Berrin AYAZ TÜYLÜ****Anadolu University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Program****Supervisor: Assist.Prof.Dr.Hülya ZEYTİNOĞLU
2001, 113 pages**

In this study, possible mutagenic activity of 5 derivatives of 2-substitue phenyl benzothiazole which are classified in BT,3 B-10, BT,15, BT-18 and BT 26 codes whose antibacterial, antifungal, antiinflamatuar, analjesic and antitumor effects are known are synthesized as a prodrug substance, were investigated by using bacterial and cell culture tests. According to the result of Salmonella microsome test which is used as bacterial method, BT-18 and BT-26 coded benzothiazole derivatives whose phenyl rings possess nitro group in orto and para positions, showed fairly effective mutagenic activity in circumstances with and without metabolic activation. On the other hand, it was determined that BT-3, BT-15 and BT-18 coded derivatives increased sister chromatid exchange in chromosomes of human lymphocyte culture after 48 hours when applied as 300 µg /ml doses. In chromosome aberration analysis of the same cells, higher values were obtained from several doses of some substances in respect to solvent control. Besides, it was determined that benzothiazole derivatives decreased replication and mitotic index of lymphocyte cells considerably and prevented cell cycle, According to this data, it was concluded that tested benzothiazole derivatives may show different mutagenic activity for different test system and organisms and their mutagenic effects may be changed regarding to property of R-group bounded to their phenyl ring.

Key words : Mutagenicity, Ames, SCE, CA, RI, Benzothiazole

TEŞEKKÜR

Öncelikle, bu çalışmanın gerçekleştirilmesi için gereken koşulların sağlanmasında çok büyük emeği olan, bilgileri, önerileri ve yapıcı eleştirileri ile beni yönlendiren değerli danışman hocam Sayın **Yard. Doç. Dr. Hülya ZEYTİNOĞLU**'na, ve bölümün tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanı hocam Sayın **Prof. Dr. Ahmet ÖZATA**'ya, içtenlikle teşekkür ederim.

Tez çalışmasında uyguladığım bazı deneysel teknikler konusunda değerli bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen Sayın **Prof Dr. Mehmet TOPAKTAŞ** ve **Yrd. Doç. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI**'na, test maddelerini sentezleyen, Sayın **Prof Dr. İlhan IŞIKDAĞ** ve **Yrd.Doç.Dr. Asiye MERİÇ**'e laboratuvar çalışmasında yardımlarını gördüğüm **Araş Gör. Emel ERGENE**'ye ve **Nesil ERTORUN**'a, meslek yaşamımın ilk gününden bu yana aynı, odayı zorlukları hoş ve güzel anları paylaştığım çok değerli arkadaşım **Araş. Gör. A.Tansu KOPARAL**'a, son aşamadaki katkıları için sevgili arkadaşım **Yrd. Doç Dr. Emel SÖZEN**'e ve **Araş. Gör. Volkan KILIÇ**'a çok teşekkür ederim.

Ayrıca tüm yaşamım boyunca bana her konuda destek olan sevgili **aileme**, anlayışı ve sabırları için sevgili **eşime** ve **oğluma** teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Genetik Etkiler	5
1.1.1. Kromozom Seviyesinde Meydana Gelen Mutasyonlar	5
1.1.1.1. Anöplidizasyon	5
1.1.1.2. Klastogenesis	6
1.1.1.3. Moleküler düzeyde meydana gelen mutasyonlar	8
1.2. DNA Onarımı	10
1.2.1. DNA Polimeraz Proofreading ile Onarımı.....	11
1.2.2. Fotoreaktivasyon ile Onarımı	11
1.2.3. Alkilasyon Hasarının Onarımı.....	11
1.2.4. Kesme Çıkarma Onarım Yolu	12
1.2.5. AP Bölgelerinin Onarımı	12
1.2.6. Yanlış Eşleşme Onarımı.....	13
1.2.7. SOS Onarım Mekanizması	13
1.3. Mutajenite Test Sistemleri	15
1.3.1. Bakteriyel Yöntemler.....	15
1.3.1.1. Salmonella / mikrozom (Ames) test	16
1.3.1.2. E.coli lac I mutasyon test sistemi	19
1.3.1.3. Umu (SOS) test sistemi	20
1.3.2. Sitogenetik Metodlar	21
1.3.2.1. Yapısal kromozom bozulma testi (CA)	21
1.3.2.2. Mikronukleus testi (MN).....	22

1.3.2.3. Comet testi.....	24
1.3.2.4. HPRT mutasyon testi.....	25
1.3.2.5. Kardeş kromatid değişimi (SCE) testi.....	25
1.4. Genotoksik Etkili Kimyasal Ajanlar.....	28
1.4.1. Alkilleyici Ajanlar.....	28
1.4.2. Çapraz Bağlayıcı Ajanlar.....	29
1.4.3. Psoralenler.....	30
1.4.4. Baz Analogları.....	31
1.4.5. Klastojenik Faktörler.....	31
1.4.6. Elektrofilik Tepkimelerle Metabolize Olan Kimyasallar.....	32
1.4.7. Metabolik Aktivasyon Reaksiyonları Sonucu Aktif Olan Bazı Kimyasallar.....	33
1.5. Toksik Bileşiklerin Metabolizması.....	35
1.5.1. Birinci Evre Reaksiyonları.....	36
1.5.1.1. Oksidasyon reaksiyonları.....	36
1.5.1.2. Redüksiyon reaksiyonları.....	36
1.5.1.3. Hidroliz reaksiyonları.....	37
1.5.2. İkinci Evre Reaksiyonları.....	37
1.5.2.1. Sülfatlama.....	37
1.5.2.2. Glukuronidasyon.....	37
1.5.2.3. Glutatyon konjugasyonu.....	38
1.5.2.4. Amino asit konjugasyonu.....	38
1.5.2.5. Metilasyon.....	39
1.6. Benzotiyazol'ün Biyolojik Aktivitesi.....	39
1.7. Amaç.....	42
2. MATERYAL VE METOD.....	43
2.1. Test Maddeleri.....	43
2.2. Salmonella Mikrozom (Ames) Testi.....	45
2.2.1. Kimyasal Maddeler.....	45
2.2.2. Salmonella typhimurium Test Suşları.....	45
2.2.3. Metod.....	45

2.2.3.1. Master plaklarının hazırlanması	45
2.2.3.2. Stoklama ve stok kültürlerinin açılması.....	46
2.2.3.3. <i>Salmonella</i> suşlarının kontrol testleri	46
2.2.3.4. Sıvı kültürün ml'sindeki bakteri sayısının belirlenmesi ...	48
2.2.3.5. Test maddelerinin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi.....	48
2.2.3.6. Memeli karaciğer mikrozomlarının hazırlanması.....	49
2.2.3.6.1. Mikrozomal fraksiyonunun miktarının tespiti.....	50
2.2.4. Ames Mutajenite Testinin Yapılışı.....	50
2.2.4.1. S9'suz (-) deneyler.....	50
2.2.4.2. S9'lu (+) deneyler.....	51
2.2.5. Sonuçların Değerlendirilmesi.....	51
2.3. Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) Yöntemi	51
2.3.1. Kimyasal Maddeler.....	51
2.3.2. Yöntem.....	52
2.3.2.1. Lenfosit kültürü	52
2.3.2.2. Sitotoksik etkinin belirlenmesi	52
2.3.2.3. Test maddelerinin uygulanması.....	52
2.3.2.4. Lenfositlerin izolasyonu.....	53
2.3.2.5. Preparat hazırlanması.....	53
2.3.2.6. Preparatların ışınlanması ve boyanması.....	54
2.3.3. Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) Sayısının Saptanması	55
2.4. Kromozom Bozulmaları (CA) 'nın Saptanması.....	56
2.5. Replikasyon İndeksinin (RI) Saptanması	56
2.6. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması	57
3. BULGULAR.....	59
3.1. <i>S.typhimurum</i> Suşlarının Kontrolü	59
3.2. Sitotoksik Dozların ve Mikrozomal Enzim Miktarının Belirlenmesi	59
3.3. Benzotiyazol Türevlerinin <i>S.typhimurium</i> Üzerine Mutajenik Etkileri..	60
3.4. SCE İçin Farklı Boyama Yöntemlerinin Uygulanması	63
3.5. Lenfosit Hücrelerinde M1, M2, M3 Safhalarının Belirlenmesi	63
3.6. Benzotiyazol Türevlerinin SCE Üzerine Etkileri.....	68

3.7. Benzotiyazol Türevlerinin Uygulandığı İnsan Lenfositlerinde RI ve MI.....	68
3.8. Benzotiyazol Türevlerinin Kromozom Bozulması Üzerine Etkileri.....	74
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	80
5. KAYNAKLAR.....	84
6. EK-1. DENEYDE KULLANILAN ORTAMLARIN İÇERİKLERİ ..	104

ÇİZELGELER DİZİNİ

	_ Sayfa
1.1. İnsan popülasyonunda görülen anöploid anomaliler	6
1.2. Yaygın olarak kullanılan Salmonella typhimurium suşları	17
2.1. Benzotiyazol ve deneyde mutajenik etkileri test edilen türevlerinin kimyasal özellikleri	44
2.2. BrdU'nun DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin şematik gösterimi	58
3.1. Mikrosomal fraksiyonun miktar tespiti	60
3.2. Benzotiyazol BT(3), BT(10), BT(15), BT(18) ve BT(26)' nın Salmonella Mikrozom testinde Salmonella typhimurium TA98 ile verdiği cevaplar	61
3.3. Benzotiyazol BT(3), BT(10), BT(15), BT(18) ve BT(26)' nın Salmonella Mikrozom testinde Salmonella typhimurium TA100 ile verdiği cevaplar	62
3.4. (BT - 3) 2 - (o - hidroksifenil) - benzotiyazol maddesinin insan periferal kan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi	69
3.5. (BT - 10) 2 - (m - bromofenil) - benzotiyazol maddesinin insan periferal kan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi	69
3.6. (BT - 15) 2 - (o - metoksifenil) - benzotiyazol maddesinin insan periferal kan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi	70
3.7. (BT - 18) 2 - (o - nitrofenil) - benzotiyazol maddesinin insan periferal kan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi	70
3.8. (BT - 26) 2 - (m - nitrofenil) - benzotiyazol maddesinin insan periferal kan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi	71
3.9. Benzotiyazol BT(3), BT(10), BT(15), BT(18) ve BT(26)' nın maddelerinin DNA replikasyonu ve mitoz bölünme üzerine etkisi	76
3.10. (BT - 3) 2 - (o - hidroksifenil) - benzotiyazol maddesinin kromozom aberasyonları (CA) üzerine etkisi	77
3.11. (BT - 10) 2 - (m - bromofenil) - benzotiyazol maddesinin kromozom aberasyonları (CA) üzerine etkisi	77

3.12. (BT - 15) 2 - (o - metoksifenil) - benzotiyazol maddesinin	
kromozom aberasyonları (CA) üzerine etkisi.....	78
3.13. (BT - 18) 2 - (o-nitrofenil) - benzotiyazol maddesinin	
kromozom aberasyonları (CA) üzerine etkisi.....	78
3.14. (BT - 26) 2 - (m - nitrofenil) - benzotiyazol maddesinin	
kromozom aberasyonları (CA) üzerine etkisi.....	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

3.1. İnsan lenfosit kromozomlarında kardeş kromatid değişimleri	64
3.2. Hoechst 33258 ile boyanmış insan lenfositlerinde ikinci mitoz bölünme kromozomları	65
3.3. a-) Giemsa ve b-) Hoechst 33258 ile boyanmış insan lenfositlerinde birinci mitoz kromozomları	66
3.4. Giemsa ile boyanmış insan lenfositlerinde a-)ikinci ve b-) üçüncü mitoz bölünme kromozomları	67
3.5. İnsan lenfositlerinde benzotiyazol türevleri uyarısıyla oluşan a-) kardeş kromatid birleşmesi ve kromatid kırığı ve b-) kromatid kırığı.....	72
3.6. İnsan lenfositlerinde benzotiyazol türevleri uyarısıyla oluşan a-) kromatid kırığı ve b-) disentrik kromozom	73

SİMGELER VE KISALTMALAR

SCE	: Kardeş kromatid değişimi
CA	: Kromozom aberasyonu
MI	: Mitotik indeks
RI	: Replikasyon indeksi
MMC	: Mitomisin C
SA	: Sodyum azid
4 NFD	: 4 – nitrofenilendiamin
2-AF	: 2 – aminofluoren
DMSO	: Dimetil sülfoksit

1. GİRİŞ

Teknolojik gelişmelerin insan yaşamına sunduğu, fiziksel ve kimyasal ajanların da dahil olduğu çok sayıda çevresel faktör, sağlık açısından tehlike oluşturma boyutundadır ve insanın genetik bütünlüğünü tehdit etmektedir. (Jagetia ve ark. 2001). Günlük yaşama önemli ölçüde giren X-ışınları, γ (gamma) ışınları, televizyon, telsiz telefon, mikrodalga fırın, radyoaktif atıklar, nükleer silahlar ve santraller gibi radyasyon kaynaklarının hatalı ya da kötü amaçlarla kullanımının, biyolojik sistemlere zarar verdiği kanıtlanmıştır (Vijayalaxami ve Tice 1992). Buna karşın pek çok genetikçi mutajen kimyasalların, radyasyondan çok daha zararlı olduğuna inanmaktadır. Çünkü radyasyon kaynağını tespit etmek, miktarını ölçmek ve korunma önlemi almak olası iken, aynı anda uzun süreli olarak, birçok kompleks kimyasal madde karışımına maruz kalan bireylerin uğradığı zararın analizi çok daha zor olmaktadır. Diğer yandan kimyasal mutajen kaynakları sınırsızdır. Çünkü farklı alanlarda, her çeşit kimyasal madde üretilerek kullanıma sunulmakta ya da çevrenin bir parçası haline almaktadır.

Kimyasal maddelerin olası mutajenik aktivitelerini araştıran ilk çalışmalar ikinci dünya savaşından hemen sonra bir grup kimyasal üzerinde yapılmış ve ilk olarak mustard gazının etkili bir mutajen olduğu tespit edilmiştir. Ardından dünyanın hemen her yerinde yapılan deneylerle, diğer bazı kimyasallara dikkat çekilmiştir. 1972 yılında yapılan bir araştırmada yiyecekleri renklendirme, koruma ve diğer amaçlarla kullanılan 2500 kadar katkı maddesi olduğu tespit edilmiştir. Yiyeceklere bulaşarak vücuda giren pestisitler ve çeşitli amaçlarla kullanılan ilaçlar üzerinde durulmuştur ve bu sayede pek çok mutajenite test sistemi geliştirilmiştir (Pai 1985).

1976'da Çevre Koruma Birliği (Environmental Protection Agency = EPA), "mutajenite test yöntemlerinin gözden geçirilerek seçilmesi (Gene-Tox)" konulu bir programa başlamıştır. Benzer kuruluşların varlığı ile toplumlar kimyasal çevre kirliliğinin biyolojik etkileri hakkında bilgi edinmişler ve duyarlılık kazanmışlardır (Pai 1985). 1980'li yılların başında yeni ve ilginç bir araştırma alanı olarak gelişmeye başlayan çevresel mutagenesis çalışmaları ile insandaki çeşitli patolojik olgulardan, somatik hücre mutasyonlarının sorumlu olduğunu ileri sürülmüştür. Bu hastalıklar içinde, atherosklerotik plaklar, senile

katarakt, safra kesesi hastalığı, gastro-intestinal metaplasis ve ülser yer almaktadır. Aynı araştırmacı yüksek organizmalardaki yaşlanma mekanizmasında ve kanser hastalığında da çevresel faktörlerin neden olduğu mutasyonların önemli rol oynadığını vurgulamıştır (Hartman 1983, Hartman ve Aukerman 1986).

Mutajenlerin etki mekanizması kesin olarak aydınlatıldıktan sonra belirli çevresel mutajenlerin insanda kansere sebep olabileceği şüphesi doğmuştur. Mutajenite ve karsinojenite arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma ile bilinen 175 karsinojenik maddenin 157'sinin aynı zamanda mutajen olduğu ve karsinojenite ve mutajenite arasında %90 oranında bir bağlantı olduğu ileri sürülmüştür. Bu ajanların, hücrelerde somatik mutasyonları uyararak kansere neden olması, kanserin somatik mutasyon teorisiyle bağdaşmaktadır (Griffiths ve ark. 1996).

Güney Afrika ve Doğu Asya'da çok yaygın olarak görülen karaciğer kanseri ile bu bölgelerde yüksek oranda maruz kalınan Aflotoksin B₁ arasındaki ilişki araştırılmıştır. Sonuçta Aflotoksin B₁ in neden olduğu baz çifti mutasyonunun karaciğer kanserli hastaların p53 genindeki mutasyonla aynı olduğu görülmüş ve bu mutasyon tipi bölgedeki karaciğer kanserinin temel nedeni olarak değerlendirilmiştir. Aynı bağlantı, deri kanseri hastalarının p53 genindeki T:C dimerleri ile, UV radyasyonunun neden olduğu pirimidin dimer oluşumu şeklindeki mutasyonlar arasında da kurulmaktadır (Griffiths ve ark. 1996).

Modern çevre bireyleri, gelişen teknoloji gereği çok geniş spektrumlu kimyasal madde çeşitlerine maruz bırakılmaktadır. Ancak her hafta yüzlerce yani kimyasal ürün piyasada yerini almaktadır ve bunların insan kullanımına sunulmadan önce genotoksik potansiyel açısından test edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle kısa zamanlı in vitro test sistemlerinin kullanılması oldukça avantajlı olup yaygın olarak bir çok laboratuvarında uygulanmaktadır. Mutajenite test sistemleri içinde, kısa zamanlı bakteriyal testler daha basit, hızlı ve ekonomik olmaları nedeniyle genel kabul görmekte, genotoksik ajanların, taranması ve yasal uygulamaların yapılmasında önemli rol oynamaktadır (Lelie ve ark. 1997). 1973'ten bu yana geliştirilen kısa zamanlı bakteriyal testler içinde en önemli olanları Ames (Salmonella/Mikrozom) test, SOS (umu) test'tir.

Bakteriyal testler, prokaryotik hücrelerdeki özgül mutasyonları belirleme özelliğine sahip olduğu için, geniş çaplı genetik hasarları ve DNA'sı

kromozomlarda organize olmuş daha yüksek yapılı organizmalardaki genetik değişimleri belirlemede yetersiz olmaktadır (Gatehouse ve ark. 1990). Aynı zamanda diploit ökaryotların üreme hücrelerindeki kalıtsal genetik riskleri saptamada da güvenilir sayılmazlar. Bu nedenle genellikle memeli hücrelerinin kullanıldığı *in vivo* ve *in vitro* test yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlar arasında kromozom düzeyindeki genetik hasarları saptayabilen, kromozom aberasyon (CA), kardeş kromatid değişimleri (SCE) ve mikronükleus (MN) testi gibi sitogenetik metodlar ve DNA'daki daha küçük boyutlu hasarları belirleyen hipoksantin guanin fosforibosil transferaz (HPRT) gibi gen mutasyon testleri bulunmaktadır (Gatehouse ve ark. 1990).

Sözü edilen yöntemlerin tümü sözkonusu olası mutajenik etkileri saptamak amacıyla, bağımsız (Wu ve ark. 2000) ya da birkaçı birlikte (Gasiorowski ve ark. 2001, Alejandro ve Bianchi 2001) karşılaştırmalı olarak kullanılmaktadır. Bir testte pozitif olan diğerinde negatif olabilir ya da değişik mutasyona neden olabilmektedir. Örneğin, bir tren kazası sonucu mutajenik ve karsinojenik özellikleri bilinen atmosferik vinil klorüre maruz kalan insan popülasyonundan 2 yıl ara ile alınan kan örnekleri ile yapılan HPRT testinde mutajenik etki saptanmazken, kromozomlar üzerinde oldukça önemli klastojenik etki olduğu CA testi ile gösterilmiştir (Becker ve ark. 2001).

Bu testlerin son yıllardaki en önemli kullanım alanlarından biri, çevresel ya da mesleki olarak belirli ajanlara sürekli maruz kalan bireylerin genetik yapılarının izlenmesi ve hasar tipinin belirlenmesidir. Gomez-Arroyo ve ark. (2000)'nın yaptığı bir çalışmada, pestisitlere sürekli maruz kalan bir grup Meksikalı tarım işçisinin lenfosit ve ağız epitel hücrelerindeki genotoksik etki SCE ve Mikronükleus testleri ile araştırılmış ve kontrol grubuna göre önemli ölçüde SCE ve mikronükleus oluşumu gözlenmiştir. Bir başka çalışma İsrail'de, yine pestisitlere maruz kalan sera işçileri üzerinde yapılmış ve bu işçilerdeki SCE sıklığının önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (Shaham ve ark. 2001). Taiwan'daki kaynak işçilerinin maruz kaldığı kromun genotoksik etkileri SCE testi ile (Wu ve ark. 2000), Hindistan'daki çimento fabrikası işçilerinin etkilendiği çimento tozunun sitogenetik etkileri de CA testi ile (Fatima ve ark. 2001) araştırılmış ve her iki çalışmada da pozitif sonuçlar elde edilmiştir.

Testlerin diğerk bir kullanım alanı da çevresel kaynaklardan izole edilen kirletici ajanların mutajenik etkilerinin araştırılmasıdır. Bir çalışmada lastik endüstrisindeki havadan izole edilen kimyasal ajanların analizi yapılmış ve genotoksik etkileri Ames ve Comet testi ile endüstride solunan havada çok kuvvetli mutajenlerin bulunduğu saptanmıştır (Monarca ve ark. 2001). Aynı mantıkla su kaynaklarının kirliliğine sebep olan etkenlerin izole edilip mutajenik etkilerinin araştırıldığı benzer çalışmalar da bulunmaktadır (Park ve ark. 2000, Lemos ve Erdtmann 2000).

Genotoksisite testlerinin önem kazandığı araştırma konularından biri de sentez edilerek farklı alanlarda kullanıma sunulan ya da sunulacak olan, kimyasal bileşiklerin mutajenik/karsinojenik potansiyellerinin ya da antimutajenik / antikarsinojenik özelliklerinin tespit edilmesidir. Laffon ve arkadaşları (2001), polistren plastik, polyester ve reaine yapımında ticari olarak kullanılan ve aromatik bir koku olan strene-7,8, oxid'in genotoksik etkisini SCE, MN ve Comet testi ile araştırmışlar ve bu maddenin her 3 testte de mutajenik etkili olduğu sonucuna varmışlardır. Bigatti ve arkadaşları (1998) tarafından, psikofarmakolojik ilaç tedavisi gören kişilerin lenfositlerinde SCE ve CA oluşumunun kontrol grubuna göre yüksek olduğu rapor edilirken, başka bir çalışmada antipsikotik bir ilaç olan fluphenazinin antimutajenik etkili olduğu Ames test ve sitokinez bloke mikronukleus (CBMN) yöntemi ile gösterilmiştir (Gasirowski ve ark. 2001). Bir antimikrobiyal ilaç olan trimethoprim'in ise *in vitro* insan lenfosit kültüründe uygulanan SCE ve MN testlerinde genotoksik potansiyel sergilediği bildirilmiştir (Abou-Eisha ve ark. 1999). Benzer şekilde, uzun süreli olarak antibiyotik ilaç olan furagin tedavisi gören bir grup hastanın lenfosit kromozomlarındaki genotoksik etki testleri, CA oluşumu bakımından negatif iken, SCE oluşumu yönünden pozitif sonuçlar vermiştir (Slapsyte ve ark. 2001).

1.1. GENETİK ETKİLER (Genotoksisite)

Toksik maddelerin genetik materyal ile etkileşimi ve bunun sonucunda meydana gelen mutasyon çeşitleri, kromozom seviyesinde ya da moleküler seviyede olmak üzere iki farklı mekanizma ile açıklanmaktadır.

1.1.1. Kromozom seviyesinde meydana gelen mutasyonlar

1.1.1.1. Anöplodizasyon

Bazı toksik maddelerin normal kromozom setinde bir ya da birkaç kromozomun eksilmesi ya da eklenmesiyle sonuçlanan anöplodizasyona neden oldukları gösterilmiştir (Torous ve ark. 1998). Anöplodi hayvanlarda çoğu kez ölümcüldür, bu nedenle memelilerin ölü doğan fetüslerinde saptanabilmektedir (Russell 1998). Bölünme olaylarında kromozomların eşit olarak yavru hücrelere geçmesi için; sentriollerin doğru pozisyon alması, kromozomların metafazda doğru şekilde yerleşmesi ve iğ iplikçiklerinin oluşumu gereklidir. Bu süreçte, herhangi bir etkene maruz kalma ve yaşlanma kromozom sayısında bir değişiklikte sonuçlanabilir (Güven 1999). Mitoz sırasında kardeş kromatidlerin, mayozda ise homolog kromozomların, düzensiz ve eşit olmayan paylaşımı sonucunda oluşan hücre çekirdeklerinden biri normalden çok, diğeri de az sayıda kromozoma sahip olmaktadır. Yapılan bir araştırmada insan prostat kanserinin tedavisinde antineoplastik ilaç olarak kullanılan "estramustin"nin, insan lenfositlerinde anöplodi'ye sebep olduğu gösterilmiştir (Migliore ve ark. 1998).

Anöplodinin bütün formları mayoz sonrası ciddi sonuçlar doğurur. Memelilerde X kromozomunun aktivasyonundan dolayı, seks kromozomlarındaki anöplodizasyon, otozomlarda olandan çok daha sık görülmektedir. İnsanda otozomal monosomi ($2n-1$) çok nadir olarak, gelişmeden ölen embriyolarda görülmektedir (Russell 1998). Buna karşın fetal ölümlere sebep olan anöplod anomalinin yarısını, otozomal trisomi ($2n+1$) oluşturmaktadır. Sadece birkaç otozomal trisomi tipinde canlı doğumlar görülür, ancak bunların çoğunda erken ölüm meydana gelmektedir. Sadece 21. kromozomun trisomisi olan Down sendromunda bireyler yetişkinlik çağına gelebilmektedir (Griffiths ve ark. 1996). Down sendromlu bireylerin, çeşitli mutajenlere ve radyasyona çok hassas olmaları nedeniyle, malignan hastalıklara yakalanma risklerinin yüksek olduğu

belirtilmiştir. Bu kanıyı destekleyen bir çalışmada, Down sendromlu yeni doğanların lenfositlerine, in vitro olarak uygulanan mavi ve yeşil ışık fototerapisinin, SCE oluşumunu sağlıklı bebeklere göre daha fazla arttırdığı gösterilmiştir (Wu ve ark. 1996). İnsan popülasyonunda görülen çeşitli anöploid anomaliler Çizelge 1.1.'de özetlenmiştir.

Çizelge 1.1. İnsan popülasyonunda görülen anöploid anomaliler (Russell 1998).

Kromozomlar	Sendrom	Doğumda görülme sıklığı
Otozomlar		
Trisomik 21	Down	14.3 / 10.000
Trisomik 13	Patau	2 / 10.000
Trisomik 18	Edwards	2,5 / 10.000
Seks Kromozomu (Kadın)		
XO, monosomik	Turner	4 / 10.000
XXX, trisomik	Yaşayabilir	14,3 / 10.000
XXXX, tetrasomik	“	“
XXXXX, pentasomik	“	“
Seks Kromozomu (Erkek)		
XYY, trisomik	Normal	25 / 10.000
XXY, trisomik	Klinefelter	40 / 10.000
XXYY, tetrasomik	“	“
XXXY, tetrasomik	“	“

1.1.1.2. Klastojenesis

Bazı genotoksik etkenlerin, özellikle de alkilleme özelliğine sahip ajanların, kromozomlarda parça kaybı, ilavesi veya yer değiştirmesi şeklinde etkili oldukları bilinmektedir. Bu olay “klastojenesis”, neden olan faktörler de “klastojen” olarak bilinmektedir (Friedberg ve ark. 1995). Kromozomlardaki yapısal değişiklikler, kromatid kollarında meydana gelen kırılmalardan kaynaklanmaktadır. Kırılmanın olduğu yere, kırılma tipine, sayısına ve kırılan parçaların tekrar birleşme özelliğine göre, çok çeşitli kromozom mutasyonları meydana gelebilmektedir (Güven 1999, Pai 1985). Kromozom mutasyonları, “kromozom aberasyonları” olarak da bilinmektedir.

Bir sonraki nesil hücrelere aktarılmayan yapısal kromozom değişiklikleri; kromatid ve kromozom kollarındaki boşluklar (gap), kromatid kırılmaları (fragment), kromatid uçlarının birleşmesi (sister union), halka kromozom oluşumu (ring) ve disentrik kromozomları kapsamaktadır. Servix, meme, tiroid ve akciğer kanseri olan hastaların lenfositlerinde, spontan klastojenik etkiyi araştıran bir çalışmada, gap, kromozom ve kromatid tipi kırıklar, translokasyon ve disentrik kromozom gibi aberasyonların, kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek olduğu tesbit edilmiştir. Tüm gruplarda gözlenen gap, kromozom ve kromatid tipi kırıkların, meme kanserli hücrelerde en yüksek değere ulaştığı vurgulanmıştır (Sobti ve ark. 1991). Yeni sentezlenen bir akrinin türevinin, insan lenfositlerinde, özellikle kromatid gaplarına sebep olduğu (Ferenc ve ark. 1999), bir antitümör antibiyotik olan, streptonigrin'in ise disentrik, halka, kırılma ve gap tipinde kromozom ve kromatid hasarlarına yol açtığı bildirilmiştir (Bolzan ve Bianchi 2000).

Bir sonraki nesil hücrelere aktarılan sabit değişiklikler ise delesyon, duplikasyon, inversiyon, translokasyon olmak üzere 4 şekilde meydana gelmektedir (Griffiths ve ark. 1996, Russell 1998). Delesyonun, ısı, radyasyon, virüsler, kimyasallar, transpozibil elementler ya da hatalı rekombinasyon gibi ajanların neden olduğu kromozom kırığından parça kopmasıyla meydana geldiği bildirilmiştir (Bolzan ve Bianchi 2001). Ayrıca kromozomal delesyonların, özellikle meme kanserinde görülen patolojik bir gösterge olduğu da bilinmektedir (Popescu ve Zimonjic 1997).

Bir kromozom segmentinin kromozom üzerinde çift olarak taşınması şeklinde oluşan "Duplikasyon" gen ailelerinin evriminde önemli bir role sahiptir. Örneğin hemoglobin molekülü iki altünitenin herbirinden iki kopya içermektedir (Russell 1998, Gardner ve ark. 1991). İnversiyon, kromozomdan kopan bir parçanın 180 derece ters dönerek koştığı bölgeye tekrar bağlanmasıdır. İnverte olan segment, sentromer içeriyorsa "perisentrik inversiyon", içermiyorsa, "parasentrik inversiyon" olarak adlandırılır (Griffiths ve ark. 1996).

Kromozom segmentlerinin ve içerdikleri gen dizilerinin pozisyon değişikliği ile karakterize edilen translokasyon tipi mutasyonda, genetik materyalde bir kazanç ya da kayıp olmamaktadır. Bir kromozom segmentinin aynı

kromozom üzerindeki konumunun değişimi ile (intrakromosomal translokasyon) ya da kromozom segmentinin homolog olmayan başka bir kromozoma transferi (inter kromozomal translokasyon) şeklinde meydana gelmektedir. Bir polimeraz inhibitörü olan, 3 aminobenzamid'in, Chinese hamster hücrelerinde (Dominguez ve ark. 2000), gama radyasyonunun ise, fare polikromatik ve normokromatik eritrosit kromozomlarında translokasyona sebep olduğu (Sorensen ve ark. 2000) tesbit edilmiştir. İnterkromozomal translokasyonda iki kromozom arasında karşılıklı parça değişimi söz konusu ise oluşan mutasyon, resiprokal translokasyon'dur. Yapılan araştırmalarda, bu mutasyon tipinin onkogenleri aktif hale getirerek, pek çok kanser olgusunda etkili olduğu bulunmuştur. Popescu ve Zimonjic (1997) lösemi ve lenfoma türü kanserlerde, yaygın olarak translokasyon tipi mutasyonun görüldüğünü bildirmiştir .

Fiziksel mutajenlerden, iyonize radyasyonun DNA ipliğinde kırılma, kopma ve translokasyonlara yol açtığı (Lazuka ve ark. 1999) gösterilmiş, kimyasal bileşiklerden, merküri ve kurşun gibi ağır metaller, organik stren, formaldehit, fenol, benzopren, inorganik sülfür, nitrojen oksit, hidrojen ve amonyum florit gibi çevresel ajanların (Lazuka ve ark 1999) ve kirleticilerin (Fender ve Wolf 1998) de benzer ve disentrik kromozom, asentrik fragment gibi farklı etkilere sahip olduğu vurgulamıştır. Antiklastojenik etkenleri belirlemeye yönelik bir çalışmada da, vitamin D3'ün lenfoma türü kanserli farelerde CA ve SCE oluşumunu baskılayarak, tümör gelişimini yavaşlattığı ileri sürülmüştür (Sarkar ve ark. 2000).

1.1.2. Moleküler düzeyde meydana gelen mutasyonlar

Moleküler düzeyde genlerin DNA dizilerinde meydana gelen mutasyonlar, kendiliğinden oluşabildiği gibi (spontan mutasyonlar), bazı fiziksel ya da kimyasal ajanlarla uyarılarak da gerçekteşebilirler (indüklenen mutasyonlar) (Bolsover ve ark. 1997, Griffiths ve ark. 1996, Friedberg ve ark. 1995).

Genellikle bir baz çiftinin etkilendiği nokta mutasyon tipleri düşük oranda spontan olarak meydana gelebilmektedir. Ökaryotlarda spontan mutasyon oranı jenerasyondaki gen başına 10^{-4} - 10^{-6} iken, bakteriler ve fajlarda 10^{-5} - 10^{-7} civarındadır. Spontan mutasyonlar, DNA replikasyonundaki hatalardan, DNA'

daki spontan kimyasal değişmelerden (tatomerik değişim ya da metilasyon), genlerdeki kırılmalardan ve transposibil genetik elementlerin hareketinden kaynaklanır. oğunluğu hücreyel onarım mekanizmalarıyla düzeltilebilir olan spontan mutasyonların birikiminin, kanser olgusunda önemli rolü olduğu da bilinmektedir (Simpson 1997).

Kısa ve görünür ışıktan daha yüksek dalga boyları içeren elektromanyetik spektrumun bir kısmı iyonize radyasyon (x ışını, kozmik ışınlar) ve diğer kısmı iyonize olmayan radyasyon (UV ışığı) şeklinde, çoğunlukla pirimidin dimeri oluşumuna neden olurlar (Katsifis ve ark. 1996, Otoshi ve ark. 2000). Alkilleyici ajanlar ve nitroz asiti gibi bazı kimyasal bileşikler, hem replike olan, hem de olmayan DNA üzerinde mutajen etkili iken, akridin boyaları ve baz analogları gibi kimyasallar, sadece replike olan DNA ile etkileşime girebilirler (Gardner ve ark. 1991). Kimyasal mutajenlere ilişkin ayrıntılı bilgi 1.4'de verilmektedir.

Spontan olarak ya da indüklenerek, bir genin genomdaki sayısı ve kromozom üzerindeki yeri değişmeksizin, yapısı değişebilmektedir. "Gen mutasyonu" ya da "nokta mutasyon" olarak bilinen mekanizma temel olarak üç şekilde meydana gelmektedir:

1-Transisyon : DNA zincirindeki bir pürin ya da pirimidinin, başka bir pürin ya da pirimidin ile yer değiştirmesidir. 4 şekilde olabilmektedir. Hücre siklusunun herhangi bir safhasında meydana gelebilir. Adenin ve sitozin bazları, nitroz asit gibi bir ajanla deamine edildiğinde, adenin hipoksantine, sitozin ise urasile dönüşür. A:T'nin G:C'ye değişimi ile ikinci replikasyon sırasında mutajenik bir transisyon oluşabilir. Mutajenik vinil klorürün adenin ve sitozini alkilleyerek, sırasıyla A:T-C:G ve C:G-A:T transformasyonlarını gerçekleştirdiği (Bartsch ve ark. 1976, Barbin ve ark. 1997), N-etil-N-nitrosouea'nın ise C:G-A:T şeklindeki transisyonları uyardığı (Eckert ve Opreska 1999) gösterilmiştir.

2-Transversiyon : Bir pürin bazının, pirimidin bazı ile ya da bir pirimidin bazının, pürin ile yer değiştirmesi durumudur. 8 durumda oluşabilmektedir. Bu tip baz çifti değişimi sadece DNA molekülünün replikasyonu sırasında meydana gelmektedir. Timin analogu olan mutajenik 5-bromo-urasil, replikasyon esnasında timinin yerini alarak, adeninle eşleşmektedir.

Bir antitümör antibiyotik olan, streptonigrin'in, Salmonella TA 104'te A:T-T:A tipi transversiyona sebep olduğu (Alejandro ve Bianchi 2001), aflatoksin B1'in sıçan p53 geninde (Lee ve ark.1998), çevresel mutajenlerden polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) benzo(a)pre'nin ise memeli sistemlerde, C:G-T:A tipi transversiyonu uyardığı (Perlow ve Broyde 2001) gösterilmiştir.

3-Çerçeve Kayması Mutasyonu : DNA zincirinde çoğunlukla sık tekrar eden baz dizilerinin bulunduğu "polindromik bölgeler" de, bir veya birkaç baz çiftinin eklenmesi ya da çıkması ile meydana gelen mutasyon şeklidir. Baz çiftinin DNA dizisine eklenmesine "insersiyon", DNA zincirinden kopup ayrılmasına "delesyon" adı verilir. Bu tip bir mutasyon, DNA'da baz çifti değişikliğinin olduğu yerden itibaren kodonların ve aynı zamanda kodlanan aminoasit diziliminin değişmesine neden olmaktadır. İnsan mtDNA'sının ilk stop kodonunda oluşan nokta mutasyonların, sitokrom c oksidaz sentezini engellemesi bu durumu gösteren güzel bir örnektir (Hanna ve ark. 1998).

Son yıllarda kimyasal kanserojenlerin ve radyasyonun, K-ras onkogeninin çeşitli kodonlarında yüksek oranda nokta mutasyon artışına sebep olduğu, deney hayvanları üzerinde gösterilmiştir (Zhang ve Woloschak 1998). Ayrıca, kronik pankreas hastalarının pankreas su örneklerindeki K-ras onkogeni nokta mutasyon sıklığının belirlenmesi ile pankreas kanseri riski için erken teşhis olanağı sağlanmıştır (Queneau ve ark. 2001).

1.2. DNA ONARIMI

Yukarıda anlatıldığı gibi spontan ya da indüklenen mutasyonlar DNA'da hasara sebep olmaktadır (Perlow ve Broyde 2001, Yang ve ark.1999, Frankfurt 1991, Sarker ve ark.1995, Sankaranarayanan 1998). Buna karşın, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde çeşitli onarım sistemleri gelişerek bu DNA hasarlarını giderme yolunda işlev görmektedir (Eisen ve Hanawalt 1999). Eğer onarım sistemi oluşan lezyonu tamamen gideremiyorsa, mutant hücre ya da organizmalar ortaya çıkmakta, onarılamayan lezyon büyükse hücre ölümü gerçekleşmektedir (Russell 1998, Gardner ve ark. 1991, Pai 1985). Bir hücrede bilinen DNA onarım mekanizmaları aşağıda açıklanmaktadır.

1.2.1. DNA Polimeraz Proofreading ile Onarım

Bakterilerde baz çiftlerinin spontan değişme sıklığı her replikasyon için 10^{-7} - 10^{-11} civarındadır. Diğer yandan DNA polimerazın yeni sentezlenen ipliğe nükleotidleri eklerken yaptığı hata sıklığı ise 10^{-5} 'dir. Bu iki değer arasındaki fark polimerazın proofreading aktivitesidir. Çoğu bakteriyal DNA polimerazın 5'-3' yönünde polimerizasyon, 3'-5' yönünde ise ekzonükleaz aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir. Bu sayede doğru olmayan nükleotidler 3'-5' yönünde çıkarılmakta ve sentez 5'-3' yönünde tekrarlanmaktadır. DNA polimerazın proofreading aktivitesi, çevresel mutajenlerden polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) tarafından engellenebilmektedir (Perlow ve Broyde 2001).

Ancak bazı bakterilerin taşıdığı mutator genler (*E.coli mut D* geni gibi) ve mutajenler, DNA polimeraz aktivitesine zarar vererek, yanlış nükleotitlerin eklenmesine ve hatanın tolere edilememesine sebep olmaktadır. Bu onarım yolu, kimyasal mutajenlerden, alkilicisi ajan N-etil-N-nitrosourea ile uyarıldığında yanlış baz çiftlerinin oluştuğu rapor edilmiştir (Eckert ve Opreska 1999). 3'-5' ekzonükleaz aktivite bakteriyal DNA polimeraza ait bir özelliktir. Ökaryot polimerazı böyle bir aktiviteye sahip değildir (Russell 1998, Griffiths ve ark. 1996).

1.2.2. Fotoreaktivasyon ile Onarım

UV ışığı uyarısıyla oluşan timin ya da diğer pirimidin dimerleri 320-370 nm dalga boylu görünür ışığın varlığında direkt olarak geri dönüştürülür. Fotoreaktivasyon ya da ışık onarımı denilen bu mekanizma, fotolizaz enzimi tarafından katalize edilir. Fotolizaz ışıkla aktif hale gelerek dimerleri ayırmaktadır. Fotolizaz tüm prokaryotlarda ve ilkel ökaryotlarda var iken insanda bulunmamaktadır (Thoma 1999).

1.2.3. Alkilasyon Hasarının Onarımı

Alkilleyici ajan olarak bilinen mutajenler, memeli hücre DNA'sındaki bazların ya da fosfatların reaktif bölgelerinde bulunan, N- ya da O- atomlarına metil ya da etil gruplarını aktarırlar (Calleja ve ark. 1999). Alkillenen bazlar yanlış baz eşleşmeleri yaparlar. DNA'daki bu hasar, metil transferaz enzimi ile

özgün bir şekilde onarılır. Bu enzim hatalı bazları değil, sadece onlara bağlı metil gruplarını kopararak uzaklaştırır (Russell 1998).

1.2.4. Kesme Çıkarma Onarım Yolu

Bu mekanizma 1964 yılında bir grup bilim adamı tarafından keşfedilen ve tüm canlılarda gerçekleşen bir onarım mekanizmasıdır (Theis ve ark. 2000). Alkilleyici ajanların genotoksik etkilerinin tolere edilebildiği bu sistem (Jin ve ark. 2001), dimerleri ışık gerektirmeyen bir reaksiyonla onardığı için “karanlık onarım” olarak da adlandırılır. *E.coli*'de sadece pirimidin dimerlerini değil, DNA heliksinin distorsiyonunu (bükülme, katlanma) uyaran ciddi hasarları da onarabilmektedir. Hasar *uvrA*, *uvrB*, *uvrC* genleri tarafından kodlanan *uvrABC* endonükleaz enzimi tarafından tanınmaktadır. Bu enzim DNA tek ipliğindeki hasarlı bölgede 12 nükleotidlik kısmı kesmekte ve oluşan boşluk DNA 5'-3' aktivitesiyle doldurulmaktadır. Bir araştırmada, antitümör antibiyotik analogu olan, adozelesin'nin *E.coli* DNA'sı ile oluşturduğu birliktelik, *uvrABC* endonükleaz enzimi ile koparılıp onarım etkin şekilde gerçekleşmiştir (Jin ve ark. 2001). Bu aktivitede çok nadir olarak, yanlış baz eklenmesi sonucu hatalar oluşabilmektedir. DNA'da iplik içi ve iplikler arası bağlantı yapan kimyasal ajanların bu onarım yolunu aktive ettiği bildirilmiştir (Dronkert ve Kanaar 2001, Dunkern ve ark. 2001). Detayları tam olarak bilinmemekle birlikte ökaryotlar da benzer bir onarım mekanizmasına sahiptirler (Elliott 2001, Russell 1998, Gardner ve ark. 1991)

1.2.5. AP Bölgelerinin Onarımı

DNA üzerindeki bazlarda deaminasyon gibi bir etki oluştuğunda, sitozin-urasile, adenin ise hipoksantine dönüşür. DNA glikosilaz enzimi bu anormal bazı tanıyarak ve hidroliz ederek diziden koparır. Böylelikle DNA baz dizisi üzerinde, küçük bir boşluk şeklinde meydana gelen Apürinik ya da Apirimidinik bölgeler (AP), AP endonükleaz tarafından tanınır. Mol (2000) ve arkadaşları tarafından, prokaryot ve ökaryotlarda homolog olduğu kaydedilen bu AP endonükleaz enzim grubu, DNA ipliğini AP bölgesi yakınından keserek bir çentik (nick) açar. Bu noktada DNA polimeraz I devreye girerek eksonükleaz aktivitesiyle birkaç

nükleotidi koparır. Ardından 5'-3' polimerizasyon aktivitesiyle, yeni iplik sentezi gerçekleşir ve eksik olan bazın yeri, doğru nükleotitle tamamlanır. DNA polimeraz I'in bu aktivitesi "nick translasyon" olarak adlandırılır. Alkilleyici ajanlardan metil metanosülfonat (MMS)'nin sebep olduğu DNA hasarının bu onarım yolunu uyardığı rapor edilmiştir (Grzesiuk ve ark. 2001)

1.2.6. Yanlış Eşleşme Onarımı (Mismatch Onarım)

DNA replikasyonundan sonra dizide yer alan yanlış baz eşleşmelerinin pek çoğu, yanlış eşleşme onarımı denilen diğer bir sistem tarafından düzeltilebilmektedir. Bu mekanizma *E.coli*'de *mut S*, *mut L* ve *mut H* genlerinin ürünleri tarafından başlatılır. Yanlış bazlar ekzonükleazla çıkarılır, DNA polimeraz III ve ligaz ile tamamlanır. Yanlış eşleşme onarımı, ökaryotlarda da *E.coli*'dekine çok benzer şekilde, ancak başka genler tarafından yürütülür. Bu genler *hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2* olarak belirlenmiştir. *hMSH2*, *E.coli*'nin *mut S* geni ile, diğer üç gen de *E.coli mut L* geni ile homoloji göstermektedir. Bu genlerin fonksiyon kaybı, genomdaki mutasyon birikimini arttırdığı için "mutator genler" olarak bilinirler. Mutant *hMSH2* ve *hPMS2* genlerinin kodladığı, hasarlı Msh2 ve Pms2 proteinlerinin, farelerin *lac I* geninde transisyon ve transversiyon tipi, *Sup F* geninde ise çerçeve kayması tipi nokta mutasyonları arttırdığı görülmüştür (Andrew ve ark. 2000).

Yanlış eşleşme onarım sistemi, insan genomunda oluşan spontan mutasyonların birikimini engelleyen ve kontrol altında tutan bir mekanizma olduğundan, eksikliği kansere zemin hazırlamaktadır (Simpson 1997). İnsan mismatch onarım genlerinden herhangi birinde oluşan mutasyonun, kolon kanserinin bir çeşitinde kalıtsal yatkınlık fenotipini ortaya çıkardığı bilinmektedir (Russell 1998).

1.2.7. SOS Onarım Mekanizması

Çeşitli mutajenler DNA'nın bir ya da daha fazla bazında mutasyon oluşturduğunda, özgül baz çiftleşmesi meydana gelememektedir. Bu da replikasyonun hatalı sonlanmasına, gapların ve replikasyon çatalının oluşumuna yol açmaktadır. *E.coli*'de diğer onarım mekanizmalarının gideremediği geniş çaplı

DNA hasarı tarafından uyarılan kompleks bir onarım sistemi vardır (Mckenzie ve ark. 2000). Bu sistem mutasyonel hasara karşı verilecek tepkiyi acilen uyardığı için, SOS cevap olarak bilinmektedir. SOS cevap, bazı yeni mutasyonların oluşumuna yol açsa da, hücrelerin yaşamasını sağlayacak işlevlere sahiptir, aksi halde ölümcül olaylar gelişebilmektedir.

SOS onarım sisteminde DNA hasarının onarımı pek çok enzimin senteziyle düzenlenmektedir. Bu sistemi kontrol eden 2 anahtar gen, *Lex A* ve *Rec A*'dır. DNA hasarının olmadığı durumlarda, *Lex A* geninin kodladığı *Lex A* proteini, 17 genlik bir transkripsiyon bölgesini baskılamaktadır. Genlerin tümü SOS kutusu denilen 20 nükleotidlik bir düzenleyici diziyeye sahiptir. Diğer anahtar genin sentezlediği *recA* proteini ise DNA hasarının oluşumu ile aktive olmakta ve DNA ipliğine bağlanarak, *Lex A* proteininin inaktivasyonunu sağlamaktadır. *Lex A*'nın inaktivasyonu, baskıladığı DNA onarım genlerinin transkripsiyona başlamasına olanak sağlamaktadır. Onarım, ifade edilen genlerin ürünleriyle gerçekleştirilmektedir ve sona erdiğinde genler, *Lex A* proteini ile tekrar baskılanmaktadır (Friedberg ve Hanawalt 1988).

SOS cevabın kendisi aynı zamanda, bir mutajenik sistemdir. Normal koşullarda DNA sentezi sırasında etkin olan SOS cevapda, bazlar, hatalı bölgede orijinal olarak hangi bazın bulunacağı belirlenmeksizin diziyeye eklenmektedir. Bu mekanizma *umu C* ve *umu D* genlerini de içerir ve "error-prone" olarak bilinir. UV radyasyonu ile oluşan pirimidin dimerlerinden (TT, TC, CT, CC), timin (TT) dimerleri SOS sistemde kopyalanarak, yeni DNA ipliğinde A-A baz dizilimi şeklinde düzeltilir. Ancak sitozin içeren dimerlerde, sitozin deamine olarak urasile dönüştüğü için, yeni iplikte karşısına adenin bazı sentezlenir ve orijinal C-G bölgesi, T-A'ya dönüşmüş olur. Bu transisyon, UV mutagenезisinin yaygın bir sonucudur. *Umu C* ve *Umu D* proteinlerinin ise DNA polimeraz III'e bağlanarak, adenin bazının dimer içeren bazların karşısına eklenmesini sağladığı düşünülmektedir (Griffiths ve ark. 1996).

1.3. MUTAJENİTE TEST SİSTEMLERİ

1.3.1. Bakteriyal Yöntemler

DNA çok farklı bölgelerde ve çeşitli mekanizmalarla hasara uğrayabildiği için hasarın direkt olarak gösterilmesi teknik olarak zordur. Kimyasalların insanda oluşturduğu mutajenite ve karsinojenite olgusunun belirlenmesinde bakterilerin kullanımı, yaşayan tüm canlıların ortak genetik materyali olan DNA'nın primer yapısının incelenmesi temeline dayanmaktadır. Fiziksel ya da kimyasal ajanların DNA'da meydana getirdiği hasar, bakteriyal mutasyonları ölçebilen kısa-zamanlı testlerle saptanmaktadır (Gatehouse ve ark. 1990). Bakteriler gecelik kültürlerinde çok sayıda gelişirler ve nadir mutasyonel olayların saptanmasına olanak tanırırlar. Ayrıca bakteriyal genetik bilgi ve deneyimlerinin artışı, çeşitli ajanlara karşı yabani tiplerinden daha hassas olan özel bakteri mutantlarının oluşturulmasına olanak sağlamıştır. Sadece çok az sayıda mutajen, belirli tek tip mutasyonel değişimi uyarırken, mutajenik ajanların çoğunluğu çeşitli faktörlere bağlı olan değişken bir mutajenik spektrum göstermektedir. Bu faktörlerin neden olduğu DNA değişimleri iki grupta ele alınabilirler; bunlar bazlardaki, fosfat ya da şeker gruplarındaki modifikasyonlar, iplik kırılmalarını ya da değişmiş baz çiftlerini kapsayan DNA'nın birincil yapı değişimleri ile organizmanın sözü edilen DNA modifikasyonlarına verdiği cevap olan DNA onarım mekanizmalarının işleyişi ve replikasyonun kardeş ipliklerde değişerek tamamlanması gibi ikincil değişimlerdir (Pai 1985, Griffiths ve ark. 1996, Friedberg ve Hanawalt 1988).

Bu nedenlerle aynı mutajen, farklı genetik birikime sahip organizmalarda farklı mutajenik etki sergileyebilmektedir. Bakteriyel testlerde, mutajenik etki, "ileri=forward" ve "geri=reverse" mutasyonları belirleyen yöntemlerle ölçülebilmektedir. İleri mutasyonu belirleyen genetik sistemler, geniş bir hedef bölgesinde gerçekleşen mutajen atağından sonra oluşan genetik değişimlerin fenotipe yansiyarak saptanmasını sağladığı için teorik olarak avantajlıdır. Ancak ileri-mutasyon sistemleri yaygın olarak meydana gelen mutasyonel olaylara karşılık, nadiren oluşan mutasyonların uyarılmasındaki artışı belirlemede başarısız olabilmektedir. Aminoasit analogları ya da ilaçlar gibi toksik kimyasallara karşı kazanılan direnç, ileri mutasyon için sıklıkla kullanılan genetik bir marker'dır.

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

Diğer yandan bakterileri kimyasal ve fiziksel ajanlarla mutasyona uğrama açısından daha hassas hale getirebilmek için, çeşitli işlemler uygulanmaktadır. Bunlar; DNA onarım mekanizmasında tahribat, bakteri hücre duvarının hidrofobik kimyasallar için geçirgenliğinin artırılması ve bakteride mutasyona duyarlılığın artmasını sağlayacak plasmid girişinin sağlanması olabilmektedir (Gatehouse ve ark. 1990).

1.3.1.1. Salmonella/Mikrozom (Ames) Test

Ames testi, 1970'lerin başında Bruce Ames tarafından (Ames 1979, Ames ve Cann 1981, Maron ve Ames 1983) geliştirilen ve daha sonra yaygın olarak kullanım alanı bulmuş olan kısa zamanlı, bir geri-mutasyon testidir. Salmonella/mikrozom testi bakteriyal mutasyon testleri içinde detayları en iyi bilenen ve karakterize edilen, geçerliliği, uygulanma kolaylığı ve hassaslığı nedeniyle en fazla kabul görek tercih edilen ve günümüzde de sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Gatehouse ve ark. 1990, Russell 1998, Friedberg ve ark.1995, Chlopkiewicz 1999). Test organizması olarak kullanılan *Salmonella typhimurium*, histidin geninde oluşturulan farklı mutasyonlarla (*hisG*, *his C*, ya da *his D*), gelişmek için histidin gereksinimi duyan değişik tipte oksotrofik mutantlara dönüştürülmüştür. Çok yaygın olarak kullanılan suşlar Çizelge 1.2'de verilmiştir. Bir mutant suş, tek bir baz değişimi şeklinde nokta mutasyona sahip iken, kendiliğinden ya da bir mutajen uyarısıyla yabani tipe dönüştüğünde, transisyon ya da transversiyon şeklinde mutasyon geçirmiş olmaktadır.

Çizelge 1.2. Yaygın olarak kullanılan *Salmonella typhimurium* suşları.

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

W/t yabani tip.

Daha sonraki yıllarda, özgül baz çifti değişimlerini gösteren diğer suşlar geliştirilmiştir (Levin ve ark. 1986). Bilinen bakteriyal mutajenlerin büyük bir kısmını belirlemede çok hassas oldukları için TA 98 TA 100 kombinasyonu genel bir kabul görmüştür (Gatehouse ve ark. 1990).

Reversiyon test yöntemi uygulamalarında, farklı özelliklerde geliştirilen ve çeşitli amaçlarla kullanılan *Salmonella typhimurium* test suşları dışında *E. coli*'nin bazı suşları da yer almaktadır. Bu bakteri kültürleri de aynı prensibe uygun olarak, triptofan E lokusunda oluşturulan mutasyonla, oksotrof hale getirilmiştir. Bu şekilde geliştirilen *E. coli* WP2 uvr A (pKM101) ve *E. coli* WP2 (pKM101) suşları AT baz çifti mutasyonu taşımaktadır. WP2 serisinin taşıdığı triptofan mutasyonları, bir kromozomal "ochre (anlamsız)" mutasyondur. Bu suşların *Salmonella* test bakterilerinden TA 104'e paralellik gösterdiği rapor edilmiştir.

Ayrıca yapılan bir araştırmada, *Salmonella typhimurium* TA 102 ile pozitif sonuç veren bazı oksidatif mutajenler ve çapraz bağlayıcı ajanların, *E.coli* WP2 suşlarında da benzer sonuçlar verdiği bulunmuştur (Wilcox ve ark. 1990). *E.coli* WP2, rutinde kullanım kolaylığı, genetik özelliklerinin farklılığı ve bazı mutajenlere duyarlı oluşu sebebiyle, TA 102 ve TA 104 suşlarına alternatif olarak düşünülmektedir (Gatehouse ve ark 1990).

Test bakterileri nokta ve çerçeve kayması mutasyonun yanı sıra, lipopolisakkarit duvar yapımındaki genlerde de mutasyon içermektedir. Bakteriler ayrıca mutant genler taşıyan plazmitlere sahiptir. Plazmitlerin taşıdığı genler *error-prone* (hataya açık onarım) SOS onarım enzimlerini yabancı tipten daha etkili şekilde üretmektedir. Bu mekanizma mutasyona çok açık olduğu için mutant suşlarındaki DNA hasarının pek çok çeşidi onarılmak yerine mutasyona dönüştürülür (Russell 1998).

Yöntemin uygulanışında, mutant *S. typhimurium* suşları test edilen ajanla birlikte, sınırlı miktarda histidin içeren minimal besiyeri plaklarına ekilir. Histidinin bulunan miktarı bakterilerin birkaç jenerasyon gelişmesine izin verir. Sonuçta oluşan DNA lezyonu mutasyonla sonuçlanırsa, mutant fenotip ifade edilir. Ortamda histidinin tükenmesinden sonra geri dönüşen (His⁺ revertant) bakteriler aynı koloniler şeklinde büyürler (Ames 1985, Friedbeg ve ark. 1995).

Diğer bakteriyel testlerde olduğu gibi Ames testinde de eksik olan unsur, memelilerde detoksifikasyon mekanizmasını gerçekleştiren enzim sisteminin olmayışıdır. Bu sistem pek çok kimyasal grubu reaktif olmayan hale getirirken, bazı bileşikler de DNA ile etkileşime girebilen yüksek ölçüde elektrofilik, mutajenik hatta karsinojenik forma dönüştürmektedir (Haack ve ark. 2001). Mutajenik etkisi test edilen herhangi bir ajanın bu enzim aktivasyonunun etkisi ile nasıl bir potansiyele sahip olacağını belirlemek kaçınılmazdır. Bu yöndeki sakıncanın giderilebilmesi için memeli laboratuvar hayvanlarından izole edilen karaciğer enzim ekstraktı bakteriyel sisteme dahil edilerek testler aynı prosedüre uygun olarak tekrarlanmaktadır. En yaygın olarak kullanılan enzim preparatı, sıçanların, enzim aktivasyonu uyarılmış olan karaciğer dokularından homojenize edilen post-mitokondriyal süpernatant'dır (Vrijssen ve ark. 1990, Hass ve ark. 1986). Bu materyal, ilaç metabolize edici enzimlerin bir çeşidini, sitokrom-

bağımlı monooksijenazları, sitokrom bağımsız oksidazları, amidaz, esteraz, glutatyon s-transferaz, sülfotransferaz, açıl transferaz, metil transferaz, dehidrogenaz, esteraz ve peroksidazları içermektedir. Enzim özütü, kofaktörler, tuzlar ve tampon sistemle tamamlandığında, S9-karışımı adını almaktadır. Yaygın olarak kullanılan bir fungusit olan cupric-quinolinoxide (CuQ), Ames testinin S9 (-) aşamasında TA98 ve TA100 suşlarında mutajenik etki göstermezken, S9 varlığında, TA 100'de oldukça güçlü bir mutajenik etki sergilemiştir (You ve ark. 2001).

Ames yönteminde pozitif sonuç veren bir ajan için, insan ya da diğer memelilerde mutajenik veya karsinojeniktir denilemez. Bakteriyal mutasyonun pozitif olması, ajanın potansiyel zararı konusunda bir ön uyarı anlamı taşır. Ayrıca yüksek organizmalarda yapılacak daha kapsamlı çalışmaları yönlendiren önemli bir belirteçtir. Ames testi bu sebeple dünya çapında pek çok laboratuvarında rutin olarak uygulanmaktadır.

Amerika'da çok yaygın bir herbisit olarak kullanılan, 2,4-diklorofenoksiasetikasit ve türevlerinin mutajenik etkisi Ames testinde 5 farklı suş üzerinde S9(-) ve S9(+) ortamda test edilmiş ve hiçbirinde mutajenik etki bulunmamıştır (Charles ve ark. 1999). Brezilya'da Sao Paulo bölgesindeki doğal su kaynaklarının kalitesi 20 yıl süre *Salmonella* mutajenite testi kullanılarak araştırılmıştır ve bu yöntemin kirlenen önemli çevresel kaynakların belirlenmesinde yararlı bir araç olduğu vurgulanmıştır (Umbuzeiro ve ark. 2001).

Çeşitli amaçlarla çok sayıda sentetik ve doğal çevresel ajanın (Park ve ark. 2000, Cooper ve Porter 2000, Kassie ve ark. 2001), endüstriyel ürünlerin (Haack ve ark. 2001, Freeman ve ark. 2001, Spiechowicz ve Wyszynska 1998, Seel ve ark. 1999, Abmann ve ark. 1997) ilaç ve kozmetiklerin (You ve ark. 2001, Giri ve ark. 1999, Schneider ve ark. 1999, Chlopkiwicz 1999) mutajenik ve antimutajenik etkileri (Kaur ve Saini 2000) bu yöntemle araştırılmıştır.

1.3.1.2. E.coli Lac 1 Mutasyon Test Sistemi

Bakterilerde meydana gelen mutasyonların genetik ve moleküler analizinde kullanılan bir ileri (forward) mutasyon yöntemi olup ilk kez 1983'te Miller ve arkadaşları tarafından *E.coli*'de geliştirilmiştir (Friedberg ve ark. 1995).

Bu sistemde laktoz operonundaki repressörü kodlayan *lac I* geninde oluşan mutasyonun fenotip üzerindeki yansıması belirlenerek değerlendirilmektedir. *Lac I* mutasyonlarını içeren gen bölgesi bakteriden alınarak bir plazmite ya da M13 fajı klonlama vektörüne aktarılmakta, vektörler çoğaltılarak çok sayıda mutant DNA kopyası elde edilerek, dizi analizi yapılmaktadır (Schaaper ve Dunn 1991, Güven 1999).

1.3.1.3. UMU (SOS) Test sistemi

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

Bu test sisteminde kullanılan *E.coli* ve *S. typhimurium* suşları, β -galaktosidaz aktivitesi için hibrit bir protein oluşturan *umuC'*-*lacZ* füzyonuna sahip pSK1002 plazmidini taşır. Umu test sisteminde kullanılan atasal suşu oluşturmak için bu plazmid, kesip-çıkarma onarım mekanizması hatalı (*uvrB* mutasyonu), birçok kimyasal için daha kolay geçirgenliğe sahip (*rfa* mutasyonu) ve laktoz operonunda doğal bir delesyon gibi üstün özellikleri olan *Salmonella typhimurium* TA 1535 içine yerleştirilmiştir. Bu özellikler sayesinde testin duyarlılığı arttırılmış ve umu testi için atasal suş olan *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 suşu oluşturulmuştur (Oda ve ark. 1992, Nakamura ve ark. 1987). Testlerde en yaygın olarak kullanılan suş, *E.coli* suşu ile K12 PQ37 olmuştur (Raabe ve ark. 1993).

Genotoksik kimyasallar ile hem Ames hem de umu test sisteminde yapılan çalışmalar, umu testinin duyarlılığının Ames sistemine yaklaşık olarak eşit olduğunu göstermiştir. Ayrıca umu test sistemi, Ames test sisteminde miktar olarak toksik olabilecek kimyasalları test etmeye olanak sağlar, çünkü umu testinde hücrelerin canlı kalması zorunlu değildir (Oda ve ark. 1993). Mikroelektronik sanayide uygulanan kimyasal işlemlerin, klorin, karbontetraklorür ve borontriklorid gibi atıkları Ames ve SOS kromotest ile sınanmış ve her iki testte de S9 (-) ortamda pozitif sonuçlar elde edilmiştir (Raabe ve ark. 1993).

1.3.2. Sitogenetik Metodlar

Sitogenetik çalışmaları, çevresel olarak ya da çalışma ortamında klastojenlere ve radyasyona maruz kalan belirli populasyonlar için (Barquinero ve ark. 1993), bireysel olarak etkilene dozunun saptamak için kullanılabilir (Fender ve Wolf 1998, Sram ve ark. 1998, Lazutka ve ark. 1999). Kimyasalların mutajenliğini araştırmada kullanılan en yaygın sitogenetik yöntemler, yapısal kromozom bozukluğu (CA), Kardeş kromatid değişimi (SCE) ve mikronükleus (MN) testleridir (Albertini ve ark. 2000). Bu testler *in vivo* olarak laboratuvar hayvanlarında (Desesso ve ark. 2000, Topaktaş ve ark. 1996), *in vitro* olarak da insan kan lökositleri, mesane, yanak, mide, nasal ve sperm hücreleri ile çeşitli kültür hücrelerinde (Surralles ve ark. 1996) uygulanabilmektedir. Çoğunlukla da, farklı tipteki genetik hasarların gösterilmesinde sıklıkla tercih edilen, kısa zamanlı lenfosit kültüründe gerçekleştirilmektedir (Wasilewska ve ark. 1999, Roy ve ark. 2000, Ferenc ve ark. 1999, Guadano ve ark. 1998, Fellay-Reynier ve ark. 2000).

Aşağıda bazı sitogenetik metodlar hakkında bilgi verilmektedir.

1.3.2.1. Yapısal Kromozom Bozulma Analizi (Chromosome Aberration= CA)

Anöploidi ve poliploidi gibi sayısal kromozom bozulmaları ile kromozom tipi, kromatid tipi kopmalar ve anormal birleşme gibi yapısal bozulmalar çok yaygın olarak, bölünen hücrelerin metafazda olanlarını kolsemid ya da kolşisin gibi bir tübülün polimerizasyon inhibitörü kullanarak tutuklama ile saptanmaktadır. Bu test yöntemi klastojenik etkinin araştırılmasında 70'li yıllardan bu yana

sıklıkla uygulanmaktadır. Kromozom ve kromatid tipi bozulmalar, Savage (1976) tarafından sınıflandırılmıştır. Antibakteriyal, antilösemik ve kanserojenik özellikleriyle bilinen streptozotosin'in hamster ovaryum hücrelerinde (CHO), kromozom aberasyonlarını arttırdığı bildirilmiştir (Bolzan ve ark. 2000). Yine antibakteriyal aktiviteleri çok iyi bilinen, nitrofuran türevi bir bileşik olan furagine ile tedavi gören çocuklarda, çoğunlukla asentrik fragment şeklinde kromozom mutasyonları görülmüştür (Slapsyte ve ark. 2001). Prostat kanserli hastaların lenfosit kültürlerinde, kromozom aberasyonlarının (CA) arttığı tesbit edilmiştir (Dhillon ve Dhillon 1998). Epilepsi ve bazı psikiyatrik hastalıklarda kullanılan karbamazepin'in mutajenik potansiyeli bu ilacı kullanan hastaların lenfositlerinde *in vivo* ve sağlıklı vericilerden alınan lenfositler ile muamele edilerek *in vitro* olarak araştırılmış ve her iki durumda da CA oluşumunu önemli ölçüde arttırdığı sonucuna varılmıştır (Awara ve ark. 1998). Özellikle de bu bölümde sözü edilen diğer testlerle kombine edilerek kullanımı çok yaygındır (Ribas ve ark. 1998, Sivikova ve Dianovsky 1999, Landi ve ark. 1999, Balasem ve ark. 1992).

1.3.2.2. Mikronukleus Testi (MN)

Mikronukleus hücre çekirdeğinin dışında sitoplazmada yer alan çekirdek orjinli küçük küresel bir oluşumdur. Mikronukleus mitotik hücrelerde kromozom fragmentlerinden yada anafazda geç kalarak her 2 kardeş çekirdeğe dahil olamayan kromozomlardan kaynaklanır. Mikronukleusun içerdiği kromozomal fragmentler; öncelikli iğ ipliği kinetokor ya da diğer mitotik aparatların fonksiyon kaybından, kromozom alt birimlerinde oluşan hasarlardan, hücresel fizyolojideki değişimlerden ve mekanik parçalanmalardan kaynaklanmaktadır (Fenech 2000). Mikronukleus içeren hücre sayısındaki artış, maruz kalınan klastojenik (DNA'yı hedefler, kromozom kırılmalarına sebep olur) veya anöjenik (kromozom sayısının değişimine etkilidir, genellikle DNA'yı hedef almaz) ajanların genotoksik etkilerini yansıtan bir biomarker'dır.

İnsan popülasyon çalışmalarında MN sıklığı, çok yaygın olarak fitohemaglutinin (PHA) ile stimüle edilmiş periferik kan lenfositlerinde belirlenmektedir (Abou-Eisha ve ark. 1999). En sık kullanılan metot ise mitojenle stimüle edildikten sonra sitoplazma bölünmesi engellenen hücrelerin sayımının

yapıldığı sitokinez-engelleme mikronukleus (CBMN) tekniğidir. Mikronukleus sıklığının belirlenmesinde her örnek için her 1000 hücredeki MN sayılarak hesaplama yapılmaktadır (Fenech ve Morley 1985). *In vivo*'da meydana gelen MN oluşumu klastojenik ve anöjenik mekanizmaların her ikisiyle de uyarılmakta olup ağız, burun mukozası ve idrardaki *exfoliated* (dökülen, kopan) epitel hücrelerinde (Salama ve ark. 1999) yada periferel kandaki tek çekirdekli lenfositlerde tespit edilebilmektedir (Fenech ve ark. 2000).

Yapılan bir çalışmada (Scarpato ve ark. 1998), bitki orijinli beş yeni kimyasal bileşiğin genotoksik aktivitesi, insan lenfositlerinde *in vitro* CBMN testi ile araştırılmıştır ve hiç birinin mikronukleus artışı induklemediği görülmüştür. Diğer bir çalışmada, radyasyon tedavisi gören kanser hastalarının periferel lenfositlerindeki mikronukleus sıklığı, tedavi öncesi ve sonrasında sayılmıştır. Başlangıçta kontrol grubuna göre, fazla sayıda mikronukleus oluşumu bulunan kanser hastalarında, radyasyon tedavisi sırasında ve sonrasında mikronukleus sıklığının önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir (Jagetia ve ark. 2001). Nöroblastoma, retinoblastoma, lenfoma, nefroblastoma, sarkoma, osteosarkoma ve hodkin gibi malignant kanserli bir grup çocuk hastanın lenfosit hücrelerinde, kontrol grubuna göre fazla sayıda mikronukleus oluşumu ve kromozomlarında kırık şeklinde mutasyonlar saptanmıştır (Reynier ve ark. 2000). İnsan hepatoma hücrelerinde, benzo(a)pren, siklofosamid, dimetil nitrosamin, heksametilfosforamid, pren ve safrol gibi indirek mutajenik karsinojenler ile metilmetanesulfonat ve mitomisin c gibi direk aktivite gösteren mutajenlerin *in vitro* metabolik aktivasyonu, S9 varlığında CBMN ve SCE ile araştırılmıştır. Test edilen ajanların tümü, her test sisteminde pozitif sonuç vermiştir (Natarajan ve Darroudi 1991).

Petrokimya kuruluşlarının etkisi altında olan bir nehrin 4 değişik bölgesinden, 20 ay içinde 11 ayrı zamanda alınan su örnekleri, sağlıklı insan lenfositleriyle muamele edilerek, CBMN testi ile sınanmış ve her bölge için farklı oranda olmak üzere mikronukleus oluşumunun arttığı gözlenmiştir. Bu testin endüstriyel bölgelerdeki su kaynaklarının değerlendirilmesinde hassas bir sitogenetik yaklaşım olduğu vurgulanmıştır (Torres de Lemos ve Erdtmann 2000).

1.3.2.3. Comet (Single Cell Gel Elektrophoresis) Testi

Bu yöntem iplik kıvrılmaları, çapraz bağlanma, alkali labile site gibi DNA hasarlarını ve kesme- çıkarma onarım bölgelerindeki hataları bir jel sistemi kullanarak belirleyebilmektedir (Östling ve Johanson 1984, Singh ve ark. 1988). Uygulamada kan lökositleri, mesane, yanak, mide, nasal ve sperm hücrelerindeki DNA hasarını belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (Albertini ve ark. 2000).

Hücreler erimiş agarozda süspansiyon edilerek lam yüzeyine yayılarak, yüksek konsantrasyonlu tuz çözeltisi ve deterjan ile lizis edilmektedir. Serbest kalan DNA nötral ya da alkali koşullarda elektroforeze tabi tutulmaktadır. DNA'nın elektroforez ortamında anoda doğru olan göçü taşıdığı hasar ölçüsünde farklılık gösterir. DNA'daki hasar büyük ise, zerrecikler şeklinde yaygın bir göç sergiler. DNA'nın jel üzerindeki konumu uygun bir boyama yapılarak, flouresan ya da ışık mikroskobu kullanılarak görüntülenmekte ve oluşan DNA kuyruklarının ölçülmesi ile maruz kalınan ajanın genotoksik potansiyeli hakkında fikir edinilmektedir (Albertini ve ark. 1999)

Diabetik hastalarda, artan reaktif oksidatif grupların sebep olduğu DNA hasarı ve bu hasarı azaltabilen antioksidanların DNA üzerindeki etkileri Comet testi ile ortaya konmuştur (Şardaş ve ark. 2001). He ve arkadaşları (2000), X ışınlarının genotoksik etkilerini *in vitro* mikronukleus testi ve Comet yöntemi ile karşılaştırmalı olarak araştırmışlar, verilerin birbiriyle uyumlu olduğu, ancak comet testinin daha duyarlı sonuçlar verdiği kanısına varmışlardır. Sentetik bir insektisit olan, deltametrinin genotoksik aktivitesi, Comet testi ile araştırılmış ve metabolik aktivasyon varlığında, çift ve tek iplik kıvrılmaları, alkali labile bölge oluşumu DNA hasarlarının uyarıldığı saptanmıştır (Villarini ve ark. 1998). Bir başka çalışmada, gamma ışınlarının DNA hasarı üzerindeki etkileri, insan ve fare lökositlerinde Comet yöntemiyle ölçülmüş ve her iki DNA'sının uygulanan radyasyon ile hasara uğradığı gösterilmiştir (Chavbey ve ark. 2001).

Bu temel tekniğe ilave olarak, timin dimerleri ve oksidatif hasar gibi DNA hasarları, lezyona özgü antikor ve DNA onarım enzimlerinin kullanılması ile özgül olarak saptanabilmektedir.

1.3.2.4. HPRT Mutasyon Yöntemi

HPRT geni, pürin korunması için fosforibosilpirofosfat ile guanin ve fosforibosiltransferaz enzimini kontrol eder. HPRT normal substratların yanı sıra, normal hücrelerde sitotoksik etkiye sahip olan 6-thioguanin (6-TG) gibi pürin analoglarının da değişimini katalizler. Gende meydana gelen mutasyon ile HPRT enzimi kaybı olmaktadır. Bu durumda hücreler ancak 6-TG muamelesi ile hayatta kalabilmektedirler. HPRT yöntemi, somatik gen mutasyonlarının *in vivo* ortamlarda pozitif olarak seçilmesi prensibine ve DNA baz çifti değişimleri, büyük ya da küçük çaptaki delesyonları, inversiyonları ve heterolog kromozom rekombinasyonları gibi genetik değişimleri büyük ölçüde yansıtmaya yeteneğine sahiptir dayanır (Albertini ve ark.1981, Cole ve Skopek 1994).

Yiyeceklerde koruyucu olarak kullanılan katkı maddeleri potasyum sorbat ve sodyum sorbatın genotoksik etkileri HGPRT, Ames, SCE, CA ve MN ile araştırılmıştır. *In vitro* olarak herhangi bir etki gözlenmezken, *in vivo*'da zayıf klastojenik etki bulunmuştur (Münzner ve ark. 1990). Bazı kanser olgularının, HPRT genindeki mutasyonal mekanizma ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Hayvan deneylerinde T hücrelerindeki HPRT mutasyonlarının karsinojen maddeler ile teşvik edildiği bulunmuştur (Grdina ve ark. 1992, Aidoo ve ark.1991)

1.3.2.5. Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) Yöntemi

SCE dublike olan bir kromozomun iki kardeş kromatidi arasında DNA'nın resiprokal değişimi sonucu oluşmaktadır. SCE'nin teşvik edilmesi DNA sentezinin başında maksimum iken, S fazının sonunda tamamen biter. Değişmeler homolog lokuslarda meydana gelir ve kromozom morfolojisinde bir farklılık oluşturmaz. SCE oluşumunda DNA ipliğinin kırılıp (kopup) tekrar birleştiği bilinmekle birlikte mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. DNA ile kovalent bağlanan ya da DNA metabolizmasına ve onarımına engel olan maddeler çok etkili şekilde SCE'yi teşvik etmektedirler (Albanesi ve ark. 1999).

SCE testi toksik madde- DNA etkileşimini açığa çıkarmadaki duyarlılığı ve genotoksik kimyasalların kültüre edilmiş ya da muamele edilmiş hayvanlardan alınan hücre örneklerinde SCE sayısını önemli ölçüde arttırması sebebi ile bireysel olarak maruz kalınan genotoksik karsinojenlerin kan lenfositlerinde

yarattığı DNA hasarını belirleyen bir indikatör olarak kullanılmaktadır (Albanesi 1999).

Hücre döngüsü boyunca yapılan muamelenin süresi ve kültür süresinin bitimi önemli parametrelerdir. Bleomisin ve iyonize radyasyon gibi düşük SCE aktivitesi gösteren potansiyel klastojenler aynı zamanda yapısal kromozom hasarına da yol açmaktadır. Ancak bu 2 kromozom lezyonu tipinin mekanizması ve oluşumları birbirinden tamamen farklıdır (Tawn ve Holdsworth 1992). Ahmad ve ark'ları (2000) tarafından yapılan çalışmada, ilaç olarak kullanılan sex hormon steroidi estradiol-17beta'nın uygulanan tüm dozlarda CA oluşumunu, en yüksek dozda ise SCE oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir. Sadece iplik kırılmalarını teşvik eden genotoksik ajanlar SCE miktarına etki etmemektedir. Bazların alkillenmesi ya da çapraz bağlanması şeklinde DNA replikasyonuna müdahale ederek DNA hasarını teşvik eden genotoksik ajanlara maruz kalınması, ökaryotik hücrelerde SCE miktarını arttırmaktadır.

Kromozom bozulmaları, *in vivo* olarak incelendiğinde maruz kalan bireyden hazırlanan kültürün ilk metafazında, *in vitro* olarak incelendiğinde ise hazırlanan kültüre kimyasal maddenin uygulanışından sonraki ilk metafazda belirlenir. SCE ise BrdU varlığında hazırlanan hücre kültüründe, iki hücre siklusu geçiren hücrelerde kromotidlerin farklı işaretlenmesi sonucu gözlenir. Kültür ortamındaki hücre büyümesi ve kimyasal ajana maruz kalma süresi, hedeflenen amaca bağlı olarak seçilmektedir. BrdU işaretlenmesi, kültüre edilen hücrelerden ilk ve onu takip eden bölünmelerini ayırt etme olanağı vermesi nedeniyle, kromozom bozulma testi içinde uygun ortam sağlamaktadır (Speit 1984). Bu durumu en iyi sağlayan protokol kromozom bozulmaları için 48 saatlik SCE analizi için ise 72 saatlik süreyi içerecek şekilde, toplam 72 saatlik kültürü gerektirmektedir (Tawn ve Holdsworth 1992).

Endüstriyel bir karsinojen olan krisotil'e mesleki olarak maruz kalan işçilerin lenfositlerindeki SCE sıklığı kontrol grubuna göre oldukça fazla bulunmuştur (Lee ve ark. 1999). İçme sularının klorlanmasıyla oluşan bromoform gibi bromlanmış halometanların insan lenfositlerinde SCE oluşumunu artırdığı gözlenmiştir (Landi ve ark. 1999). Proteinli yiyeceklerin pişirilmesiyle oluşan heterosiklik aromatik aminlerden 3-amino-1-metil-5H-prido(4,3-b) indol (Trp-P-

2) ve kemoterapik bir ilaç olan siklofosfamid (CP)'in SCE oluşumunu arttırma potansiyelleri üzerine, beta karoten, retinal, riboflavin, alfa tokoferol, C ve K vitaminlerinin etkisi test edilmiştir. Beta karoten, retinal ve alfa tokoferol'un, Trp-P-2 ve CP ile uyarılmış SCE oluşumunu azalttığı sonucuna varılmıştır (Edenharder ve ark. 1998). Askeri uçak pilotlarının lenfositlerindeki SCE sıklığının kontrol grubu ile karşılaştırıldığı çalışmada, gürültü ve titreşimin SCE miktarını önemli ölçüde arttırarak genotoksik etkili olduğu ileri sürülmüştür (Silva ve ark. 1999). Çevresel karsinojenlerden yaygın bir ağır metal olan kadmiyum hücre siklusunun S fazında *in vitro* insan lenfosit kültürüne uygulanmış ve belirli dozlarda genotoksik etki sergilemiştir (Şaplakoğlu ve İşcan 1998). Yüksek yoğunlukta maruz kalınan düşük frekanslı manyetik alanın fare m5S hücrelerinde SCE oluşumunu yükselttiği bulunmuştur (Yaguchi ve ark. 1999).

Kanser ve romatoid artrit gibi hastalıkların tedavisinde kullanılan metotreksayt (MTX), protein, RNA ve DNA sentez inhibitörü olan hipertermiya ve kafein ile kombine edilerek kullanıldığında daha güçlü bir tümör inhibitörü olmakla birlikte, insan lenfositlerinde SCE oluşumunu önemli ölçüde arttırmıştır (Maskaleris ve ark. 1998). Fotosentez inhibitörü olan bifenox içeren herbisitler yüksek dozlarda, bovin periferik lenfositlerinde SCE aktivitesi göstermiştir (Sivikova ve Dianovsky 1999). Pek çok yiyecekte antimikrobiyal katkı maddesi olarak kullanılan sodyum metabisülfid'in sitogenetik aktivitesi SCE ve CA testi ile araştırılmış, denenen tüm doz ve sürelerde CA ve SCE oluşumunu etkili şekilde uyardığı sonucuna varılmıştır (Rencüzoğulları ve ark. 2001). Yeşil çayı farklı ısı ve sürelerdeki deminin, buharlaştırılmasıyla elde edilen 5 polifenol içeriğinin, çevresel sigara dumanının sebep olduğu yüksek SCE miktarını düşürerek antiklastojenik etki gösterdiği tesbit edilmiştir (Zhou ve ark. 2000).

Sosyoekonomik durum, yaş ve cinsiyet gibi endojen faktörler SCE seviyesinde etkili olabilmektedir. Bazı kanser türlerinde ve diğer önemli hastalıklarda, spontan bir klastojenik etki olduğu yapılan SCE analizleri sonucu tesbit edilmiştir (Atalay ve ark. 2000). Uterin serviks kanserli bir grup kadın hastanın periferik kan lenfositlerindeki SCE sayısının, sağlıklı kontrol grubuna göre fazla olduğu bildirilmiştir (Cortes-Gutierrez ve ark. 2000). Kronik lenfosit lösemi hastalarından alınan kanda özellikle B lenfositlerinin çoğalması uyarılarak

yapılan SCE analizinde kontrol grubuna göre yüksek SCE oranı kaydedilmiştir (Öztürk ve ark. 2000). Özellikle Türkiye ve Japonyada görülen ve immunogenetik temele dayanan bir multisistem bozukluğu olan Behçet hastalığında, artan SCE miktarına dikkat çekilmiştir (Sönmez ve ark. 1998). Kronik iltihaplı bir bağırsak hastalığı olan Crohn hastalarında da yüksek SCE oluşumu saptanmıştır (Kang ve ark. 1997).

1.4. GENOTOKSİK ETKİLİ KİMYASAL AJANLAR

Kimyasalların DNA ile olan etkileşimini hedefleyen ilk çalışmalar, insanların savaşlarda kullandığı öldürücü ya da zarar verici maddelerin araştırılması ile başlamıştır (Brookes 1990). Ardından daha iyimser bir amaçla kanser tedavisinde kullanılan kemoterapik kimyasallar, hızlı bölünen hücre popülasyonlarında replikasyona müdahale ederek DNA hasarına yol açabileceği düşüncesiyle incelemeye alınmıştır. Son yıllarda ise çevresel mutajen ve karsinojenlere karşı artan toplum ve çevre duyarlılığına paralel olarak, DNA ile etkileşime girerek hasar oluşturabilen genotoksik kimyasalların mekanizma araştırmaları giderek yoğunlaşmıştır. Bu nedenle günümüzde kimyasal maddelerin sebep olduğu DNA hasarı ve mekanizması hakkında kesin ve sağlıklı bilgiler bulunmaktadır (Friedberg ve ark. 1995).

1.4.1. Alkileyici Ajanlar

İçinde karsinojenliği kanıtlanmış ya da şüpheli olan çok sayıda kimyasal çeşidi bulunan alkileyici ajanlar, organik makro moleküllerin nükleofilik merkezlerine affinite gösteren elektrofilik bileşiklerdir (Singer ve Grunberger 1983, Lawley 1989). Dimetil-nitrosamin, N-metil-N-nitrosourea, 1,2-dimetilhidrazin, Metil metan-sülfonat, Dietil-nitrosamin, N-etil-Nitrosourea gibi monofonksiyonel alkileyici ajanlar, deneylerde mutajen olarak sıklıkla kullanılırlar (Gollapudi ve ark. 1998).

Bu ajanlar monofonksiyonel ya da bifonksiyoneldir. Monofonksiyonel olanlar tek bir reaktif gruba sahiptir ve DNA'daki tek nükleofilik merkezle kovalent bağ yaparlar. Monofonksiyonel ajanlar; adeninde N1, N3, N6 ve N7, guaninde N1, N2, N3 ve O6, sitozinde N3, N4 ve O2, timinde ise N3, O2 ve O4

bölgelerinde reaksiyona girerler. Bifonksiyonel ajanlar ise 2 reaktif grup taşımakta ve DNA ile 2 ayrı bölgede reaksiyona girebilmektedir. Potansiyel alkilleme bölgeleri 4 baz içinde belirlenmiş ve herbirinin farklı reaktiviteye sahip olduğu bulunmuştur. Genelde bazların halkasal nitrojenleri, oksijenlerinden daha nükleofiliktir. Fosfodiester bağlarındaki oksijenin alkilasyonu fosfotriesterlerin oluşumu ile sonuçlanır (Singer 1986). DNA'daki grupların alkilleyici ajanlarla verdiği reaktivite (tepkime), "swain-scatt (s)" olarak adlandırılan bir sabitle ilişkilendirilmiştir. s değerinin küçük olması daha az nükleofilik bağlanmayı gösterirken, yüksek olması ise yüksek tepkime verebilen daha nükleofilik atomlarla reaksiyonun belirtecidir (Roberts 1978). Diğer yandan alkilasyonla değişime uğrayan bazlarda N-glikosilik bağları zayıflatmakta ve çok sayıda alkilleyici ajan bazlarda depurinasyon-depirimidinasyona yol açarak, abazik bölgelerin oluşumuna neden olmaktadır (Loeb ve Preston 1986). DNA'daki özgül bölgelerle alkilleyici ajanların reaksiyonu sterik etkilerle yönetiliyor olabilir. Örneğin, DNA normal B sarmal (sağ el) formunda olduğunda, guaninin O6 ve N7 atomları alkilenmeye daha açıkken, Adenin N3 atomu bu yönde daha düşük kapasite sergilemektedir (Kornberg ve Baker 1991, Rich ve ark. 1984).

1.4.2. Çapraz bağlayıcı (Cross-Linking) Ajanlar

Daha önce sözü edildiği gibi bifonksiyonel alkilleyici ajanlar DNA'da 2 farklı nükleofilik merkez ile reaksiyona girebilirler. Eğer bu 2 bağlanma bölgesi zıt polinükleotit iplikleri üzerinde ise DNA iplikleri arasında çapraz bağlanma meydana gelmekte, aynı polinükleotit zinciri üzerinde yer alıyorsa iplikçi çapraz-bağlanma oluşmaktadır.

DNA iplikler arasındaki çapraz bağlanma, DNA'daki kimyasalların yol açtığı hasarların önemli bir sınıfıdır. Bu tip hasar DNA iplik ayrımını engellediği için replikasyon ve transkripsiyonu bloke eder. Bu özelliği nedeniyle nitroz asit, mitomisin C (Borowy-Borowski ve ark. 1990), nitrojen mustard, sülfür mustard (Fox ve Scott 1980), cis platinum gibi çeşitli platinyum türevleri ve ışıkla aktive olan psoralen gibi ajanlar kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Fram 1992). Örneğin, 5×10^{-7} M konsantrasyonunda nitrojen mustard ile muamele edilen bakteriyal DNA'da, bazların yaklaşık %0,005'inin alkilendiği

gösterilmiştir. Bunun dışında, 254 nm dalga boylu UV radyasyonu ve iyonize radyasyon da DNA'daki moleküller arasında karşılıklı bağlanma gibi daha küçük DNA hasarlarına sebep olabilirler. Düşük hücre içi klor konsantrasyonu, sonucu meydana gelen klor kaybı, bileşikler yüklü elektrofilik ajanlara dönüştürür. Nükleofilik bölge ile reaksiyon sonucu ise DNA'da iplik içi ya da iplikler arası bağlantılar meydana gelir .

Bu ajanlar, aynı zamanda DNA-protein çapraz bağlanmasına da sebep olabilmektedir (Eastman 1987). Örneğin bir monofonksiyonel alkilleyici ajan olan β -propiolakton DNA ile guaninin N7 pozisyonunda reaksiyona girer. β -propiolaktonun DNA ve saflaştırılmış protein ile inkübasyonu sonucunda DNA-protein çapraz bağlanması da meydana gelmektedir. Çeşitli DNA-protein etkileşimlerinin oluşum mekanizmasının ve DNA metabolizması üzerindeki etkilerinin araştırılması DNA hasarının oluşumu hakkında daha detaylı bilgi sağlamaktadır.

1.4.3. Psoralenler

Psoralenler, temel kimyasal yapılarında, UV varlığında DNA'nın pirimidin bazları ile bir ya da iki uçtan bağlanarak reaksiyona giren 3 aromatik halka bulunduran kimyasal yapılardır. Psoralenlerin DNA ile etkileşimi ve bağlantısı 3 şekilde olmaktadır. İlk iki şekli, uzun dalga boylu UV radyasyonunun etkisi ile DNA ile tek noktadan (timin ile) çift bağ kurulması sonucu meydana gelir (Gasparro ve Fresco 1986). Üçüncü şekli ise kimyasal yapının her 2 reaktif grubunun da bağımsız bir şekilde UV'yi absorbe ederek, iki DNA ipliği üzerinde biri alt, diğeri üst konumda bulunan iki baz arasında karşılıklı çapraz bağlantı kurması şeklinde gerçekleşmektedir. Sözü edilen ilk iki bağlantı tipi, çapraz bağlanmayı oluşturan bağlantı şekline 3 kat daha fazla meydana gelmektedir (Sinden ve Cole 1978).

Fotoreaktivasyon ile DNA iplikleri arasında çapraz bağlanmayı sağlayan psoralenler, muamele edildikleri bakteri, bakteriyofaj ve ökaryotik hücrelerin biyolojik inaktivasyonuna sebep olmaktadır (Averbeck 1989). Bu nedenle, psoralenin teşvik ettiği çapraz bağlanma reaksiyonları, çeşitli biyolojik

sistemlerde meydana gelen iplikler arası çapraz bağlanmanın onarımı çalışmaları için ideal bir model olmuştur (Sage 1993).

UV ışığı ile aktive olan psoralenler, aynı zamanda bölünen hücrelerde DNA replikasyonunu engellediği için sedef hastalığı gibi, epitel hücrelerinin düzensiz çoğalması ile karakterize olan bir hastalığın tedavisinde de kullanılmaktadır (Knobler ve ark. 1988).

1.4.4. Baz Analogları

Genel olarak DNA yapısında herhangi bir kimyasal ajanın etkisi olmaksızın, biyolojik olarak meydana gelebilen baz hasarları oluşmaktadır. Bu hasarlar DNA replikasyonunun değil, replikasyon sırasında diziye katılan deoksiribonükleotitlerin hatalı olmasından kaynaklanmaktadır (Topal 1988). DNA replikasyonu sırasında, bazlara yapı olarak uygun substratlar onların yerine replikasyona katılırlar. Baz analogları olarak adlandırılan bu bileşikler deneysel olarak DNA hasarının ve bu hasarın yarattığı hücrel cevabın belirlenmesi çalışmalarında kullanılır. En yaygın olarak çalışılan baz analogları arasında halojenlenmiş 5-bromourasil, 5-fluorourasil ve 5-iyodourasil gibi urasil türevleri yer almaktadır (Friedberg ve ark. 1995). Bunların tümü timin analogu olup, DNA replikasyonuna katıldıkları zaman mutasyona sebep olmaktadır. Aynı şekilde adenin analogu 2-aminopurin de mutajenik özelliğe sahiptir (Sowers ve ark. 1987).

1.4.5. Klastojenik Faktörler

Genetik materyale kromozom kırıkları şeklinde zarar veren oksijen radikalleri gibi ajanların etkisi klastojenik faktörler olarak adlandırılmaktadır (Emerit 1994). Klastojenik etkinin çoğunluğu iyonize radyasyon gibi DNA hasar kaynaklarından meydana gelir. Buna karşın bazıları da memelilerde hücrel metabolizma sonucu meydana gelmektedir. Örneğin, ataxia telangiectasia hastalarının lenfosit ve plazmaları, normal bireylerinki ile kültüre alındığında, normal hücrelerdeki kromozomal hasarın önemli derecede arttığı gözlenmiştir. Aynı hastaların deri fibroblastlarının yetiştirildiği doku kültür ortamı da, fitohemaglutininle uyarılmış normal lenfositlerde kromozomal kırılmayı yine

önemli ölçüde arttırmıştır (Shanam ve ark. 1980). Benzer klastojenik aktivite, Bloom's sendromu, Falconi's anemisi ile DNA onarım hatalarından kaynaklanan kromozom anomalisi ve yüksek kanser riski taşıyan diğer otozomal resesif hastalıklara sahip bireylerden izole edilen fibroblast kültür ortamında da belirlenmiştir. Klastojenik faktörler aynı zamanda yüksek dozda iyonize radyasyona maruz kalan bireylerin plazmalarında da bulunabilmektedir. Yapılan bir araştırmada atom bombası sonrası hayatta kalanların plazmasında bu etkinin 31 yıl boyunca sürdüğü ortaya konulmuştur (Porter ve Coon 1991, Hollowell ve Littlefield 1968). Diğer yandan *in vitro* koşullarda herhangi bir fiziksel ya da kimyasal etken ile muamele edilen kan hücrelerinde klastojenik etki meydana gelebilmektedir (Sivikova ve Dianovsky 1999). Bir başka şekilde tümör promotorları da tıpkı radikal üreten kimyasallar gibi klastojenik etkiyi uyatabilmektedir (Emerit ve ark. 1985).

Genel olarak süperoksit dismutas gibi radikal-koruyucu enzimlerin varlığı klastojenik aktivitenin oluşumunu önlemektedir (Emerit 1994). Reaktif oksijen kaynaklarının üretimi diffüze olabilen ve bu sayede diğer hücrelerde aynı etkiyi uyarak daimi hale gelen klastojenik ajanların oluşumunu (salımını) başlatmaktadır.

1.4.6. Elektrofilik Tepkimelerle Metabolize Olan Kimyasallar

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

(Anders ve Dekant 1994). Bu enzim sistemlerinin gerçek biyolojik fonksiyonları, potansiyel toksik nonpolar kimyasalları suda çözünerek atılabilir şekle dönüştürerek, hücreleri sitotoksik etkilere karşı koruma amacına yöneliktir.

Kimyasal bileşiklerin çoğu bu enzim reaksiyonları ile zararsız ve vücuttan atılabilir metabolitlere dönüştürülürken, bazıları ise elektrofilik formda aktif bir yapı kazanarak DNA gibi organik makro moleküllerdeki nükleofilik merkezle etkileşime girebilir hale gelmektedir. Bu tip kimyasal ajanlar direkt olarak sitotoksik değil iken, potansiyel genotoksik şekle dönüştürülmektedirler. Bu reaksiyonlarda yer alan enzim aktivitelerine en iyi örnek, çeşitli monooksijenaz aktivitesi içeren, bir seri membrana bağlı proteinin indükleyici cevabıdır. Bir ya da daha fazla zara bağlı flavaprotein redüktaz enzimi kombinasyonunun oluşturduğu bu komplekse, 450 nm'de güçlü absorbansa sahip olmaları nedeniyle sitokrom P-450 sistemi denilmektedir (Hollenberg 1992).

Bu çok bileşenli enzim sistemi, aktivitesi için NADPH ve atmosferik oksijen gerektirir. Başlangıç reaksiyonu genellikle, hidrofobik nonpolar substratların, daha polar oksijenlenmiş ara ürünlere dönüştürülmesidir. Oluşan ürünler ikincil reaksiyonların substratları olup, enzimlerle hücreden ya da vücuttan hızlıca atılacak konjugatlara (sıklıkla esterler) katalize edilirler. Genotoksik kimyasalların aktivasyonunda; mikrosomal ve sitoplazmik glutatyon-s-transferaz, sulfotransferaz, asetiltransferaz, VDP-glukonasiltransferaz gibi diğer enzimler de rol oynamaktadır.

1.4.7. Metabolik aktivasyon reaksiyonları sonucu aktif olan bazı kimyasallar

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

Çeşitli endüstriyel ürünlerde ve kömür katranında bulunan benzo [a] pyrene günümüzde çok etkili karsinojenik bileşiklerden biri olarak bilinmektedir

ve çevresel olarak sigara dumanı ve otomobil eksoz gazı gibi benzo [a] pyrene kaynağı olan bileşiklerde çok yaygın olarak bulunmaktadır (Phillips 1990). Benzo [a] pyrene metabolize edilmemiş doğal yapısıyla reaktif olmayan nonpolar bir bileşik olup, bu yapısı nedeniyle DNA çift ipliğindeki bazlar arasına hidrojen bağları kurarak girmektedir. Bu durum DNA hasarına giden yolda bir başlangıç oluşturur. Vücutta P450 enzim sisteminin bileşiklerinden arilhidrokarbon hidroksilaz enzimi benzo [a] pyrene ve diğer polisiklik aromatik hidrokarbonları, onların ester konjugatları olan fenollere ve dihidrodiolelere metabolize etmektedir (Hall ve Grover 1990). Diğer yandan benzo [a] pyrenin bazı metabolizma ürünleri olarak elektrofilik epoksitler oluşmaktadır ki bunlar çok iyi bilinen karsinojenik formlardır ve anti diol-epoksitler olarak adlandırılırlar (Friedberg ve ark. 1995).

Bilinen en etkili karaciğer karsinojenleri arasında olan Aflotoksinler doğal bir metabolizma ürünü olup, DNA hasarına yol açabilen ilginç bir örnektir (Groopman ve Cain 1990). Aflotoksinler *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* türü funguslar tarafından üretilen mikotoksinlerdir. Yiyeceklerin ve özellikle yer fıstığının bu toksinle kontamine olması sonucu insan ve hayvan bünyesine alınmaktadır. Aflotoksinler kimyasal olarak, benzen halkasında metoksi grubu taşıyan bir coumarin yapısıyla birleşmiş difurofuran halka sisteminden meydana gelmektedir (Groopman ve Cain 1990). Fungus kaynaklı aflotoksinler arasında en kuvvetli hepatokarsinojen olanı Aflotoksin B₁'dir. Aflotoksin B₁, karaciğer mikrozomal enzim ekstraktında bulunan P-450'nin, karışık fonksiyonlu oksijenaz enzimleriyle okside olarak, aflotoksin B₁-8,9-epoxide denilen bir ana ürüne dönüşmektedir. DNA nükleotit dizisi bilinen substratlarla yapılan çalışmada, meydana gelen metabolik ürünün, DNA'nın guanin bazıyla etkileşerek 8,9-dihidro-8-(N7-guanil)-9- hidroaflotoksin B₁'i oluşturduğu tespit edilmiştir (Groopman ve Cain 1990).

Temel bir hücre içi sülfidril bileşeni olan glutatyonun hücredeki serbest radikalleri elimine edici rolü olduğu düşünülmektedir. İndirgenme durumunda olan glutatyon güçlü bir nükleofiliktir ve elektrofillerle reaksiyona girmektedir (Anders ve Dekant 1994). Yapılan pek çok çalışma glutatyon konjugasyonunun, dihaloalkan, etilen diklorid, mustard veya N-nitroso gibi karsinojenik ajanların aktivasyonunda genotoksik etkili olduğunu desteklemektedir (Guengerich 1994).

N-nitroso bileşiklerinin bir tiol grubuyla aktivasyonu bu duruma örnek verilebilir. N-metil-N1-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)'in glutatyonda bulunan sistein ile reaksiyonu yüksek seviye elektrofilik metilleyici bir ürün ile sonuçlanmaktadır (Lawley 1990).

Diğer bir örnek ise 4-nitroquinolin 1-oksit (4-NÓO) olup genellikle, UV radyasyonuna benzer şekilde siklobütan pirimidin dimerleri gibi DNA hasarı oluşturmakta ve hasar kesip-çıkarma onarım mekanizmasıyla onarılmaktadır. DNA ile bağlanan 4-ÓO, metabolik aktivasyon reaksiyonları ile ilk olarak 4-hidroksi-aminoquinolin 1-oksit şeklinde bir karsinojenik forma dönüştürülmektedir. Bu bileşik daha ileri seviyede seril-tRNA sentetaz enzimi ile reaksiyona girerek aktive edilmektedir. Aktif kompleks DNA ile quinolin gruplarından bağlanmaktadır (Galigue-Zouitina ve ark. 1986). 4 NÓO ile muamele aynı zamanda 8-hidroksiquanin oluşumuna ve önemli derecede iplik kırılmalarına yol açmaktadır (Kohda ve ark. 1986).

1.5. TOKSİK BİLEŞİKLERİN METABOLİZMASI

Biyolojik sisteme giren yabancı maddeler, metabolize edilerek, orijinal bileşiklere oranla suda daha çok çözünebilen farklı ürünlere dönüşebilir (biyotransformasyon). Hayvanlardaki biyotransformasyon, sudaki çözünürlüğü artırarak atılmayı hızlandırma işlemine dayanır. Burada dikkate alınması gereken önemli bir nokta, bir molekülün, canlı organizmaya yabancı bile olsa, kimyasal yapısı uygun durumdaysa, normal metabolik olaylarda görev alan bir enzim tarafından substrat olarak kullanılabilirdir. Yabancı bileşiklerin metabolize edilmesi o bileşiğin toksisitesinde azalmaya sebep olduğundan bu olay detoksifikasyon olarak nitelendirilir. Bununla beraber, bazı durumlarda bunun tam tersi olur ve oluşan ürün ana üründen daha toksik bir hal alabilir. Örneğin Watanabe ve Kamiguchi (2001) tarafından yapılan bir çalışmada, siklofosamid, benzo(a)pren ve N-nitrosodimetilamin gibi mutajen/ karsinojenlerin metabolik enzimler ile reaksiyonu ile türetilen metabolitlerin insan sperm kromozomları üzerinde aberasyolara (hasar) neden olduğu gösterilmiştir.

Biyotransformasyon çoğunlukla memelilerde, karaciğerde bolca bulunan enzimler tarafından belli başlı iki evrede katalizlenir. Birinci evrede toksik madde

değişime uğrar. Bu değişimle bileşiğe bir fonksiyonel grup ilave edilir. İkinci evrede fonksiyonel gruba başka bir madde bağlanarak birleşme (konjugasyon) gerçekleşir (Gatehouse ve ark. 1990).

1.5.1. Birinci Evre Reaksiyonları

1.5.1.1. Oksidasyon Reaksiyonları

Bu reaksiyonların çoğu bir enzim sistemi tarafından katalize edilirler. Sitokrom P450 monooksijenaz sistemi (30 civarında enzim) olarak adlandırılan bu enzimler hücrenin granülsüz endoplazmik retikulumunda yerleşmişlerdir. Birçok dokuda bulunabilmekle birlikte, bu enzimler en çok karaciğerde yer alırlar. P450 enzimlerinin özellikle kanserojen maddelerin detoksifikasyonunda önemli bir yer tuttuğu bilinmektedir. Hemoprotein yapısında olan enzim, sistein amino asidine bağlı "hem demiri" (porfirin halkasına bağlı demir iyonu) içerir. Yabancı bileşiklerin oksidasyonu genelde bu demir grubu üzerinden gerçekleşir. Katalizlenen reaksiyonlar aşağıda gösterildiği gibi NADPH, moleküler oksijen ve magnezyuma gereksinim duyar.



Alkol dehidrojenazsantin oksidaz, monoamin ve diaminoksidazlar ile peroksidazlar gibi diğer enzimlerin de belirli oksidasyon reaksiyonlarını katalizledikleri bilinmektedir. Sitokrom P450(CYP) enzimleri prokarsinojen ve promotajenlerin de içinde bulunduğu çok sayıda kimyasal ajanın oksidasyonunu katalize ederek, onları mutajen ya da karsinojen özellikteki reaktif metabolitlere dönüştürmektedir (Kadlubar ve Hammons 1987, Guengerich 1988). İnsanda, çeşitli promotajen ve prokarsinojenlerin biyoaktivasyonunda etkili olan temel enzimlerin CYPs 1A1, 1A2, 1B1, 2C9, 2D6, 2E1 ve 3A4 olduğu bildirilmiştir (Shimada ve ark. 1996).

1.5.1.2. Redüksiyon Reaksiyonları

Bu reaksiyonlar, hem mikrozomal hem de sitolojik redüktazlar tarafından katalizlendiği gibi, redüktaz ihtiva eden barsak bakterileri tarafından da katalizlenebilir. Bu tip reaksiyona en iyi örnek, besine renk veren tartrazin maddesinde bulunan nitro ve azo gruplarının indirgenmesi reaksiyonudur. Oda ve

arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2001), insan P450 ve NADPH-P450 redüktaz enzimleri ile o-asetiltransferaz enzimlerini sentezleyebilen farklı transforme *S. typhimurium* 1535 suşlarında bazı heterosiklik aminlerin ve prokarsinojenlerin metabolik aktivasyon ile genotoksik aktivite sergilediği gösterilmiştir.

1.5.1.3. Hidroliz Reaksiyonları

Esterler esterazlar tarafından, amidler ise amidazlar tarafından hidrolizlenir. Bu enzimler genel olarak birçok dokuda hücre sitozolünde bulunur (Güven 1999).

1.5.2. İkinci Evre Reaksiyonları

Konjugasyon reaksiyonları olarak da bilinen bu reaksiyonlar, polar bir grubun yabancı moleküllere eklenmesi ile meydana gelmektedir. Bu polar grup, ya bileşik üzerinde hazır bulunan bir gruba ya da birinci evre reaksiyonları sonucunda oluşan hidroksil gibi gruplara konjuge olabilir. Polar gruplar, yabancı molekülleri suda daha çözünür kılar ve böylece vücuttan uzaklaştırma kolaylaştırılarak toksik etkide bir azalma meydana getirilir. Konjugasyon reaksiyonları aşağıda kısaca açıklanmıştır.

1.5.2.1. Sülfatlama

Bir hidroksil grubuna sülfat eklenmesi, yabancı maddelerin konjugasyonunda izlenen önemli bir yoldur. Bu reaksiyon, sitozolik bir sülfotransferaz enzimi tarafından katalizlenmektedir. Reaksiyonun meydana gelebilmesi için fosfoadenozin fosfosülfat koenzimi de kullanılmaktadır. Aromatik ve alifatik hidroksil grupları yanında N-hidroksil grupları ile amino grupları da sülfatla konjuge olabilirler (Pluth ve ark. 2000).

1.5.2.2. Glukuronidasyon

Glukuronik asit, polar ve suda çözünebilir bir molekül olup hidroksil, karboksilik, amino ve tiol gruplarına kolayca eklenebilir. Bu reaksiyon, mikrozomal enzimler olan glukuronosil transferazlar tarafından katalizlenir. Diğer

karbonhidratlar da konjügasyonda görev alabilirler. Riboz ve ksilozun da benzer biçimlerde kullanıldıkları bilinmektedir (Güven 1999).

1.5.2.3. Glutasyon Konjugasyonu

Toksikolojik açıdan, özellikle reaktif ara ürünlerin uzaklaştırılmasında önemli bir fonksiyona sahip, temel bir hücre içi sülfidril bileşeni olan glutasyon, birçok memeli dokusunda (özellikle karaciğerde) bulunan ve üç peptitten oluşan bir bileşiktir. Glutasyonda sistein aminoasidinden kaynaklanan sülfhidril grupları, reaktif veya elektrofilik metabolitlere bağlanmaktadır. Bu reaksiyonlar, glutasyon transferazlar tarafından katalizlenir. İndirgenme durumunda olan glutasyon güçlü bir nükleofildir ve elektrofillerle reaksiyona girmektedir. Bu konjugasyon reaksiyonları çeşitli sitozolik ya da mikrozomal glutasyon-s-transferaz enzimleri ile katalize edilmektedir (Anders ve Dekant 1994, Bernardini ve ark. 1996). Ksenobiyotiklerin P450 ile oksidasyonunun ardından atılabilir duruma geldikleri glutasyon konjugasyonu, genellikle bir detoksifikasyon işlemi olarak kabul edilmektedir.

Bu enzim sınıfının önemi, alkil, aldehit ve keton gibi elektrofilik grupların metabolize edilmesinde rol almasıdır. Bu enzim, aerobik mikroorganizmalarda, bitki ve hayvanların çoğunda bulunmaktadır. Fungi , böcek ve nematodların kontrolünde fumigant olarak kullanılan ve klorlanmış sularda bulunan kloropikrin, SCE ve Ames testinde pozitif sonuç vermiş genotoksik bir maddedir. Mutajenik aktivitesinde oksidasyon, redüktif deklorinasyon ve özelliklede glutasyon ile konjugasyon reaksiyonlarının önemli rol oynadığı ileri sürülmüştür (Schneider ve ark. 1999).

1.5.2.4. Amino Asit Konjugasyonu

Yabancı organik bileşikler amino asitlerle konjugasyon yapabilirler. Bu işlevde kullanılan amino asit türden türe farklılıklar göstermekte ve benzer bir evrimsel gruba dahil türlerin aynı amino asidi kullandıkları görülmektedir. Glisin, en çok kullanılan amino asittir teşkil eder ve yabancı organik bileşiklerle konjugasyonu mitokondride bulunan açılaz enzimi tarafından katalizlenir (Güven 1999).

1.5.2.5. Metilasyon

Moleküllerdeki hidroksil, amino ve tiol grupları metiltransferaz enzimlerinden biri tarafından metillenebilirler. Bu reaksiyonlar, özellikle normal olaylarda oluşmakla birlikte, yabancı bileşikler aynı zamanda substrat olarak da kullanılabilir (Güven 1999).

1.6. BENZOTİYAZOL'ÜN BİYOLOJİK AKTİVİTESİ

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan benzotiyazol (BT), sigara dumanında bulunan, endüstriyel ve farmakolojik amaçlarla yaygın olarak kullanılan bir bileşiktir. Benzotiyazol grubuna ait çeşitli kimyasal yapıların anti-inflamatuar, antibakteriyal, antifungal, antitümörojenik ve analjezik olarak çok değişik etkileri bilinmektedir.

Benzotiyazol grubu bileşiklerden, yapısal olarak basit ve sentezi elverişli olan 2-(4-aminofenil) benzotiyazoller, *in vivo* ve *in vitro* ortamda, ovaryum, böbrek, kolon ve meme karsinoma kültür hücreleri üzerinde etkili ve seçici bir aktivite sergilemiştir. Yapılan bir çalışmada, 2-(4-aminofenil) benzotiyazol'ün bir türevinin *in vitro* ortamda kanserli meme hücrelerinde inhibitör etkili olduğu, diğer dört türevinin de insan meme kanseri modeline sahip farelerde, tümör büyümesini inhibe ettiği saptanmıştır (Shi ve ark. 1996). Bradshaw ve arkadaşları (1998) ise, 2-(4-aminofenil) benzotiyazol'ün 3 farklı pozisyonda fenil taşıyan türevlerinin kanserli insan ovaryum kültür hücrelerinde büyümeyi inhibe eden etkisi olduğunu tespit etmiştir. 2-(4-aminofenil) benzotiyazol serisinden geliştirilen bileşik CJM126, *in vitro*'da meme kanserli kültür hücrelerine karşı nanomolar (10^{-9} M) düzeyde etkili olmuştur. Özellikle 3'-metil, 3'-bromo, 3'-iyodo ya da 3'-kloro sübstitüentlerini taşıyan 2-(4-amino fenil) benzotiyazollerin *in vitro*'da kanserli ovaryum, akciğer, böbrek ve kolon kültür hücrelerinde etkili olduğunu göstermiştir.

In vivo şartlarda yapılan deney sonuçlarına göre de 2-(4-amino-3 metil fenil) benzotiyazol bu seride en etkili bileşik olarak seçilmiştir (Bradshaw ve ark. 2001). 2-(4-amino-3-metil fenil) benzotiyazol (DF 203) ile yapılmış olan daha önceki araştırmada da *in vitro* ve *in vivo* ortamdaki insan tümör hücrelerine özellikle kanserli meme hücrelerine karşı etkili ve seçici bir antitümör ajan

olabileceği vurgulanmıştır. Ayrıca bu bileşiğin metabolizması için sitokrom P450 (Cyp 1A1)'nin gerekli ve önemli olduğu, ancak antitümör aktivitesindeki rolünün kesin olmadığı sonucuna varılmıştır (Chua ve ark. 2000).

Hutchinson ve arkadaşları (2001)'nin yaptığı çalışmada, bir seri tek ya da iki bölgeden florlanmış 2-(4-amino-3-substitüe-fenil) benzotiyazol sentez edilerek, sitotoksik dozları insan meme, prostat ve kolon kültür hücrelerinde belirlendikten sonra etki testleri yapılmıştır. Hassas hücelere karşı kullanılan söz konusu benzotiyazol türevlerinden en etkili olan 2-(4-amino-3-metil fenil)-5-florobenzotiyazol grubu, insan meme tümör hücrelerinde dışarı atılmayan metabolitler üretmiştir. Bu benzotiyazol serisinin antitümör özgülüğünün belirlenmesinde önemli olan sitokrom P450 CYP1A1'in uyarılması ile ilgili gerekli bilgi henüz sağlanamamıştır. Şu andaki çalışmalar 2-(4-amino-3-metilfenil)-5-florobenzotiyazol'un farmasötik ve prelinik olarak geliştirilmesine odaklanmıştır. Benzotiyazolün antitümör ajan olarak sentezlenen quinol eter ve esterleri de in vitro koşullarda kolon ve meme kanser hücrelerine karşı nanomolar seviyede aktivite göstererek etkili olmuştur (Wells ve ark. 2000).

Benzotiyazolün 2-actelpiridin hidrazon türevleri, süspansüyon halde büyüyen lösemi ve lenfoma hücrelerinde, aynı zamanda Hela uterin karsinoma, kemik ostesarkoma, akciğer MB9812, A549 ve me Mcf-7 gibi katı tümör hücrelerinde sitotoksik etkili olduğu bulunmuştur. Bu aktiviteyi RNA ve DNA sentezini inhibe ederek gerçekleştirmiştir (Hall ve ark.1999).

Seo ve arkadaşları (2000)'nin yaptığı çalışmada, Spraque-dawley cinsi erkek sıçanlarda benzotiyazolün hepatik sitokrom p450 monooksijenaz (P450 s), VDP-glukroniltransferaz (VDP-GT), sülfotransferaz ve glutatyon-S-transferaz (GST) gibi metabolik enzimlerin aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Deneyle sonucunda BT'nin sitokrom p450'yi ve faz II metabolik enzimlerini etkili bir şekilde uyardığı tesbit edilmiştir.

Benzotiyazol' ün biyolojik aktivitesiyle ilgili olarak yapılan bir çalışmada, organik ve organometalik bazı türevlerin *Candida albicans'* a karşı antifungal etkili olduğu bulunmuştur (Küçükbay ve Durmaz 1997). Diğer çalışmalarda ise, *Enterococcus faecalis* ve *Staphylococcus aureus'* a karşı antibakteriyal etkili (Küçükbay ve ark. 1995), insan cytomegalovirus (HCMV)' de

proteaz aktivitesiyle inhibitör etkili benzotiyazol türevlerinin varlığı bildirilmiştir (Ogilvie ve ark. 1999). Bazı imidazo [2-1-6] benzotiyazol karboksilik yada asetikasit bileşiklerinin ise anti-inflamatuar ve aneljezik aktiviteleri yapılan farmakolojik çalışmalarca doğrulanmıştır (Palagiano ve ark. 1996).

Benzotiyazolün değişik biyolojik aktivitelerini araştıran farklı bir çalışmada, bazı yeni pirimido [2,1-b] benzotiyazol ve benzotiyazolo [2,3-b] quinazolin türevleri sentez edilerek, antitümör ve antiviral etkileri test edilmiştir. Aralarından 5c ve 8d kodlu 2 türevi geniş spektrumlu antitümör aktivite gösterirken, 5c ve 5d kodlu türevleri ise Herpes simplex tip-1(HSV-1)'de viral plakları %50-61 azaltarak antiviral etki sergilemiştir. (el-Sherbeny 2000). Ayrıca insan sitomegalovirus (HCMV) proteaz inhibitörü olan monobaktamların yapısında da 2-benzotiyazol yapısının olduğu bulunmuştur. Üstelik HCMV proteaz inhibitörü olan benzotiyazol türevlerinin bu etkisi, hücre-transfeksiyon metodu kullanılarak hücre içinde gösterilmiş ve plak redüksiyon testi ile ortaya çıkan antiviral aktivitenin proteaz inhibisyonundan kaynaklandığı vurgulanmıştır (Ogilvie ve ark. 1999).

(E 3040) olarak bilinen b-hidroksi-5,7-dimetil-2-metil amino-4-(3-piridilmetil) benzotiyazolün, bağırsak hastalıklarında antiinflamatuvar etkili bir ilaç olduğu bildirilmiştir (Yamada ve ark. 2000).

Benzotiyazol grubu bileşiklerin antimikrobiyal aktivitesi üzerine yapılan çalışmalardan birinde, benzotiyazolün azolyum tuzu ve nötral 2-aryl türevlerinin, bazı bakteri türlerinde *in vitro* antimikrobiyal etkili olduğu bulunmuştur (Çetinkaya ve ark. 1999). Diğer bir ekip ise *in vitro* koşullarda antimikrobiyal aktivite gösteren bazı benzotiyazol türevlerinin, wistar ırkı sıçanlarda yapılan *in vivo* deneylerinde, serum konsantrasyonlarında anti-bakteriyal etki göstermeksizin safra yolları ve karaciğerde hasara sebep olduğunu bildirmiştir (Durmaz ve ark. 1998).

Yukarıda belirtildiği gibi, çeşitli amaçlar için kullanılma olanağı bulunan ve ilaçlar için hammadde olarak sentez edilen 2-süstitüe benzotiyazol türevlerinin ilaç olabilme koşullarının sağlanmasında, yapı aydınlatılmasının yanısıra biyolojik aktivite tayini de gereklidir. Biyolojik etki çalışmaları içinde genotoksisite araştırmaları oldukça önem taşımaktadır. Genotoksik etki

araştırmalarında en az iki ayrı sistemde farklı yöntemlerin kullanılması son yıllarda geliştirilen çeşitli metodlar sayesinde giderek yaygınlaşmıştır (Vahl ve ark. 1996, Bacchi ve ark. 1998, Wang ve ark. 1999). Bu yöntemler mutajenesis-kanserojenesis ilişkisinden yararlanarak birçok çevre kirleticisi, çeşitli sektörlerde kullanılan kimyasal madde ve ilaca uygulanmaktadır (Liu ve ark. 1997, Ruiz ve Marzin 1997, Bostrom ve ark. 1998, Charles ve ark. 1999).

1.7. AMAÇ

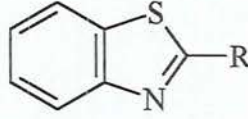
Edinilen bu bilgiler ve gerçekler doğrultusunda, genotoksisite (mutajenite) çalışmalarının önemi ve gerekliliği göz önüne alınarak planlanan bu tez çalışmasında, türevleri çeşitli biyolojik etkilere sahip olan 2 fenil benzotiyazol maddesinin ve farklı kimyasal gruplar bağlanmış türevlerinin mutajenik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda biri bakteriyal diğerleri ise memeli hücre sisteminde etkili olan 3 farklı test yönteminin kullanılması uygun görölmüştür. Teknik özellikleri daha sonra ayrıntılı olarak anlatılan bu yöntemler Salmonella mikrozom (Ames), kardeş kromatid değişimi (SCE) ve kromozom bozulma (CA) testleri'dir. Deneysel çalışmalardan alınacak sonuçlar karşılaştırılarak, test maddesinin mutajenik ya da genotoksik aktivitesi hakkında bir değerlendirme yapılacaktır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. TEST MADDELERİ

Bu çalışmada olası mutajenik etkileri araştırılan 2-süstitue benzotiyazol türevleri; Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Bölümü'nde sentezlenmiş, 2-(o-hidroksifenil)-benzotiyazol (**BT-3**), 2-(m-bromofenil) benzotiyazol (**BT-10**), 2-(o-metoksifenil)-benzotiyazol (**BT-15**), 2-(o-nitrofenil) benzotiyazol (**BT-18**) ve 2-(m-nitrofenil)-benzotiyazol (**BT-26**) olarak kodlanmıştır. Benzotiyazol türevlerinin sentezinde kondensasyon reaksiyonları denenmiştir. Bu tip reaksiyonlarda, serbest bir amin ve bununla kondensasyona giren bir aldehid, nitril veya karboksilikasit türevleri bulunmaktadır (Tusukiyama ve ark. 1996). Deneylerde kullanılan benzotiyazol türevlerinin kimyasal formülleri Çizelge 2.1.'de verilmiştir. Bu maddeler dimetilsülfoksit (DMSO) içinde 100000 µg/ml, 75000 µg/ml, 60000 µg/ml, 50000 µg/ml, 25000 µg/ml, 10000 µg/ml, 5000 µg/ml, 1000 µg/ml olacak şekilde çözünerek deneylerde kullanılmak üzere oda sıcaklığında saklanmıştır. Deneysel çalışmaların öncesinde, test maddelerinin uygulanacak yöntemlerde, kullanılacak olan hücreler üzerine sitotoksik etkili olan dozları belirlenmiştir. Bu işlemlere ait bilgiler ilgili yöntemin anlatıldığı bölümde verilmiştir.

Benzotiyazolün genel kimyasal formülü :



Çizelge 2.1. Benzotiyazol ve deneyde mutajenik etkileri test edilen türevlerinin kimyasal özellikleri

Bileşik	Açık Formül	Kimyasal İsmi	Kapalı Formül	Molekül Ağırlığı (g/mol)
BT- 3		2-(o-Hidroksifenil)-benzotiyazol	C ₁₃ H ₉ SNO	227.273
BT-10		2-(m-Bromofenil)-benzotiyazol	C ₁₃ H ₈ SNBr	290.174
BT-15		2-(o-Metoksifenil)-benzotiyazol	C ₁₄ H ₁₁ SNO	241.301
BT-18		2-(o-Nitrofenil)-benzotiyazol	C ₁₃ H ₁₈ SN ₂ O ₂	256.278
BT-26		2-(m-Nitrofenil)-benzotiyazol	C ₁₂ H ₈ SN ₂	212.268

2.2. SALMONELLA MİKROZOM (AMES) TESTİ

2.2.1. Kimyasal maddeler

4-Nitro-o-fenilendiamin (Aldrich), S9 tabletleri (Boehringer Mannheim), sitrikasit monohidrat, K₂HPO₄, Sodyumhidroksit (Codex Carloerba), Bacto agar (Difco), MgSO₄.7H₂O, NaH₂NH₄ (PO₄.4H₂O), L-Histidin.HCl (F.W.191.7), Sodyum azid, 2-Aminofluren, KCl, NaCl (Merck), Nutrient Broth No: 2 (Oxoid), D-Biyotin (F.W.247.3), Ampisilin trihidrad, 3-Metilkolantren, (Sigma)' dan temin edilmiştir.

2.2.2. *Salmonella typhimurium* test suşları

Deneyde, Ames ve arkadaşları tarafından, *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan *in vitro* mutasyonlarla geliştirilmiş TA100 ve TA98 suşları kullanılmıştır. Bu suşlar Dr. Nakamura (United States Department of Agriculture)' dan sağlanmıştır. Bu iki suş, Ames testi için gerekli olan orjinal histidin geni mutasyonlarına ilave olarak kazandırılan bazı özellikler ile nokta mutasyona sebep olan ajanlara ve çerçeve kayması mutajenlerine karşı daha hassas hale getirilmiştir.

2.2.3. Metod

Bu çalışmada, liyofilize olarak temin edilen *Salmonella typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 suşlarının master plaklarının hazırlanması, genetik özelliklerinin kontrol edilmesi ve stok kültürlerinin hazırlanması ve daha sonra, test maddelerinin mutajenik etkilerinin araştırılması Maron ve Ames (1983)'in geliştirdiği plak inkorporasyon metoduna göre yapılmıştır. Yöntemin ayrıntıları aşağıda verilmiştir.

2.2.3.1. Master plakların hazırlanması

Liyofilize kültürler, steril ortamda, nutrient broth besiyerine aktarılarak, 37°C'de 12 saat inkübe edilmiş ve histidin biyotin (HB) agara çizgi ekimiyle alınmıştır. 37°C de 48 saat inkübasyonun ardından, iyi izole olmuş bir koloni seçilerek, 0.3 ml fosfat tuz tamponu (PBS) içinde süspanse edildikten sonra,

histidin-biyotin-ampisilin (HBA) plaklarına çizgi ekimi yapılmış ve yine 37°C de 48 saat inkübe edilmiştir. Deney için kullanılacak uygun bakterileri içeren bu master plaklar +4°C de 1-2 ay süre ile saklanmış ve pasajlar yapılmıştır.

2.2.3.2. Stoklama ve stok kültürlerin açılması

Test suşlarının uzun süre canlılığını ve mutant özelliklerini koruyabilmeleri için stoklamaları yapılmıştır. Bunun için HBA agarda üremiş olan *Salmonella* suşlarından iyi izole olmuş, normal büyüklükteki bir koloni öze ile alınıp 2ml NB içeren tüplerde süspansiyon edildikten sonra 37°C' de bir gece inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılan kültürler %9 oranında DMSO ilave edilmiş ve -20°C de donması sağlandıktan sonra -80°C de saklanmıştır.

Kültürün açılması gerektiğinde, stok bakteri kültürü oda sıcaklığında eritilip bir öze dolusu alınarak, histidin biyotin (HB) agar plaklarına paralel ekim yapılmıştır. 37°C de 48 saat inkübe edildikten sonra, HB plaklarında üreyen bakterilerden iyi izole olmuş bir koloni steril transfer iğnesi ile 0.3 ml PBS içinde süspansiyon edilmiştir. Steril bir eküvyon ile alınan süspansiyon kültür HBA plaklarına 4-5 çizgi halinde paralel ekim yapılarak 37°C de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda master plaklar +4°C' de 1-2 ay süreyle buzdolabında saklanmış ve gerektiğinde deneyler için kullanılmıştır.

2.2.3.3. *Salmonella* suşlarının kontrol testleri

Testin güvenilirliği açısından test suşlarının orjinal mutasyonlara sahip olup olmadığını bilmek gerekir. Bu nedenle bakterilerin genetik özellikleri bazı testlerle kontrol edilmiştir.

Histidin gereksinimi

Bakterilerin minimal glikoz agar (MGA) üzerine ekilmeleri sonucu his⁻ bakteriler his⁺lerden ayırd edilir. Bu amaçla NB' da, bir gece üretilen bakterilerden, MGA ve HB plaklarına çizgi ekim yapılmıştır. 37°C de 48-72 saat inkübasyondan sonra HB plaklarında üreme gözlenirken MGA plaklarında üreme

gözlenmemiştir. Böylece kullanacağımız bakterilerin His^r mutasyonu'nu taşıdığı anlaşılmıştır.

***uvrB* mutasyonu**

Bu mutasyon ile bakterilerin, ultra viyole (UV) ışınlarının neden olduğu, replikasyon hatalarının düzeltilmesi için gerekli olan 'DNA onarım mekanizması' engellenmiştir. Bakterilerde bu mutasyonun varlığı UV ışınlarına duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için, NB' da bir gece büyütülen bakteri kültüründen 1 öze dolusu alınıp Nutrient Agar (NA) plağının tamamına paralel ekim yapılmıştır. Plağın yarısı (çizgileri kesecek şekilde) plastik bir plaka ile kapatılıp 15 watt gücünde bir UV lambası ile 33 cm yüksekten 8 sn. süre ile ışınlanmıştır. Işınlamadan sonra petri kapakları kapatılıp 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir. Kullanılan UV ışığı ile, *uvrB* mutasyonu taşıyan ve bundan dolayı DNA kesme-tamir etme mekanizması engellenmiş olan bakterileri öldürmektedir. Bundan dolayı UV'ye maruz kalan kısımda üreme olmazken, plastik kapakla kapatılan kısımda normal bir üreme gözlenmiştir ve böylece bakterilerin *uvrB* mutasyonunu taşıdığı gösterilmiştir.

***Rfa* mutasyonu kontrolü**

Bu mutasyon bakteri hücre zarının lipopolisakkarit yapısında oluşturulmuştur ve hücre zarının geçirgenliği arttırılmıştır. Varlığı kristal viyoleye duyarlılık testi ile tespit edilmiştir. Bu test için, NB' da bir gece büyütülen 0.1 ml sıvı kültür , 45°C'ye ısıtılmış 2 ml top agar üzerine ilave edilip daha sonra NA plaklarına dökülerek plaklara 8 işareti yaptırılmıştır. 10 dk. donması beklendikten sonra, plağın ortasına 0.5 cm çaplı steril filtre kağıdı diski yerleştirilip diskin ortasına % 0.1' lik kristal viyole karışımından 10µl damlatılmıştır. Kağıt boyayı emdikten sonra plaklar 37°C'de 24 saat inkube edilmiştir. İnkübasyon sonunda disk çevresinde 9 cm'lik üreme olmayan zon gözlenmiştir. Bu zonda, boya maddesi bakterilerin içine kolayca girip, bakterilerin üremesini engellediği için bakterilerin *Rfa* mutasyonunu taşıdıkları anlaşılmıştır.

R faktör varlığı kontrolü

Bakterilerde ampisilin için R-faktör taşıyan pKM101 plazmidlerinin varlığı, ampisiline dirençliliğinin ölçülmesi ile tespit edilmiştir. NB içinde büyütülen bakteri kültürü, % 0.8 ampisilin / 0.02M NaOH içeren HBA plaklarına çizgi ekimleri yapılarak, 37°C de 24 saat inkübasyon sonunda, plazmid içeren mutant bakterilerin ampisilinli ortamda büyüdüğü gözlenmiştir.

Spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü

Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his⁻ durumundan his⁺ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Bu sınırlar TA98 için 30-50 revertant / plak; TA100 için 120-200 revertant / plaktır (Maron ve Ames 1983). Bunu test etmek için, normal gecelik kültürden 0.1 ml alınıp, 45°C deki su banyosunda ısıtılan 2 ml top agar üzerine ilave edilmiştir. Daha sonra, 0.2 ml 0.5M histidin-biyotin solusyonu da eklenip test tüpü yavaşça çalkalanarak MGA plaklarına yayılmış ve 37°C de 48 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayılmıştır. Normal sınırlar içinde revertant sayı gösteren kültürler deneylerde kullanılmıştır.

2.2.3.4. Sıvı kültürün ml' sindeki bakteri sayısının belirlenmesi

Deneylerde kullanılan gecelik kültürlerin ml'sinde bulunan bakteri sayısını bulmak için yukarıda anlatılan şekilde hazırlanan gecelik kültürden NB ile 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ ve 10⁻⁶ olacak şekilde bir dizi seyreltmeler hazırlanmıştır. Bu seyreltmelerden NA plaklarına 10µl'lik miktarlarda damlatılarak, 37°C de 24 saat inkübe edildikten sonra plaklardaki koloniler sayılmış ve bakteri sıvı kültürünün ml'sinde 2.4x10⁹ bakteri olduğu belirlenmiştir. Bu işleme paralel olarak, bakteri kültürünün optik dansitesi 650 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülerek deneyler için uygun olan bakteri sayısına karşılık gelen değer, 0.165 OD olarak belirlenmiştir.

2.2.3.5. Test Maddelerin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması

Kullanılan test bileşiklerinin, test bakterileri için öldürücü dozunun saptanması amacıyla üst agara (top agar) 0.1 ml bakteri kültürü ile test

maddelerinin 100000 µg/ml, 75000 µg/ml, 60000 µg/ml, 50000 µg/ml, 25000 µg/ml, 10000 µg/ml, 5000 µg/ml ve 1000 µg/ml'lik dozları, test tüplerine 100'er µl. olacak şekilde eklenmiştir. Tüpteki karışım NA plaklarına dökülerek plaklar 37°C de 24 saat inkübe edilmiş, inkübasyondan sonra plaklardaki koloniler sayılmış ve kontrol plakları (kimyasal eklenmeyen) ile karşılaştırılarak LD50 değerleri belirlenmiştir.

2.2.3.6. Memeli Karaciğer Mikrozoamlarının Hazırlanması

Test maddelerinin metabolik ürünlerinin mutajen olup olmadığını araştırmak için kullanılması gereken karaciğer mikrozoam ekstresi sıçanlardan hazırlanmıştır. Bunun için 200gr ağırlığında Spraque dawley ırkı genç erkek sıçanlar, 80mg/kg olacak şekilde intraperitoneal olarak fenobarbital ve B-naftofloven enjekte edilerek, 5 gün süre ile mikrozomal enzim artışı uyarılmıştır

Bu süre sonunda sıçanlar boynu kırılarak (servikal dislokasyon) öldürülen sıçanlar diseksiyon masasında açıldıktan sonra karaciğer zedelenmeden çıkarılmış ve net ağırlığı bulunmuştur. Mikrozoam izolasyonuna başlamadan önce kullanılan tüm malzemeler steril edilmiş ve 0-2°C'de saklanmıştır. 1gr karaciğere 1ml olacak şekilde soğuk 0.15 M KCl ile karaciğer yıkandıktan sonra 1gr karaciğere 3ml olacak şekilde soğuk 0.15 M KCl eklenmiştir. Karaciğer steril pens ve makas yardımı ile küçük parçalara ayrılarak 'Junge kunkel ultra turrax' marka homojenizatör ile 24000 rpm de 20 saniye homojenize edilmiştir. Daha sonra homojenat, 9000xg'de 4°C de 30 dak. santrifüj (Heraus Varifüje 20RF) edildikten sonra, süpernatant kısım soğuk steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Olası bir kontaminasyonu önlemek amacı ile homojenat 0.45µm por gözenekli selüloz filtreler ile sterilize edilmiştir. Sterilite kontrolü için, mikrozomal fraksiyonun 0.1 ml'si NA ve HBA plaklarına yayma ekimi yapılmış ve plaklar 37°Cde 24 saat inkübe edilerek kontrol edilmiştir. Üreme olmayan ekstreler S9'lu deneylerde kullanılmak üzere -20°C de saklanmıştır.

2.2.3.6.1. Metabolik aktivasyon için yeterli mikrozomal fraksiyonun miktarının tesbiti

S9 karışımı hazırlamak için ticari olarak satılan S9 mutajenite tabletleri (Boehringer Mannheim) kullanılmıştır. Firma, tablet başına 2 ml ticari mikrozomal enzim kullanılmasını tavsiye etmiştir. Sıçan karaciğerinden elde edilen enzim için uygun konsantrasyonu belirlemek amacıyla 4 farklı konsantrasyon denenmiştir. Bu amaçla, bir S9 tableti 14 ml steril distile su içinde çözülüp, tüp başına 3.5 ml olacak şekilde 4 ayrı steril santrifüj tüpüne eşit miktarda aktarılmıştır. Tüplere sırasıyla 0.25 ml, 0.50 ml, 0.75 ml ve 1.00 ml mikrozomal enzim ilave edilip toplam hacimleri 5 ml'e tamamlanmıştır. Bir pozitif mutajen olan (20µg/100ml) 2-aminofluoren ile S9'lu mutajenite deneyi yapılmıştır. İçinde 0.2ml (0,5mM) histidin-biyotin solusyonu bulunan 2ml'lik top agar tüplerine 0.1ml 2-aminofluoren, 0.1ml TA98'in gecelik kültürü ve 0.5ml buzda bekletilen S9 karışımı ilave edilip çalkalanarak 37°C' deki MGA plaklarına dökülmüştür. 15dk. donması beklendikten sonra 37°C' de 48-72 saat ikübe edilip plaklardaki his⁺ koloniler sayılmıştır.

2.2.4. Ames mutajenite testinin yapılışı

Deneyler farklı zamanlarda iki bağımsız deney şeklinde S9'lu ve S9'suz olarak 2 safhada, her doz için paralel 3 plak halinde yapılmıştır.

2.2.4.1. S9' suz (-) deney

Bu amaçla, ilk olarak 0.2 ml histidin-biyotin çözeltisi ilave edilmiş 2' şer ml'lik top agar içeren deney tüpleri 45°C'lik su banyosunda ısıtılıp içlerine 0.1ml test maddesi ve 0.1 ml 12-16 saatlik bakteri kültürü eklenmiştir. Tüpler çalkalanarak 37°C'ye ısıtılmış MGA (Minimal glikoz agar) plaklarına dökülmüş ve plaklara hızla 8 işareti yaptırılarak top agarın plak üzerine homojen dağılması sağlanmıştır. 15 dk. donması beklendikten sonra plaklar ters çevirilip 37°C'lik etüvde 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilerdeki koloniler sayılmıştır. Sonuçların değerlendirilebilmesi için, test maddeleriyle yapılan deneylere paralel olarak, spontan kontrol, çözücü kontrol (DMSO) ve pozitif kontrol deneyleri de yapılmıştır. Pozitif kontrol maddesi olarak, TA100

suşu için 1µg/100µl (NaN₃) sodyum azid, TA 98 suşu için, 200µg/100µl 4-nitro-*o*-fenilendiamin kullanılmıştır.

2.2.4.2. S9' lu (+) deney

Deneyin S9'lu kısmında tablet başına 3 ml mikrozomal enzim olacak şekilde S9 karışımı hazırlanmış ve buz içinde bekletilmiştir. Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan yumuşak agarlı deney tüplerine, 0.5 ml buzda bekletilen S9 karışımı ilave edilerek işleme aynı şekilde devam edilmiştir. Ancak bu aşamada, pozitif kontrol olarak her iki suş için de 1µg/100µl 2-Aminofluoren deneylere paralel olarak denenmiş ve sonuçları çizelge 3.2 - 3.3.'e kaydedilmiştir.

2.2.5. Sonuçların değerlendirilmesi

Deneylerden elde edilen sonuçlar, standart hataları ile birlikte ortalamaları alınarak SPSS programında istatistiksel açıdan *student-t* testi ile değerlendirilmiştir. TA 98 için olan deney sonuçları Çizelge 3.2. de TA 100 için olan deney sonuçları ise Çizelge 3.3. de verilmiştir. Çizelgelerde, test maddelerinin her dozu için revertant koloni sayılarının ortalamaları 'ortalama ± stn hata' şeklinde gösterilmiştir. Her deneye paralel olarak spontan revertant kontrol, çözücü kontrol (DMSO kontrolü) ve pozitif kontroller yapılmıştır ve sonuçları Çizelge 3.2. ve 3.3. de aynı şekilde gösterilmiştir. Ayrıca S9' lu deneyler için gerekli mikrozom miktar tespiti testinin sonuçları da Çizelge 3.1. de gösterilmiştir.

2.3. KARDEŞ KROMATİD DEĞİŞİMİ (SCE) YÖNTEMİ

Invivo ve invitro olarak uygulanabilen SCE yöntemi, bu çalışmada invitro ortamda insan periferel kanından hazırlanan lenfosit kültüründe gerçekleştirilmiştir.

2.3.1. Kimyasal Maddeler

Kromozom Medyum B (Biochrom)'dan, giemsa (Fluka)'dan BrDU ve Hoecsht (Sigma)'dan temin edilmiştir.

2.3.2.Yöntem

2.3.2.1. Lenfosit Kültürü

Kan hücrelerinin kültür ortamına aktarılmasında ve kültüre edilen hücrelerin çeşitli ajanlarla işlem görmesi sırasında, toksik ve enfekte edici ajanlara karşı korunması amacıyla, deneyler hijyenik şartları sağlanmış hücre kültürü laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

İnsan periferik lenfosit kültürünün hazırlanması için, sağlıklı, sigara içmeyen ilaç kullanmayan 25-30 yaşlarındaki bir dişi ve bir erkekten steril enjektörle alınan periferik kan, 1/10 oranında heparinize edilerek, steril kabinde 2.5 ml'lik kromozom medyum B içeren kültür tüplerine 0.2 ml (6 damla) olarak ekilmiştir.

Kan hücrelerinin kültüre edilmesinden hemen sonra, karanlık ortamda saklanan steril BrdU solüsyonundan, her tüpe 10 µg/ml olacak şekilde ilave edilerek iyice karıştırılmış ve hazırlanan hücre kültürü, Heraus marka CO₂ inkübatöründe 37⁰C'de 72 saatlik inkübasyona alınmıştır. BrdU içeren DNA doğal ve yapay ışık tarafından bozulduğu için, hücre kültürü inkübasyon boyunca karanlıkta tutulmuştur.

2.3.2.2. Sitotoksik Etkinin Belirlenmesi

Test maddesi olan benzotiyazol serisinin daha önceden hazırlanan, 100000 µg/ml, 75000 µg/ml, 60000 µg/ml, 50000 µg/ml, 25000 µg/ml, 10000 µg/ml, 5000 µg/ml, 1000 µg/ml'lik dozları, uygulama kısmında anlatıldığı gibi lenfosit kültür ortamına 50'şer µl olarak uygulandığında, tümünün lenfositler üzerinde sitotoksik etkili olduğu belirlenmiş ve bu sebeple 750 µg/ml, 500 µg/ml, 300µg/ml, 150 µg/ml ve 75 µg/ml 'lık dozlar hazırlanarak deney tekrarlanmıştır. Sonuçta, 750 µg/ml, 500 µg/ml'lık dozların sitotoksik etkili olduğu saptanarak, deneylerin 300µg/ml, 150 µg/ml ve 75 µg/ml 'lık dozlarla yapılması uygun görülmüştür.

2.3.2.3.Test Maddelerinin Uygulanması

İnsan periferik lenfositleri, benzotiyazol türevlerinin yukarıda belirtilen konsantrasyonlarına 24 ve 48 saat olarak maruz bırakılmışlardır. Test maddeleri 24 saatlik uygulama için, kültür süresi başlangıcından 48 saat sonra, 48 saatlik

uygulama için ise 24 saat sonra 2.5 ml. Kromozom Medyum B içeren kültür ortamına ilave edilmişlerdir. Test maddeleri tüplere konduktan sonra, tekrar inkübatöre alınarak, kültür süresi olan 72 saatlik sürenin tamamlanması için 37°C 'de inkübe edilmiştir. Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce her tüpe, steril kolşisin solüsyonundan 50µl (0.06 µg/ml) ilave edilmiş ve tüpler hafifçe sallanarak karışmaları sağlanmıştır. Hücreler 2 saat süresince 37°C'lik CO₂ inkübatöründe kolşisin ile ön muameleye tabi tutulmuştur.

2.3.2.4. Lenfositlerin İzolasyonu

Kültür süresi olan 72 saatin bitiminde kültür tüpleri 1200 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri içeren 07-1 ml'lik sıvı iyice karıştırılarak hücreler homojen dağıtıldıktan sonra tüplere, 37°C sıcaklıktaki hipotonik solüsyon (% 0.4 KCl)'dan damla damla ve karıştırılarak 5 ml olarak ilave edilmiş ve tüplerin ağzı kapatılarak inkübatöre konulmuştur. Hücreler 37°C'de 30 dakika hipotonik solüsyonla muamele edilmiştir. Süre sonunda tüpler 15 dakika 1200 rpm'de santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Tüpün dibinde hücreleri içeren 07-1 ml'lik kısım pastör pipetiyle homojenize edilerek fikse edilmeye hazır hale getirilmiştir.

Birkaç saat öncesinde hazırlanarak buzdolabında soğutulmuş olan metanol:glasiyel asetik asit karışımı olan fiksatif damla damla ve karıştırılarak her tüpe 5 ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 20 dakika fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan ve çökelti homojenize edildikten sonra tüplere aynı şekilde tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem 3 defa tekrarlanmıştır. Üçüncü fiksasyon işleminden sonra tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı ve lenfosit hücrelerinin dipte beyaz bir leke şeklinde izole olduğu görülmüştür. Son santrifüjden sonra üstte kalan berrak süpernatant, dipte 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde atılmış ve preparat yapma işlemine geçilmiştir.

2.3.2.5. Preparat Hazırlanması

Tüpün dibinde toplanan hücreler Pasteur pipetiyle karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Pasteur pipetine 4-5 damla olacak şekilde hücre süspansiyonu

çekilmiştir. Özel olarak hazırlanmış düzeneğe tutturulan Pasteur pipetinden daha önce temizlenmiş, etiketlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanan lamaların üzerine 60 cm yükseklikten, farklı alanlara birer damla olmak üzere, hücre süspansiyonu damlatılarak hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerinde dağılması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonlarının lamalara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

2.3.2.6. Preparatların ışınlanması ve boyanması

Lamaların üzerindeki hücreler iki farklı yöntemle boyanmış ve hassasiyetleri karşılaştırılmıştır.

Teknik 1

Bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını sağlamak amacıyla Speit ve Haupter (1985)'in geliştirdikleri metod modifiye edilerek kullanılmıştır.

Bu amaçla bir günlük preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri bir film gibi örtülecek şekilde Sorensen tamponu ile kapatılmıştır. Işınlama solüsyonu 5 ml tampon A+5 ml tampon B+90 ml saf su şeklinde hazırlanmıştır. (pH 6.8). İnce bir tabaka halinde ışınlama solüsyonu ile örtülen preparatlar özel olarak yapılmış olan ışınlama kutusunda, karanlıkta 15 cm. yükseklikten ve 30 W'lık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen tek ultraviyole (UV) lambası ile 30 dakika ışınlanmıştır. Işınlama bittikten sonra preparatlar 1 x SSC solüsyonu içerisinde 58-60°C arasındaki sıcaklıklarda 60 dakika inkübe edilmiş ve hücreler inkübasyon süresi bitiminden 15 dakika önce Sorensen tamponu içerisinde % 5'lik olarak hazırlanan Giemsa boyası ile 26 dakika boyunca boyanmıştır.

Boyadan çıkarılarak üç ayrı kaptaki saf su içinden geçirilen preparatlar dik şekilde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirildikten sonra mikroskopik incelemeler yapılmıştır.

Teknik 2 (FPG)

Floresan bir boya olan Hoechst 33258, DNA'nın A-T baz çiftlerine bağlanabilen bir bileşiktir. Timin bazı analogu olan BrdU ile muamele görmüş

kromozomlar, Hoechst 33258 (bisbenzimid) ile boyandığında, bu maddeyi taşımayan kromozomlar Hoechst boya ile bağlanabildiği için parlak floresan verirken, BrdU'yu bünyesine almış kromozom kolları boya ile bağlanamadığı için soluk görünmektedir. Bu soluk görüntü direk olarak Hoechst ile boyanan preparatlarda floresan mikroskop ile ya da daha sonra fotolizise maruz bırakılıp Giemsa ile boyanarak ışık mikroskopunda gözlenebilmektedir (FPG) (Benn 1992).

Hoechst boyanın stok solüsyonu 0.5 mg/ml. olarak steril su ile hazırlanarak ışık görmeyecek şekilde 1 ay süreyle buzdolabında saklanmıştır. Stok Hoechst boya solüsyonu kullanılacağı zaman PBS ile 1:100 oranında seyreltilmiştir.

Yöntem kısmında anlatıldığı şekilde hazırlanan preparatlar sırasıyla; 5 dakika PBS solüsyonda ve 10 dakika Hoechst boya solüsyonunda tutulduktan sonra PBS ve distile sudan geçirilerek yıkanmıştır. Daha sonra lam üzerine MacIlvaine's solüsyonu damlatılarak lamel kapatılmış ve kromozomlar floresan mikroskopta incelenmiştir.

2.3.3. Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) Sayısının Saptanması

SCE sayısı, 5 benzotiyazol türevinin, 2 vericinin lenfositleri üzerinde 24 ve 48 saat olarak uygulanan her 3 dozu için, kromozomları iyi dağılmış ve ikinci mitoz bölünmeyi geçiren 50 hücrede saptanmıştır. SCE sayısı bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla belirlenmiştir. Ortadan bir parça değişimi olmuş ise bu 2 SCE olarak değerlendirilmiştir. Uçtan bir parça değişimi olmuş ise bu da 1 SCE olarak sayılmıştır. Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekir. Bu durumdaki kromozomlarda SCE yoktur.

Mikroskobik İncelemeler

Hazırlanmış olan daimi preparatlar Olympus marka ışık mikroskobu ya da Olympus marka floresan mikroskopunda DAPI filtre ile immersiyon objektifinde incelenerek SCE, CA, MI ve RI sayımları yapılmış ve gerekli görülenlerin fotoğrafı çekilmiştir (10x100=1000 büyütmede).

2.4. Kromozom Bozulmaları (CA)' nın Saptanması

Erkek ve dişi verici için hazırlanan preparatlardan, 24 saatlik muamele süresi için 1. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden, 48 saatlik muamele süresi için ise birinci ve ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden kromozomları iyi dağılmış 100 hücre değerlendirilerek kromozom aberasyonları tespit edilmiştir. Bu hücreler içinde gözlenen kromozom yapı ve sayı anormallikleri kaydedilmiştir. İncelenen 100 hücre içinde anormal hücrelerin yüzdesi ile hücre başına düşen CA sayısı (CA/hücre) saptanmıştır.

2.5. Replikasyon İndeksi (RI)'nin Saptanması

Replikasyon indeksini hesaplamak amacıyla hem erkek hem de dişiden hazırlanan preparatların her birisinden tesadüfi seçilmiş 50 hücre olmak üzere toplam 100 hücre incelenmiştir. Bunun için preparatlar incelenirken gözlenen birinci, ikinci ve üçüncü metafaz devresindeki hücreler sayılmıştır. Bu verilerden faydalanılarak, RI aşağıdaki formülle hesaplanmıştır.

$$RI=1x(M_1)+2x(M_2)+3x(M_3)/100$$

M_1 : 1. mitozdaki hücre sayısı

M_2 : 2. mitozdaki hücre sayısı

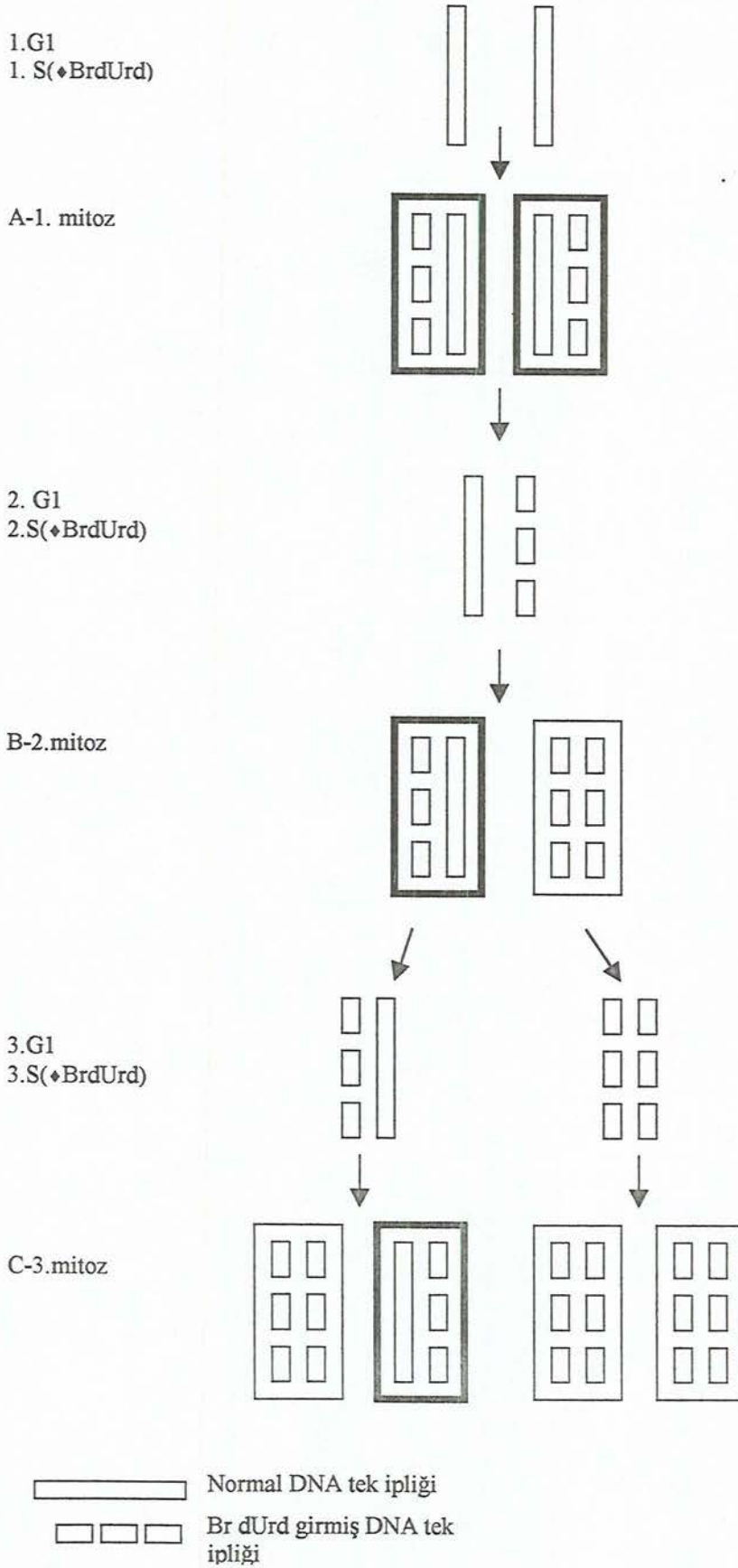
M_3 : 3. mitozdaki hücre sayısı

Birinci, ikinci ve üçüncü metafazlar şu şekilde ayırılmıştır (Topaktaş ve Speit 1990). Bromodeoksiuridin (BrdU), DNA'nın yapısında bulunan deoksitimin (dT) bazının analogu olduğu için, kültür tüplerine BrdU konulduğunda hücre DNA'sını replike ettiği sırada (1.S fazında) yeni sentezlenen polinükleotid ipliğinde dT'nin yerini ortamda bulunan BrdU alacaktır. Böyle hücrelerin kromozomları boyandığında bir kromozomun her iki kromatidi de (dT/BrdU : dT/BrdU) homojen koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler 1. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden meydana gelen yavru hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdU'lu ortamda 2.S fazı) dT ihtiva eden polinükleotid ipliğine komplementer olarak sentezlenen yeni DNA ipliğinde BrdU yer alacaktır. Bu iki polinükleotid ipliği bir kromozomun koyu boyanan kromatidini (dT/BrdU) oluşturacaktır. BrdU'lu ipliğe komplementer olarak

sentezlenen yeni ipliğe de BrdU girecektir ve bir kromatidi oluşturan iki polinükleotid ipliği de BrdU ihtiva ettiğinden (BrdU/BrdU) bu kromatid aynı kromozomun açık boyanan kromatidini oluşturacaktır. İşte bu hücrenin metafaz devresinde preparat yapıldığında, hücrenin tüm kromozomlarının kromatidlerinden biri koyu diğeri ise açık boyanacaktır. Bunlar da ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir. Bu hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdU'lu ortamda 3.S fazı) 2. mitozda açık boyanan kromatid'ten tüm polinükleotid ipliklerine BrdU girmiş olan bir kromozom meydana gelecektir ve bu kromozomun her iki kromatidi de açık renkte boyanacaktır. İkinci mitozda koyu boyanan kromatid'ten ise, bir kromatidin her iki ipliği BrdU'lu ve diğeri kromatidin bir ipliği BrdU'lu diğeri ipliği timinli olan bir kromozom oluşacaktır. Bu kromozom boyandığında da bir kromatidi açık renkte bir kromatidi de koyu renkte boyanacaktır. İşte böyle hücrelerin metafaz devresinde preparat yapıldığında bazı kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık diğeri kromatidi de koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler de 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 2.1.). Bu şekilde 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücreler ayırt edilmiş, bu hücrelerin 100 hücre içindeki sayısı saptanmış, bundan da yukarıda belirtilen formüle göre RI hesaplanmıştır.

2.6. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

Lenfosit hücrelerine 48 saat uygulanan test maddelerinin her bir dozu için toplam 1000 hücre sayılmış ve bunlar arasında metafaz devresinde olan hücreler saptanarak kaydedilmiştir. Bu çalışmada mitoz bölünmenin sadece metafaz devresindeki hücreler gözlemlendiğinden, 1000 hücre içerisinde metafaz devresinde olan hücrelerin oranı yüzde cinsinden hesaplanarak mitotik indeks bulunmuştur.



Şekil 2.2. BrdU'nin DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3.mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin şematik gösterimi, Topaktaş ve Speit (1990)

3. BULGULAR

3.1. *Salmonella typhimurium* suşlarının kontrolü

Deneylerde kullanılan *S. typhimurium* suşlarının genetik özellikleri ayrı ayrı test edildiğinde, TA 98'in his D 3052 kodlu çerçeve kayması mutasyonunu, TA 100'ün ise his G 46 kodlu nokta mutasyonunu taşıyarak histidin oksotrofu olduğu saptanmıştır. Ayrıca UV'ye olan duyarlılık ile *uvrB* mutasyonunu, kristal viyoleyi hücre içine alabilme özelliği ile *Rfa* mutasyonunu ve ampisilinli ortamda yaşayabilmeleri sayesinde pKM101 plazmitini taşıdıkları da doğrulanmıştır. TA 98 için 20-50 arasında, TA 100 için ise 70-90 arasında spontan geri dönüşüm sayısı bulunarak, test bakterilerinin deneyler için uygunluğu doğrulanmıştır.

3.2. Sitotoksik dozların ve uygun mikrozomal enzim miktarının belirlenmesi

Benzotiyazol türevlerinin 100000 µg/ml, 75000 µg/ml ve 60000 µg/ml'lik dozlarının *S. typhimurium* TA 98 ve TA 100 üzerinde sitotoksik olduğu belirlenerek deneylerin 50000 µg/ml ve altındaki 25000 µg/ml, 10000 µg/ml, 5000 µg/ml ve 1000 µg/ml dozlarla yapılması uygun bulunmuştur. Aynı dozlar lenfosit hücre kültürüne uygulandığında 300 µg/ml'lik dozun üzerindeki tüm konsantrasyonlar sitotoksik etkili bulunmuş ve kardeş kromatid değişimi ile kromozom bozulma analizi için bu doz dahil 150 µg/ml ve 75 µg/ml'lik konsantrasyonlar araştırılmıştır.

S9 karışımını hazırlamak için ticari olarak sağlanmış mutajenite test tabletlerine eklenecek olan mikrozomal enzimler sıçan karaciğerinden elde edilmiştir. En uygun reaksiyon dozu en fazla üreme sağlayan 3 ml mikrozom/tablet olarak bulunmuştur (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Mikrosomal fraksiyonun miktar tespiti

DENENEN DOZLAR ml mikrosom/0.5ml S9	REVERTANT KOLONİ SAYISI
2-Aminofloren 0.25	393.30±164.47
0.50	572.45±34.15
0.75	1040.45±478.21
1.00	720.30±76.80
Spontan kontrol 0.25	25±10.15
0.50	20.60±6.03
0.75	26.30±4.33
1.00	19±2.83
DMSO kontrolü 0.25	21±10
0.50	24±5.30
0.75	23±60
1.00	19.60±30

Her doz, üç paralel plak ile aynı anda test edilerek farklı zamanlarda yapılan iki deneyin ortalamaları alınıp tabloya kaydedilmiştir (ort.±st.h).

3.3. 2-sübstitüe fenil benzotiyazol türevlerinin *S. typhimurium* üzerine mutajenik etkileri

Ames testinde, test maddelerinin uygulandığı suşlardan *Salmonella typhimurium* TA 98 çerçeve kayması mutasyonu TA 100 suşu ise nokta mutasyonu taşıdığı için bu tip mutasyonlara yol açabilen mutajenlerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmanın ilk aşamasında benzotiyazol'un yeni sentezlenmiş beş türevi olan 2-(o-hidroksifenil)-benzotiyazol, 2-(m-bromofenil) benzotiyazol, 2-(o-metoksifenil)-benzotiyazol, 2-(o-nitrofenil)-benzotiyazol ve 2-(m-nitrofenil)-benzotiyazol'un çerçeve kayması ve nokta mutasyonlarına neden olup olmadığı Ames testi ile sınanmıştır. Bu amaçla test maddelerinin 5000 µg/plak, 2500 µg/plak, 1000 µg/plak, 500 µg/plak 100 µg/plak 'lık beş dozu, metabolik aktivasyon enzimlerinin bulunduğu ve bulunmadığı koşullarda, *S. typhimurium* 'un çerçeve kayması mutasyonuna sahip TA 98 ve nokta mutasyonuna sahip TA 100 suşlarına uygulanarak geri dönüşüm (revertant) kolonileri sayılmıştır. Sonuçlar çözücü kontrol verileri ile Student's *t*-testi uygulanarak istatistik olarak karşılaştırılmıştır.

Bu değerlendirmeden elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2. ve 3.3. 'de verildiği gibi, test maddelerinin doza ve metabolik aktivasyona bağlı olarak artan sayıda geri dönüşüm kolonileri oluşturduğunu göstermektedir. Fakat, geri dönüşüm

Çizelge 3. 2. Benzotiyazol BT(3), BT(10), BT(15), BT(18) ve BT(26)'nın *Salmonella* Mikrozom Testinde *Salmonella typhimurium* TA98 ile verdiği cevaplar

Madde Adı	Uygulanan Doz µg/ml	S9 (-)	S9 (+)
(BT-3)	50000	32.33 ± 4.33	36.33 ± 0.88
	25000	27.38 ± 1.20	29.00 ± 3.60
	10000	25.00 ± 4.72	30.50 ± 1.15
	5000	26.00 ± 2.51	26.00 ± 3.51
	1000	18.00 ± 2.08	21.33 ± 1.20
(BT-10)	50000	36.66 ± 2.72	38.33 ± 1.76
	25000	33.33 ± 4.25	34.66 ± 1.76
	10000	25.35 ± 3.17	31.38 ± 3.71
	5000	19.00 ± 3.46	22.00 ± 2.36
	1000	22.00 ± 1.15	23.75 ± 1.52
(BT-15)	50000	31.66 ± 1.45	35.00 ± 2.08
	25000	23.00 ± 3.21	27.33 ± 2.33
	10000	22.66 ± 2.40	26.66 ± 3.46
	5000	21.00 ± 2.64	22.16 ± 2.72
	1000	18.66 ± 2.02	24.45 ± 1.45
(BT-18)	50000	84.33 ± 2.33***	89.66 ± 0.88***
	25000	73.66 ± 1.20***	81.33 ± 1.45***
	10000	45.62 ± 2.84**	60.16 ± 1.45**
	5000	29.00 ± 3.46	30.40 ± 0.85
	1000	23.66 ± 1.20	24.33 ± 2.90
(BT-26)	50000	47.00 ± 2.08*	58.50 ± 2.08*
	25000	38.33 ± 2.72*	42.33 ± 1.76*
	10000	24.66 ± 4.17	38.44 ± 1.45
	5000	20.66 ± 4.66	29.00 ± 1.15
	1000	22.00 ± 3.60	26.50 ± 1.50
Spontan	-	22.66 ± 1.45	27.33 ± 1.76
DMSO	-	23.00 ± 2.30	32.00 ± 1.73
4-NFD	-	470 ± 5.58***	-
2-AF	-	-	625 ± 3.40***

DMSO ; Dimetil sülfoksit, **4-NFD** ; 4-Nitro-o-fenilendiamin, **2-AF** ; 2-Aminofluoren

(*) p< 0.05, (**) p< 0.01, (***) p< 0.001

Her doz 3 paralel ekim ve 2 bağımsız deney ile test edilmiştir.

Çizelge 3.3. Benzotiyazol BT(3), BT(10), BT(15), BT(18) ve BT(26)'nın *Salmonella* mikrozom testinde *Salmonella typhimurium* TA100 ile verdiği cevaplar

Madde Adı	Uygulanan Doz µg/ml	S9 (-)	S9 (+)
(BT-3)	50000	99.33 ± 5.20	113.33 ± 6.76*
	25000	97.30 ± 1.45	106.66 ± 6.74
	10000	82.40 ± 0.88	101.40 ± 4.25
	5000	77.25 ± 1.20	90.56 ± 7.88
	1000	61.30 ± 5.54	90.05 ± 2.40
(BT-10)	50000	96.45 ± 2.90	105.36 ± 5.13
	25000	80.00 ± 5.17	96.66 ± 8.11
	10000	78.42 ± 3.05	86.50 ± 6.35
	5000	62.24 ± 4.70	82.00 ± 2.64
	1000	60.00 ± 3.28	75.33 ± 3.17
(BT-15)	50000	90.35 ± 2.88*	99.66 ± 5.04
	25000	69.50 ± 3.48	92.33 ± 2.60
	10000	69.33 ± 1.20	84.00 ± 5.54
	5000	67.66 ± 4.37	76.33 ± 4.33
	1000	55.42 ± 3.84	75.50 ± 1.20
(BT-18)	50000	95.33 ± 4.48	96.16 ± 3.05
	25000	87.66 ± 1.45	93.48 ± 0.88
	10000	83.38 ± 3.71	89.66 ± 4.91
	5000	81.65 ± 1.76	82.00 ± 2.88
	1000	72.32 ± 2.33	69.33 ± 4.63
(BT-26)	50000	71.40 ± 3.75	91.56 ± 1.45
	25000	60.50 ± 1.76	87.48 ± 5.78
	10000	75.66 ± 4.09	78.66 ± 7.31
	5000	76.33 ± 4.17	80.33 ± 2.40
	1000	77.24 ± 6.93	77.30 ± 5.19
Spontan	-	88.30 ± 3.51	93.00 ± 2.08
DMSO	-	79.66 ± 3.17	81.33 ± 3.52
SA	-	895 ± 3.25***	-
2-AF	-	-	1036 ± 5.70***

DMSO ; Dimetil sülfoksit, **4-NFD** ; 4-Nitro-o-fenilendiamin, **2-AF** ; 2-Aminofluoren

(*) p< 0.05, (**) p< 0.01, (***) p< 0.001

Her doz 3 paralel ekim ve 2 bağımsız deney ile test edilmiştir.

sayıları spontan ve çözücü kontrol değerleri ile karşılaştırıldığında büyük çoğunlukla istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Söz konusu maddeler nokta mutasyonu taşıyan TA 100 suşunda hiçbir mutajenik etki göstermezken çerçeve kayması mutasyonu taşıyan TA 98 suşunda, bu test maddelerinden yalnızca 2-(o-nitrofenil)-benzotiyazol (**BT-18**)'ün 50000 µg/ml, 25000 µg/ml ve 10000 µg/ml 'lık dozları ile 2-(m-nitrofenil)-benzotiyazol (**BT-26**) ün 50000 µg/ml ve 25000 µg/ml dozları, metabolik aktivasyon enzimleri bulunan ve bulunmayan ortamlarda geri dönüşümü önemli ölçüde arttırarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

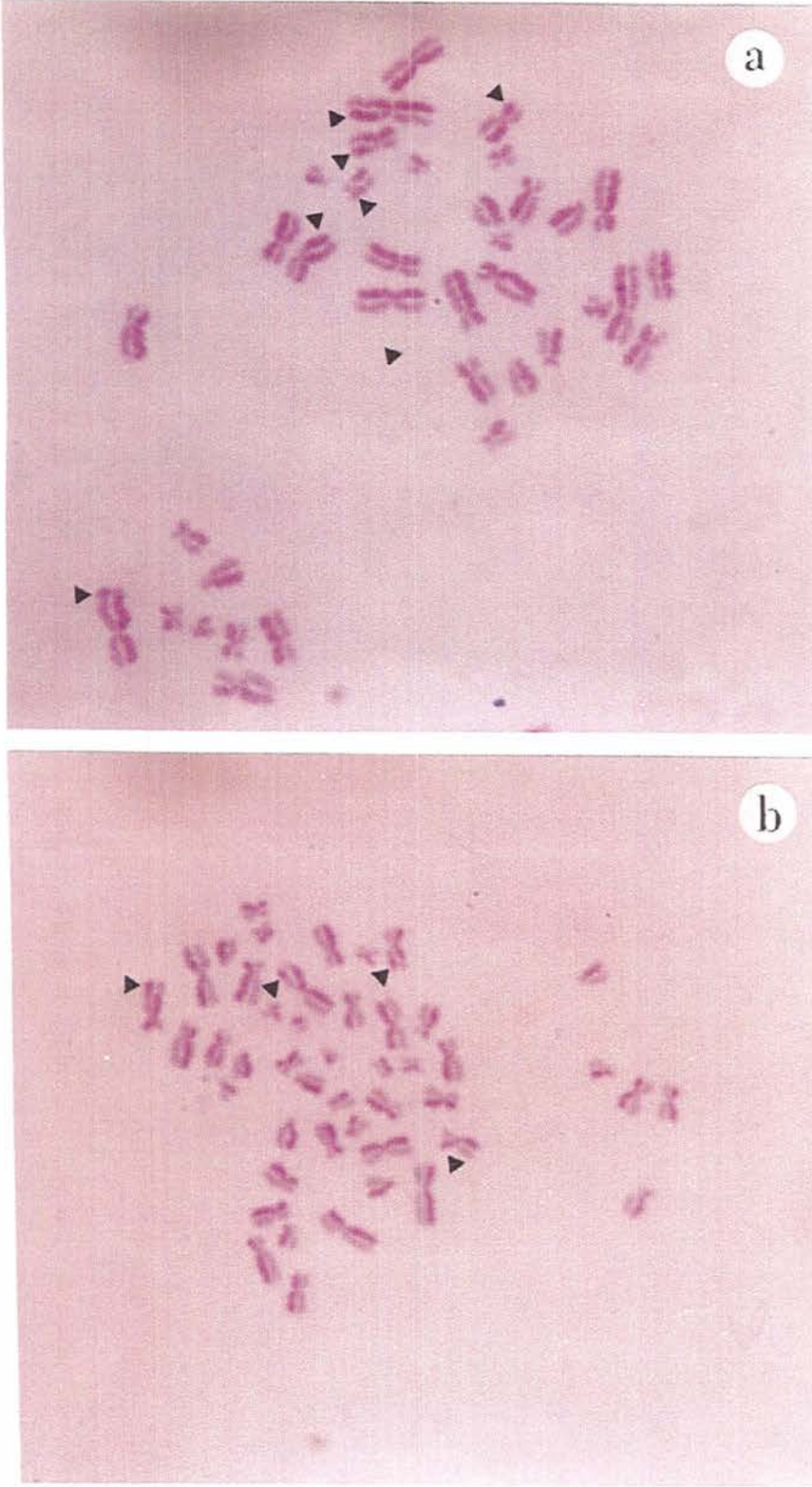
Ayrıca her iki suş için, pozitif kontrol olarak kullanılan 4-nitrofenilen diamin, sodyum azid ve 2- aminofluoren beklenildiği gibi oldukça yüksek mutajenik etki göstermişlerdir.

3.4. SCE için Farklı Boyama Yöntemlerinin Uygulanması

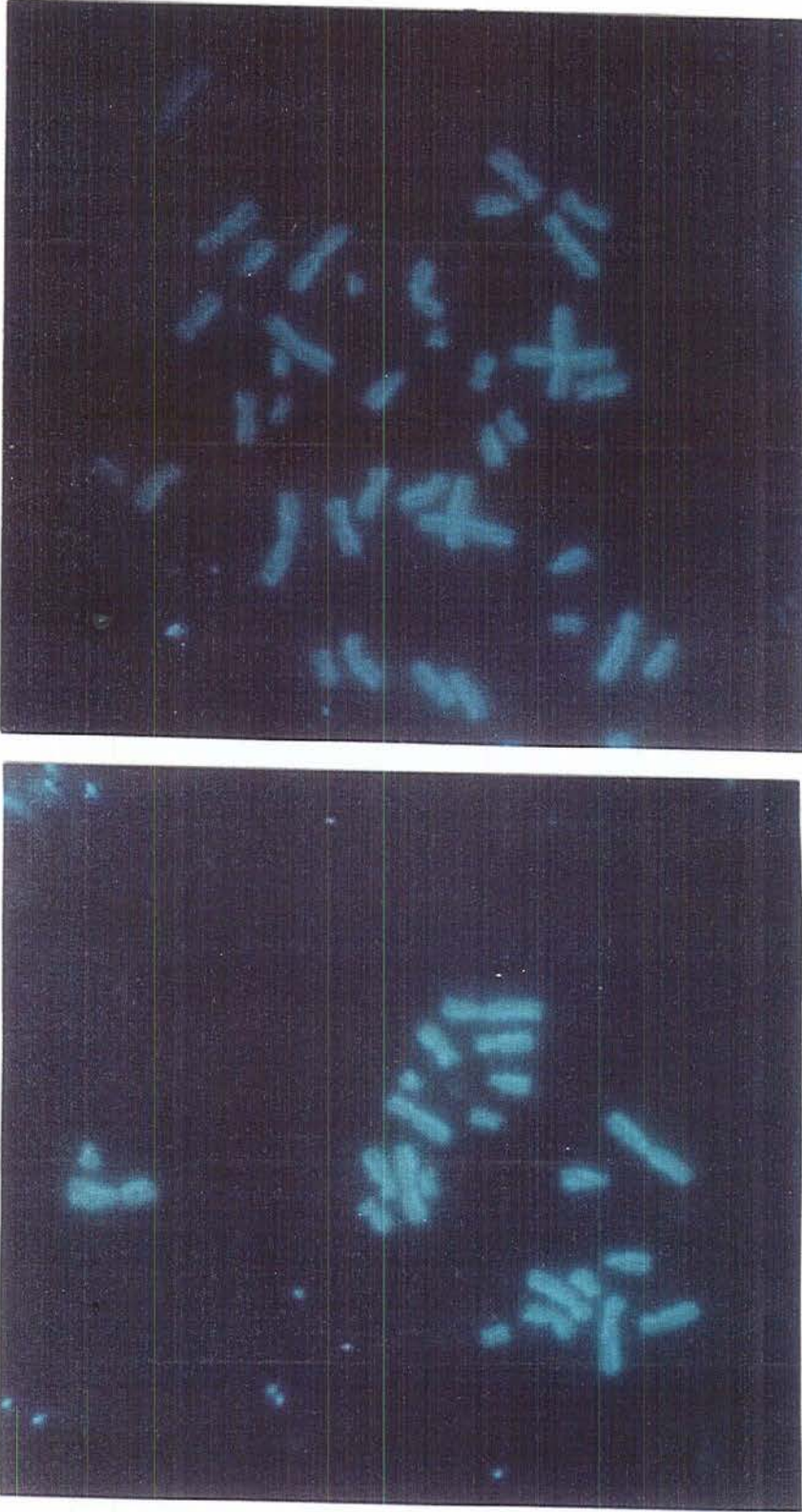
Test maddelerinin uygulandığı hücrelerde SCE oluşumlarını en hassas bir şekilde tesbit edebilmek için bilinen iki yöntem denenmiştir. Çok yaygın olarak kullanılan BrdU ile inkübe edilmiş hücrelerin Giemsa ile boyanması oldukça temiz ve net görüntüler vermiştir. Fakat son yıllarda geliştirilen ve floresan bir boyama olan Hoechst 33258 tekniği daha kısa süreli ve kuvvetli floresan ışımaya verdiği düşünülerek denenmiştir. Bu çalışmamızda uygulanan her iki boyama tekniği ile, kromozomların kardeş kromatidleri farklı tonlarda boyanarak görüntülenmiştir (Şekil 3.1. ve 3.2.).

3.5. BrdU uygulanmış lenfosit hücrelerinde Mitoz 1, Mitoz 2 ve Mitoz 3 safhalarının belirlenmesi

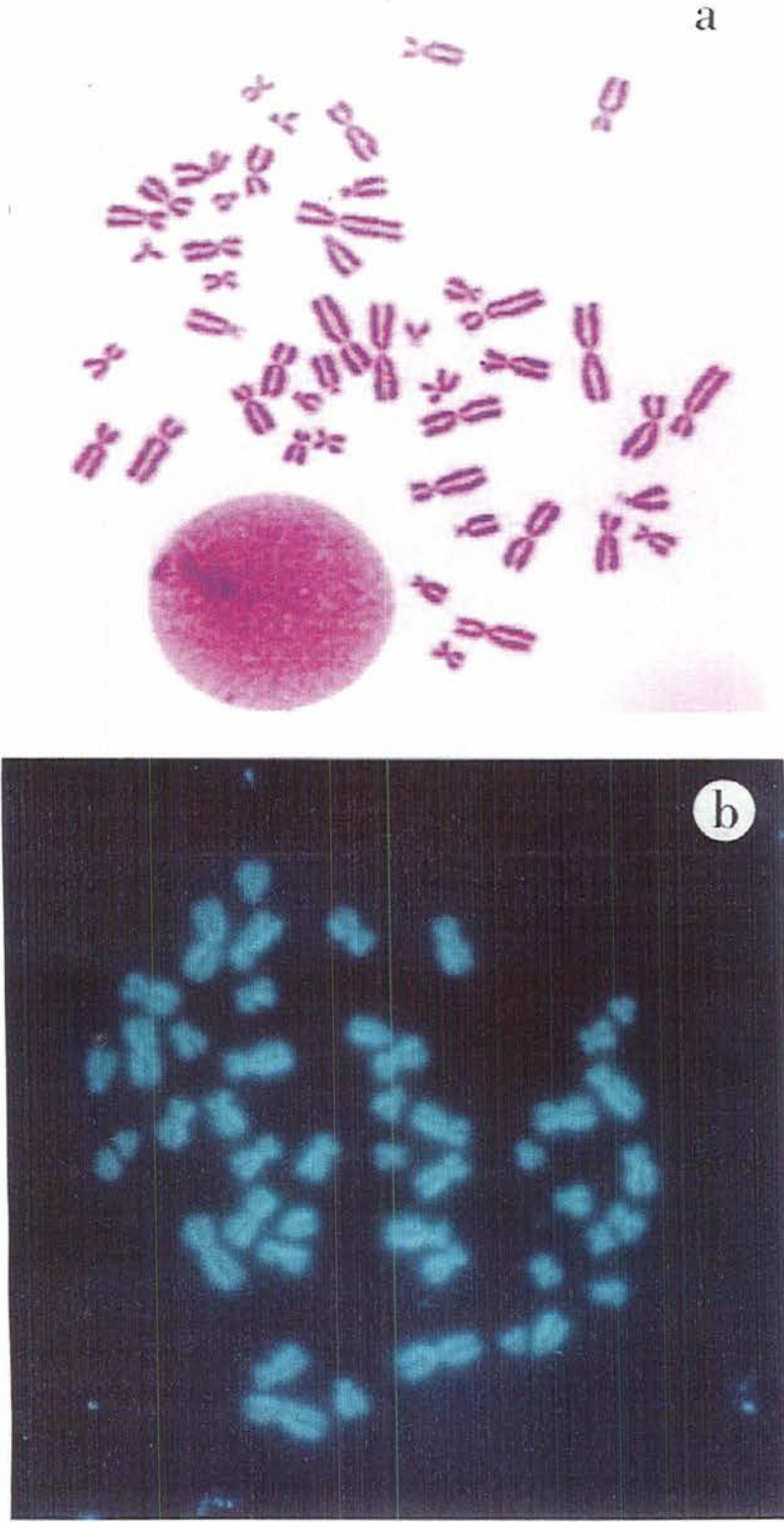
Kültüre edilmiş lenfosit hücrelerine uygulanan BrdU maddesinin, hücre bölünme süreçleri sırasında kromozom yapılarında bulunma durumuna göre kazandığı farklı boyanma özelliği, Mitoz 1, Mitoz 2 ve Mitoz 3 hücrelerini belirlemede kullanılmıştır. Bu özellikler ise kardeş kromatid değişimlerini mitoz 2 hücrelerinde, replikasyon indeksi (RI) sayımlarını mitoz 1, mitoz 2 ve mitoz 3 hücrelerinde belirlemek için gereklidir. Şekil 3.3.ve 3.4.'de görüldüğü gibi mitoz 1 safhasında kardeş kromatidler eşit oranda boyanmış, mitoz 2'de iki kardeş



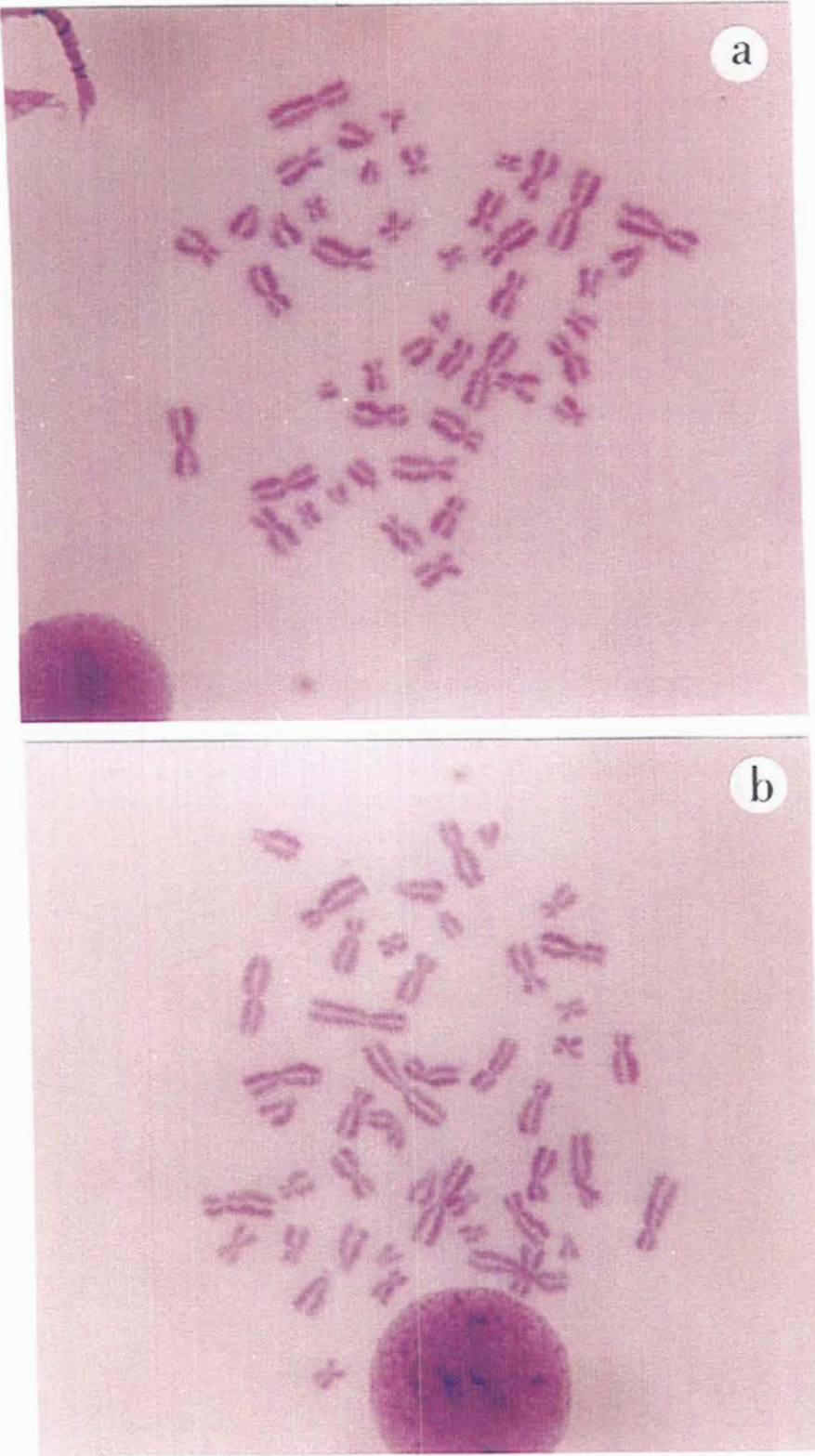
Şekil 3.1. İnsan lenfosit kromozomlarında kardeş kromatid değişimleri



Şekil 3.2. Hoechst 33258 ile boyanmış insan lenfositlerinde ikinci mitoz bölünme kromozomları



Şekil 3.3. a-) Giemsa ve b-) Hoechst 33258 ile boyanmış insan lenfositlerinde birinci mitoz kromozonları



Şekil 3.4. Giemsa ile boyanmış insan lenfositlerinde a-) ikinci mitoz ve b-) üçüncü mitoz bölünme kromozomları

kromatid farklı yoğunlukta boyanmış ve mitoz 3'de ise kardeş kromatidler ya aynı oranda açık ya da farklı yoğunlukta boyanmışlardır.

3.6. 2-Sübstitüe fenil benzotiyazol türevlerinin insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi üzerine etkileri

İnsan periferik lenfositleri Materyal ve Metot'da belirtildiği gibi kültüre edildikten sonra söz konusu test maddelerinin 300 µg/ml, 150 µg/ml ve 75 µg/ml'lik üç ayrı dozuna maruz bırakıldıktan sonra kardeş kromatid değişimleri (SCE) ikinci metafazda sayılarak, hücre başına düşen SCE sayısı hesaplanmıştır. Elde edilen veriler, spontan ve çözücü kontrol verileri ile birlikte Student's *t*-testi ile istatistiksel anlamda değerlendirilerek herbir test maddesi için ayrı çizelgelerde verilmektedir (Çizelge 3.4.-3.8.).

Bu değerlendirmeye göre, 300 µg/ml, 150 µg/ml ve 75 µg/ml'lik dozları çalışılan test maddelerinin, lenfosit kültüründeki 24 saatlik uygulanmalarının, kardeş kromatid değişimi (SCE) üzerine anlamlı bir etkisi olmadığı saptanmıştır. Ancak aynı dozlarla 48 saat inkübe edilen lenfosit kromozomlarında yapılan sayımlarda, 2-(*o*-hidroksifenil)-benzotiyazol (**BT-3**) (Çizelge 3.4.), 2-(*o*-metoksifenil)-benzotiyazol (**BT-15**) (Çizelge 3.6.) ve 2-(*o*-nitrofenil)-benzotiyazol (**BT-18**) (Çizelge 3.7.) maddelerinin 300 µg/ml'lik dozları çözücü kontrol değerleri ile karşılaştırıldığında anlamlı sonuçlar verdiği, diğer dozlar ile 2-(*m*-bromofenil)-benzotiyazol (**BT-10**) (Çizelge 3.5.) ve 2-(*m*-nitrofenil)-benzotiyazol' (**BT-26**)'ün (Çizelge 3.8.) SCE oluşumu üzerine etkili olmadığı görülmüştür. Ayrıca, pozitif kontrol olarak kullanılan mitomisin C (MMC)'nin spontan ve pozitif kontrol değerlerine göre SCE oluşumunu önemli ölçüde uyardığı görülmüştür.

3.7. 2-Sübstitüe fenil benzotiyazol türevlerinin uygulandığı insan lenfositlerinde replikasyon indeksi ve mitotik indeks

Genotoksik ya da mutajenik potansiyelleri araştırılan test maddelerinin lenfosit hücrelerinin DNA replikasyonu ve mitoz bölünme fonksiyonu üzerine olası etkilerinin belirlenebilmesi için, hazırlanan preparatlarda mitoz geçiren tüm

Çizelge 3. 4. (BT-3) 2-(o-hidroksifenil)-benzotiyazol maddesinin insan periferel kan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi

Test Bileşiği	Uygulama Süresi	Konsantrasyon (µg/ml)	Hücre Sayısı	Min/Max SCE	SCE / Hücre ± SH
(BT-3)	24	300	50	2 - 9	6.42 ± 0.62
		150	50	2 - 10	6.08 ± 0.56
		75	50	1 - 9	5.35 ± 0.44
	48	300	50	3 - 12	7.27 ± 0.42 *
		150	50	2 - 8	6.80 ± 0.61
		75	50	1 - 8	6.55 ± 0.36
DMSO ^a	24	20	50	1 - 6	4.97 ± 0.62
	48	20	50	2 - 9	5.56 ± 0.68
MMC	24	1	50	9 - 16	12.31 ± 0.78 ***
	48	1	50	12 - 20	17.25 ± 0.95 ***
Spontan	—	—	50	1 - 5	4.88 ± 0.67

Çizelge 3. 5. (BT-10) 2-(m-bromofenil)-benzotiyazol maddesinin insan periferel kan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi

Test Bileşiği	Uygulama Süresi	Konsantrasyon (µg/ml)	Hücre Sayısı	Min/Max SCE	SCE / Hücre ± SH
(BT-10)	24	300	50	1 - 10	6.27 ± 0.66
		150	50	2 - 9	5.98 ± 0.62
		75	50	1 - 8	5.80 ± 0.72
	48	300	50	3 - 10	7.05 ± 0.68
		150	50	2 - 9	5.57 ± 0.74
		75	50	1 - 8	5.33 ± 0.51
DMSO ^a	24	20	50	1 - 6	4.97 ± 0.62
	48	20	50	2 - 9	5.56 ± 0.68
MMC	24	1	50	9 - 16	12.31 ± 0.78 ***
	48	1	50	12 - 20	17.25 ± 0.95 ***
Spontan	—	—	50	1 - 5	4.88 ± 0.67

(BT-3), BT-3 2-(o-hidroksifenil)-benzotiyazol; (BT-10), 2-(m-bromofenil)-benzotiyazol; DMSO, Dimetilsülfoksit; MMC, Mitomisin C; SCE, Sister Kromatid Exchange (Kardeş Kromatid Değişimi); SH, Standart Hata; a, DMSO için konsantrasyon değeri (µl/ml) dir; (* p 0.05), (***) p 0.001).

Çizelge 3. 6. (BT-15) 2-(o-metoksifenil)-benzotiyazol maddesinin insan periferal kan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi

Test Bileşiği	Uygulama Süresi	Konsantrasyon (µg/ml)	Hücre Sayısı	Min/Max SCE	SCE / Hücre ± SH
(BT-15)	24	300	50	2 - 10	6.80 ± 0.61
		150	50	2 - 9	6.31 ± 0.72
		75	50	1 - 8	6.08 ± 0.44
	48	300	50	2 - 11	7.86 ± 0.36 *
		150	50	3 - 10	6.47 ± 0.89
		75	50	3 - 9	5.86 ± 0.75
DMSO ^a	24	20	50	1 - 6	4.97 ± 0.62
	48	20	50	2 - 9	5.56 ± 0.68
MMC	24	1	50	9 - 16	12.31 ± 0.78 ***
	48	1	50	12 - 20	17.25 ± 0.95 ***
Spontan	–	–	50	1 - 5	4.88 ± 0.67

Çizelge 3. 7. (BT-18) 2-(o-nitrofenil)-benzotiyazol maddesinin insan periferal kan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi

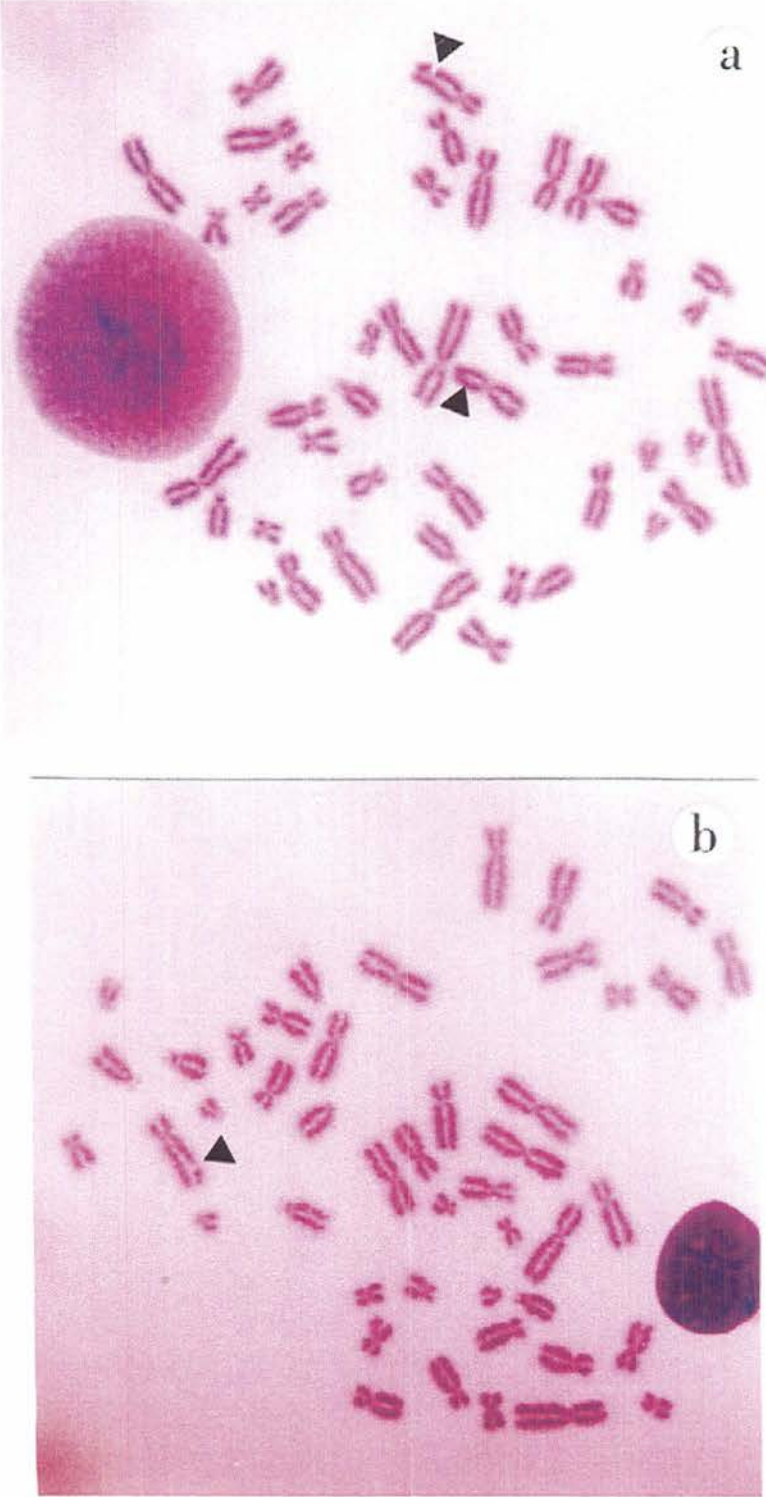
Test Bileşiği	Uygulama Süresi	Konsantrasyon (µg/ml) (µl/ml) ^a	Hücre Sayısı	Min/Max SCE	SCE / Hücre ± SH
(BT-18)	24	300	50	3 - 9	5.95 ± 0.58
		150	50	2 - 10	5.83 ± 0.57
		75	50	3 - 8	5.46 ± 0.70
	48	300	50	2 - 13	7.33 ± 0.46 *
		150	50	3 - 9	6.97 ± 0.62
		75	50	2 - 11	5.90 ± 0.74
DMSO ^a	24	20	50	1 - 6	4.97 ± 0.62
	48	20	50	2 - 9	5.56 ± 0.68
MMC	24	1	50	9 - 16	12.31 ± 0.78 ***
	48	1	50	12 - 20	17.25 ± 0.95 ***
Spontan	–	–	50	1 - 5	4.88 ± 0.67

(BT-15), 2-(o-metoksifenil)-benzotiyazol; (BT-18), BT-18 2-(o-nitrofenil)-benzotiyazol; DMSO, Dimetilsülfoksit; MMC, Mitomisin C; SCE, Sister Kromatid Exchange (Kardeş Kromatid Değişimi); SH, Standart Hata; a, DMSO için konsantrasyon değeri (µl/ml) dir; (* p 0.05), (***) p 0.001) .

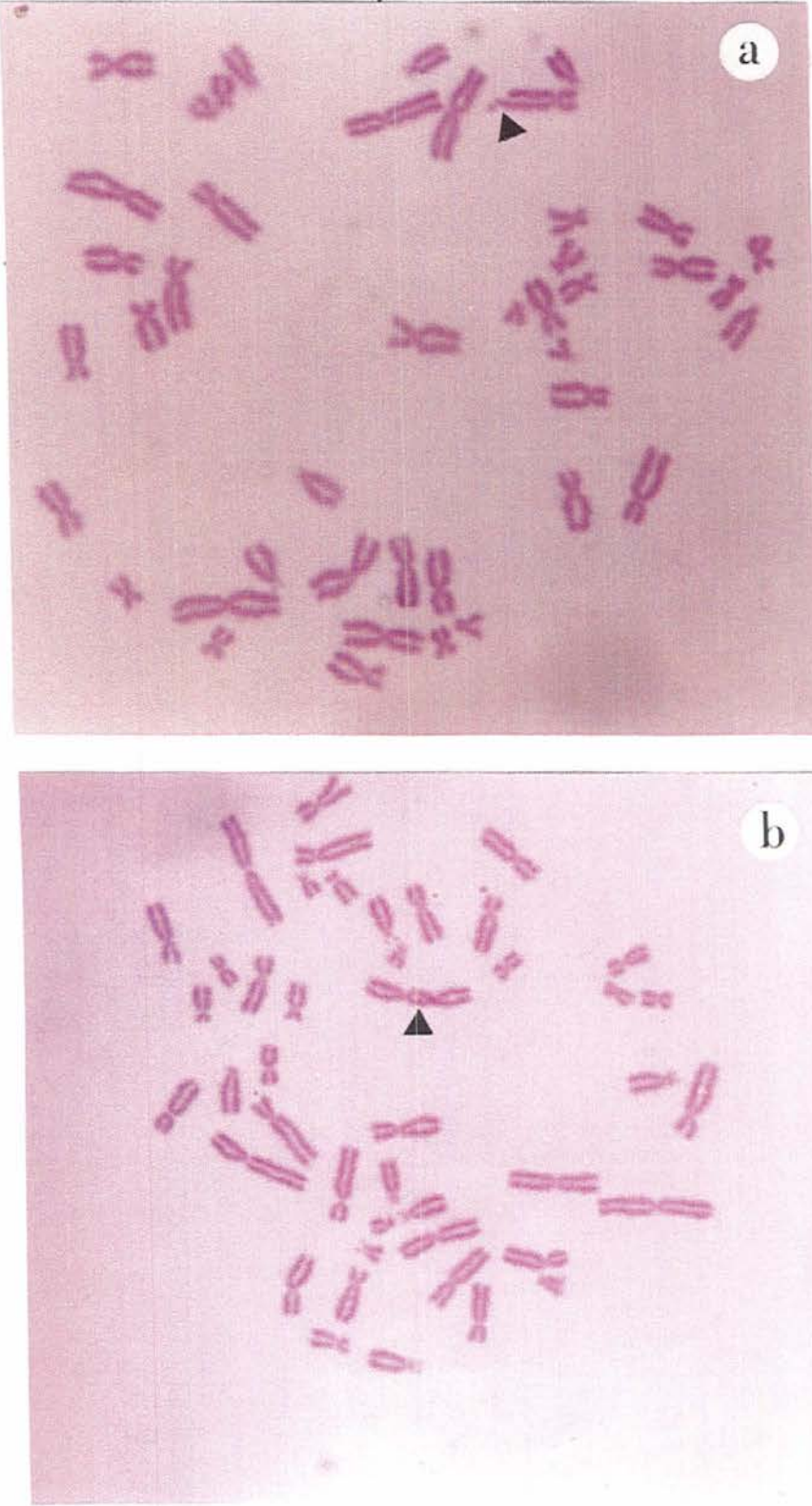
Çizelge 3. 8. (BT-26) 2-(m-nitrofenil)-benzotiyazol maddesinin insan periferel kan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi üzerine etkisi

Test Bileşiği	Uygulama Süresi	Konsantrasyon (µg/ml) (µl/ml) ^a	Hücre Sayısı	Min/Max SCE	SCE / Hücre ± SH
(BT-26)	24	300	50	4 - 9	6.78 ± 0.62
		150	50	2 - 10	6.17 ± 0.38
		75	50	3 - 8	5.65 ± 0.70
	48	300	50	2 - 11	7.02 ± 0.55
		150	50	3 - 9	6.43 ± 0.82
		75	50	2 - 9	6.26 ± 0.65
DMSO ^a	24	20	50	1 - 6	4.97 ± 0.62
	48	20	50	2 - 9	5.56 ± 0.68
MMC	24	1	50	9 - 16	12.31 ± 0.78 ***
	48	1	50	12 - 20	17.25 ± 0.95 ***
Spontan	–	–	50	1 - 5	4.88 ± 0.67

(BT-26), BT-26 2-(m-nitrofenil)-benzotiyazol; DMSO, Dimetilsülfoksit; MMC, Mitomisin C; SCE, Sister Kromatid Exchange (Kardeş Kromatid Değişimi); SH, Standart Hata; a, DMSO için konsantrasyon değeri (µl/ml) dir; (* p 0.05), (** p 0.01), (***) p 0.001) .



Şekil 3.5. İnsan lenfositlerinde benzotriazol türevleri uyarısıyla oluşan
a-) kardeş kromatid birleşmesi ve kromatid kırığı b-) kromatid kırığı



Şekil 3.6. İnsan lenfositlerinde benzotriazol türevleri uyarısıyla oluşan a-) kromatid kırığı ve b-) disentrik kromozom

hücreler üzerinde belirli sayılarda olmak üzere mikroskopik inceleme ve sayım yapılmıştır.

Replikasyon İndeksi (RI) için, test maddelerinin herbir dozu ile 48 saat inkübe edilen metafaz safhasındaki toplam 100 hücrede birinci, ikinci ve üçüncü metafaz hücreleri ayrı ayrı sayılmıştır. Daha sonra materyal ve metotda verildiği gibi formüle edilen sonuçlar spontan ve çözücü kontrol değerleri ile Student's *t*-testi uygulanarak Çizelge 3.9'da verilmiştir. Bu bulgulara göre, test maddelerinin tümünde ve özellikle 300 µg/ml ile 150 µg/ml'lik dozlarda replikasyon indeksi değerlerinin doza bağlı olarak, önemli ölçüde azaldığı ve pozitif kontrol verilerine çok yakın olduğu görülmektedir.

Test maddelerinin mitotik indeks üzerine olabilecek etkilerinin saptanması için ise yine test maddeleri ile 48 saat inkübe edilmiş hücrelerden, her bir doz ve verici için 1000 hücre ve bunlar içinde mitoz geçirenler aynı anda sayılarak, kontrol değerleri ile student *t* testi 'nde karşılaştırılmış ve istatistik olarak değerlendirilmiştir. Çizelge 3.9'da verilen sonuçlara göre, test maddelerinin tümü doza bağlı olarak mitotik indeksi anlamlı ölçüde düşürerek pozitif kontrol maddesi olan mitomisin C (MMC)'ye benzer bir şekilde etkili olmuştur.

3.8. 2-Sübstitüe fenil benzotiyazol türevlerinin insan lenfositlerinde kromozom bozulmaları üzerine etkileri

Yukarıda sözü edilen test maddeleri ve dozları ile 24 ve 48 saat uygulama gören lenfosit kültüründen hazırlanan kromozom preparatları, her doz için 100 metafaz hücresi sayılarak, kromatid kırığı (K') (Şekil 3.5. ve 3.6.), kromatid uçlarının birleşmesi (SU) (Şekil 3.5.a) ve disentrik kromozom (DS) (Şekil 3.6.b) aberasyonları bakımından incelenmiştir.

Her doz için 100 hücrede sayılan kromozom aberasyonlarının yüzdesi alınarak, hücre başına düşen kromozom aberasyonu değeri hesaplanmıştır. Bu değerler, uygulanan doz ve süreye ait kromozom aberasyon tipleri ile birlikte her test maddesi için ayrı ayrı Çizelge 3.10.-3.14'de verilmektedir.

Bu değerlere göre, BT-3'ün 24 saat uygulama süresinde 300 µg/ml'lik dozunun (Çizelge 3.10), BT-10'nun aynı uygulama süresinde 300 µg/ml 150

$\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlarının (Çizelge 3.11), BT-15'in 24 saatte 150 $\mu\text{g/ml}$, 48 saatte de 300 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlarının (Çizelge 3.12), BT-18'in 24 saatte 150 $\mu\text{g/ml}$ ve 300 $\mu\text{g/ml}$, 48 saatte 300 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlarının (Çizelge 3.13) ve son olarak BT-26'nın 24 saatte 150 $\mu\text{g/ml}$ ve 300 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlarının (Çizelge 3.14) çözücü kontrolüne göre yaklaşık 2 kat daha fazla kromozom aberasyonlarına neden olduğu bulunmuştur.

Ayrıca pozitif kontrol olarak kullanılan mitomisin C (MMC) beklenildiği gibi oldukça yüksek seviyede kromozom aberasyonuna neden olmuştur.

Çizelge 3. 9. Benzotiyazol BT(3), BT(10), BT(15), BT(18) ve BT(26)'nın maddelerinin DNA replikasyonu ve mitoz bölünme üzerine etkisi.

Test Bileşiği	Uygulama Süresi	Konsantrasyon (µg/ml)	M1	M2	M3	RI ± SH	MI ± SH
BT-3	48	300	64	32	4	1.40±1.0*	1.3±0.2*
		150	56	37	7	1.51±7.0*	1.4±0.3*
		75	49	43	8	1.59±5.0	1.9±0.4
BT-10	48	300	58	37	5	1.47±3.0*	1.5±0.3*
		150	54	38	7	1.54±4.0*	1.8±0.4
		75	41	53	6	1.65±7.0	2.3±0.4
BT-15	48	300	72	21	7	1.35±1.0*	0.9±1.0**
		150	62	33	5	1.43±3.0*	1.2±0.4**
		75	60	34	6	1.46±8.0*	1.7±0.2*
BT-18	48	300	74	22	4	1.30±4.0*	1.4±0.3*
		150	67	27	6	1.39±5.0*	1.7±0.2*
		75	55	38	7	1.52±6.0*	2.6±0.3
BT-26	48	300	69	26	5	1.36±5.5*	0.8±0.3**
		150	63	29	8	1.45±7.0*	1.2±0.4**
		75	52	38	10	1.58±6.0*	1.6±0.2*
Spontan	-	-	18	31	51	2.33±4.0	3.5±0.4
DMSO ^a	48	20	23	29	48	2.25±3.0	3.1±0.2
MMC	48	0,1	79	18	3	1.24±5.4*	1.2±0.3**

DMSO, Dimetilsülfoksit; MMC, Mitomisin C; M1, Metafaz 1; M2, Metafaz 2; M3, Metafaz 3; RI, Replikasyon İndeksi; MI, Mitotik indeks; SH, Standart Hata; a, DMSO için konsantrasyon değeri (µl/ml) dir. Sayımlar her doz için toplam 100 hücrede yapılmıştır.

(*) p< 0.05, (**) p< 0.01

Çizelge 3. 10. (BT-3) 2-(o-hidroksifenil)-benzotiyazol maddesinin kromozom aberasyonları (CA) üzerine etkisi

Test Bileşiği	Uygulama Süresi	Konsantrasyon (µg/ml)	Hücre Sayısı	Aberasyonlar				%CA/hücre
				K'	K''	SU	DS	
(BT-3)	24	300	100	1	-	-	1	0.02
		150	100	1	-	-	-	0.01
		75	100	-	-	-	-	0.00
	48	300	100	2	-	-	1	0.03
		150	100	2	-	-	-	0.02
		75	100	1	-	-	-	0.01
DMSO ^a	24	20	100	1	-	-	-	0.01
	48	20	100	2	-	-	-	0.02
MMC	24	0,1	100	13	-	2	6	0.21
	48	0,1	100	25	-	6	8	0.39
Spontan	-	-	100	1	-	-	-	0.01

Çizelge 3. 11. (BT-10) 2-(m-bromofenil)-benzotiyazol maddesinin kromozom aberasyonları (CA) üzerine etkisi

Test Bileşiği	Uygulama Süresi	Konsantrasyon (µg/ml)	Hücre Sayısı	Aberasyonlar				%CA/hücre
				K'	K''	SU	DS	
(BT-10)	24	300	100	1	-	-	1	0.02
		150	100	2	-	-	-	0.02
		75	100	-	-	-	-	0.00
	48	300	100	2	-	-	1	0.03
		150	100	2	-	-	-	0.02
		75	100	1	-	-	-	0.01
DMSO ^a	24	20	100	1	-	-	-	0.01
	48	20	100	2	-	-	-	0.02
MMC	24	0,1	100	13	-	2	6	0.21
	48	0,1	100	25	-	6	8	0.39
Spontan	-	-	100	1	-	-	-	0.01

BT-3, 2-(o-hidroksifenil)-benzotiazole; BT-10, 2-(m-bromofenil)-benzotiazole; DMSO, Dimetilsülfoksit; MMC, Mitomisin C; K', Kromatid kırığı; K'', Kromozom kırığı; SU, Sister union (Kromatid uçlarının birleşmesi); DS, Disentrik kromozom; CA, Kromozom aberasyonu; a, DMSO için konsantrasyon değeri (µl/ml)'dir.

Çizelge 3. 12. (BT-15) 2-(o-metoksifenil)-benzotiyazol maddesinin kromozom aberasyonları (CA) üzerine etkisi

Test Bileşiği	Uygulama Süresi	Konsantrasyon (µg/ml)	Hücre Sayısı	Aberasyonlar				%CA/hücre
				K'	K''	SU	DS	
(BT-15)	24	300	100	1	-	-	-	0.01
		150	100	2	-	-	-	0.02
		75	100	-	-	-	-	0.00
	48	300	100	2	-	1	1	0.04
		150	100	1	-	-	1	0.02
		75	100	2	-	-	-	0.02
DMSO ^a	24	20	100	1	-	-	-	0.01
	48	20	100	2	-	-	-	0.02
MMC	24	0,1	100	13	-	2	6	0.21
	48	0,1	100	25	-	6	8	0.39
Spontan	-	-	100	1	-	-	-	0.01

Çizelge 3. 13. (BT-18) 2-(o-nitrofenil)-benzotiyazol maddesinin kromozom aberasyonları (CA) üzerine etkisi

Test Bileşiği	Uygulama Süresi	Konsantrasyon (µg/ml)	Hücre Sayısı	Aberasyonlar				%CA/hücre
				K'	K''	SU	DS	
(BT-18)	24	300	100	1	-	1	1	0.03
		150	100	2	-	-	-	0.02
		75	100	-	-	-	-	0.00
	48	300	100	3	-	-	1	0.04
		150	100	1	-	-	1	0.02
		75	100	1	-	-	1	0.02
DMSO ^a	24	20	100	1	-	-	-	0.01
	48	20	100	2	-	-	-	0.02
MMC	24	0,1	100	13	-	2	6	0.21
	48	0,1	100	25	-	6	8	0.39
Spontan	-	-	100	1	-	-	-	0.01

BT-15, 2-(o-metoksifenil)-benzotiazole; **BT-18**, 2-(o-nitrofenil)-benzotiazole
DMSO, Dimetilsülfoksit; **MMC**, Mitomisin C; **K'**, Kromatid kırığı; **K''**, Kromozom kırığı; **SU**, Sister union (Kromatid uçlarının birleşmesi); **DS**, Disentrik kromozom; **CA**, Kromozom aberasyonu; **a**, DMSO için konsantrasyon değeri (µl/ml)'dir.

Çizelge 3. 14. (BT-26) 2-(m-nitrofenil)-benzotiazol maddesinin kromozom aberasyonları (CA) üzerine etkisi

Test Bileşiği	Uygulama Süresi	Konsantrasyon (µg/ml)	Hücre Sayısı	Aberasyonlar				%CA/hücre
				K'	K''	SU	DS	
(BT-26)	24	300	100	1	-	-	1	0.02
		150	100	2	-	-	-	0.02
		75	100	-	-	-	-	0.00
	48	300	100	2	-	1	-	0.03
		150	100	2	-	-	-	0.02
		75	100	1	-	-	1	0.02
DMSO ^a	24	20	100	1	-	-	-	0.01
	48	20	100	2	-	-	-	0.02
MMC	24	0,1	100	13	-	2	6	0.21
	48	0,1	100	25	-	6	8	0.39
Spontan	-	-	100	1	-	-	-	0.01

BT-26, BT-26 2-(m-nitrofenil)-benzotiazol; **DMSO**, Dimetilsülfoksit; **MMC**, Mitomisin C; **K'**, Kromatid kırığı; **K''**, Kromozom kırığı; **SU**, Sister union (Kromatid uçlarının birleşmesi); **DS**, Disentrik kromozom; **CA**, Kromozom aberasyonu; **a**, DMSO için konsantrasyon değeri (µl/ml) dir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Benzotiyazol türevi olan beş ilaç öncül maddesinin olası genotoksik etkilerini araştırmak için, öncelikle kullanılan organizmaların deneyler için uygun yada sağlıklı olup olmadıkları test edilmiştir. Ames testi için kullanılan *S. typhimurium*'ların genetik marker'ları genellikle pozitif sonuçlar vermiştir. Bununla beraber mutant olan bu bakteriler, genetik özelliklerini çok çabuk değiştirebildikleri için her deneyden önce mutlaka test edilmişlerdir. Erkek ve bayan olarak iki ayrı bireyden alınan lenfositlerden yapılan karyotip analizlerinden sonra sağlıklı olduklarına karar verilip donör olarak kullanılmıştır. Test maddelerinin beş ayrı dozunun her iki organizma üzerindeki sitotoksik etkisi araştırıldığında da farklı sitotoksik dozlar elde edilmiştir. *S. typhimurium* için IC 50 dozu 50000 µg/ml olurken lenfosit hücreleri için çok daha düşük olan 300 µg/ml doz bulunmuştur. Farklı benzotiyazol türevleriyle yapılan çeşitli çalışmalarda ise türevlerin yapılarının farklılığından kaynaklandığını düşündüğümüz çok çeşitli maksimum dozlarının kullanıldığı görülmektedir. Örneğin 6-amino benzotiyazol ve 2 metaboliti için 1000-12500 µg/ml olan dozları Ames testi için kullanılırken (Sato ve arkadaşları 2000), organik benzotiyazol türevlerinin 400-600 µg/ml'lik konsantrasyonları antifungal aktivite için test edilmiştir (Küçükbay ve Durmaz 1997).

Kültüre edilen insan lenfosit kromozomları timin analogu olan BrdU ile muamele edilerek iki farklı boyama yöntemi ile boyandığında ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin kromozomlarında bu baz analogunu alan kromatid diğerinden farklı boyanmış ve kromozomların 2 kardeş kromatidi arasında oluşan parça değişimleri, ton farkı sayesinde gözlenebilmiştir. Bu yöntemlerden ilki olan giemsa ile boyanma sonucunda kromatidler arasındaki renk farkı oldukça belirgin şekilde gözlenebilmiştir. Diğer teknikte ise A-T baz çiftlerine bağlanma özelliği olan floresan Hoechst 32258, DNA ipliğine timin yerine bağlanan BrdU içeren ipliğe daha az bağlanabildiği için kromatidler arasında parlaklık farkı doğmuştur (Benn ve Perle 1992). Yöntemin çok daha kısa ve hassas olmasının yanısıra floresan ışımının süresi çok kısa sürmekte ve bu süre ikinci mitoz kromozomlarındaki farklılığın sağlıklı incelenmesini zorlaştırmaktadır. Ayrıca

daimi preparat hazırlayarak daha sonra inceleme olanağının bulunmaması nedeniyle kardeş kromatid sayımları giemsa ile boyanmış ve daimi hale getirilmiş preparatlarda yapılmıştır.

Yapılan literatür araştırmasında benzotiyazol yapısının bulunduğu kimyasal bileşiklerin mutajenik yada genotoksik etkisini araştıran yalnızca bir çalışma bulunmuştur. Sato ve arkadaşları (2000) tarafından yapılan bu çalışmada, bir amino grubu taşıyan b-aminobenzotiyazolün, mutajenik ve karsinojenik özellikleriyle bilinen aromatik amin grubu bir bileşik olması nedeniyle mutajenik etkili olabileceği düşüncesinden hareket edilmiştir. Aromatik aminlerin neden olduğu DNA hasarı, sitokrom p 450 (CYP) 1A1, asetil transferaz yada sülfotransferaz enzimleri ile katalize edilen metabolik aktivasyon reaksiyonları sonucu oluşan metabolitler ile gerçekleşmektedir. Bu doğrultuda BT-6 ve onun 3 metabolik ürününün mutajenik aktivitesi, Ames testi ile *Salmonella typhimurium* TA 100 ve onun modife edilmiş şekli olan YG 1029 şuslarında araştırılmıştır.

Alınan verilere göre b-aminobenzotiyazolün TA100 şusunun taşıdığı nokta mutasyon açısından herhangi bir mutajenik etkisi olmadığı, ancak R yan grupları değişen türevlerinin metabolik aktivasyon enzimleri varlığında mutajenik aktivite gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Nitro-substitute difenil tioeterlerin orto, para ve meta nitroso türevlerinden sadece para-NO₂'ye sahip türevi *Salmonella* mikrozom testinde TA98 ve TA100'de mutajenik etki gösterirken, orto ve meta nitroso türevlerinin mutajenik aktiviteye sahip olmadığı bildirilmiştir (Juneja ve ark. 2001).

Ticari olarak çok önem taşıyan nitroaromatik bileşiklerin nitro grupları, diğer fonksiyonel kimyasal gruplara kolaylıkla aktarılabilirler. Nitroaromatik bileşiklerden nitro benzenin indirgenmesiyle elde edilen ve çeşitli ilaçların boyaların ve fotokimyasalların başlangıç maddesi olan nitroanilin nitro grubu meta ve para konumlu türevleri *Salmonella* TA98 ve TA100'de mutajenik etkili iken bileşiğin ana yapısı ve orto nitro konumlu türevleri mutajenik aktivite açısından negatif sonuç vermiştir (Abmann ve ark. 1997). Meydana gelen farklı etkinin ana kimyasal bileşiğe bağlı grupların konumları ile ilgili olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada ise kullanılan beş benzotiyazol türevinden yalnızca nitro grubu taşıyan BT-18 ve BT-26 türevleri metabolik aktivasyonun olup olmasına bakmaksızın yalnızca *S typhimurium* TA98 üzerinde oldukça önemli derecede mutajenik etkili bulunmuştur. Fakat bu maddeler baz çifti mutasyonuna sahip TA100 üzerinde herhangi bir mutajenik etki meydana getirmemişlerdir. Burada orto konumda nitro taşıyan BT-18'in 1000 µg/pl'lik dozdan itibaren mutajenik etki gösterirken m-konumda nitro taşıyan BT-26'nın daha yüksek doz olan 2500 µg/pl'lik itibaren mutajenik etki göstermesi nitro yan grubunun konumunun mutajenik aktivite için etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu iki bileşiğin taşıdığı fenil halkasına bağlı nitro grubunun, kuvvetli elektron çekici özelliğinden dolayı DNA molekülünü etkilemesinin, daha zayıf elektron çekici özelliğe sahip diğer fonksiyonel gruplar olan OH, OCH₃ ve Br bağlı türevlerinden daha fazla olması beklenebilir. Ames testinde yüksek mutajenik aktivite gösteren BT-18 türevi, aynı zamanda lenfositler için kullanılan en yüksek dozda da SCE oluşumunu uyarmıştır. BT-18'in yanısıra fenil halkasına hidroksil (OH) bağlanmış olan BT-3 ile metoksi (OCH₃) bağlanmış olan BT-15 türevide aynı dozda SCE oluşumunu önemli derece uyarmıştır. BT-3 ve BT-15'in fenil halkasına orto konumda bağlı hidroksi ve metoksi türevlerinin DNA'daki baz çiftlerine direkt olarak etki göstermekten çok DNA replikasyonu sırasında replikasyon noktalarında iplik üzerinde kopma şeklinde hasar ile mutajenik etki gösterebileceği düşünülmektedir. Çünkü kardeş kromatid değişiminin replike olan DNA'nın sentez sırasında oluşturduğu replikasyon çatalında kopma ve hatalı olarak tekrar birleşme ile oluştuğu ileri sürülmektedir (Albanesi ve ark. 1998).

Çalışmamızda benzotiyazolün beş türevine maruz kalan kromozomlarda sadece kromatid tipi bozulmalar gözlenmiştir. Fakat kromozom anomali ve kırıkları bulunan mitoz hücrelerine rastlanmamıştır. Çok düşük sayıda ise, disentrik kromozom ve kardeş kromatid birleşmesi gösteren metafaz hücrelerine rastlanmıştır. Burada SCE ve Ames testinde herhangi bir mutajenik aktivite göstermeyen BT-10 türevinin kromozom bozulmalarına neden olması, genotoksik etkilerin araştırılmasında çeşitli parametrelerin ya da test sistemlerinin kullanılmasının ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Kromozom bozulmaları için elde edilen bulgular her doz için 100 hücrede gerçekleştirilmiştir.

Söz konusu test maddelerinin olası klastojenik etkilerinin kesin olarak söylenebilmesi için daha çok sayıda hücrenin değerlendirilmesinin uygun olacağı düşünülmektedir.

Genotoksik etkilerle ilgili olarak elde edilen veriler ışığında, test maddelerinden BT-10'un, kullanılan test yöntemlerinden sadece kromozom bozulma testinde (CA), BT-3 ve BT-15'in kardeş kromatid değişimi (SCE) ve kromozom bozulma (CA) testinde, BT-26'nın Ames ve CA testinde mutajenik etki gösterdiği, BT-18'in ise kullanılan her üç yöntemde de genotoksik aktivite sergilediği sonucuna varılmıştır. Test yöntemlerinden en az ikisinde mutajenite açısından pozitif sonuç veren BT-3, BT-15, BT-26 ve BT-18'in genetik materyale metabolik aktiviteye bağlı olmaksızın etkili olduğu söylenebilir. Benzotiyazolün 5 türevinin replikasyon indeksi (RI) ve mitotik indeks (MI)'i kontrolle karşılaştırıldığında hemen hemen tüm dozlarda düşük çıkmıştır. BT-15, BT-18 ve BT-26 RI ve MI'yı en fazla etkileyen bileşikler olup meydana getirdikleri mutajenik etkilerle bu konuda paralellik göstermektedirler. Antitümör etkili kemoterapik bir ilaç ve bifonksiyonel alkilleyici bir ajan olan (Giri ve Chatterjee 1998) ve bu çalışmada pozitif mutajen olarak kullanılan mitomisin C'nin hem SCE ve CA oluşumunu uyararak hem de MI ve RI'yı düşürerek test maddelerinin etkilerine benzer aktivite gösterdiği bulunmuştur. Yapılan çeşitli çalışmalarda 2-(4-aminofenil) benzotiyazol ve türevleri ile 2-(4-amino-3-metilfenil) benzotiyazol ve türevlerinin farklı insan kanserlerinde tümör baskılayıcı etkileri bulunmuştur (Shi ve ark. 1996, Bradshaw ve ark. 1998, Bradshaw ve ark. 2001, Hutchinson ve ark. 2001).

Bu çalışma, mutajenik etkileri araştırılan 2-(süstitüe-fenil) benzotiyazol türevlerinin, replikasyonu ve mitozu düşürücü etkilerinden dolayı yukarıda verilen örneklerdeki gibi bir anti-tümorjenik ajan olarak kullanabileğini düşündürmektedir. Maddelerin sahip oldukları genotoksik etkili dozlarının dışındaki konsantrasyonların araştırılması ve bu etkilerin özgül olup olmadığının belirlenmesi önem kazanmıştır ve sonraki çalışmalar için önerilmektedir.

5. KAYNAKLAR

ABMANN, N., EMMRICH, M., KAMPF, G. ve KAISER, M., *Genotoxic activity of important nitrobenzenes and nitroanilines in the Ames test and their structure-activity relationship*, *Mutat. Res.*, **395**, 139-144 (1997).

ABOU-EISHA, A., CREUS, A. ve MARCOS, R., *Genetic evaluation of the antimicrobial drug, trimethoprim in cultured human lymphocytes*, *Mutation Research, Gen. Tox. Environ. Mut.*, **440**, 157-162 (1999).

AHMAD, E., SHADAB, G.G.H.A., HODA, A. ve AFZAL, M., *Genotoxic effects of estradiol-17 β on human lymphocyte chromosomes*, *Mutat. Res.*, **466**, 109-115 (2000).

AIDOO, A., LYN-COOK, L.E., MITTELSTAEDT, R.A., HEFLICH, R.H. ve CASSIANO, D.A., *Induction of 6-thioguanine-resistant lymphocytes in Fischer 344 rats following in vivo exposure to N-ethyl-N-nitrosourea and cyclophosphamide*, *Environ. Mol. Mutagen.* **17**, 141-151 (1991).

ALBANESI, T., POLANI, S., COZZI, R. ve PERTICONE, P., *DNA strand methylation and sister chromatid exchanges in mammalian cells in vitro*, *Mutat. Res.*, **429**, 239-248 (1998).

ALBERTINI, R. J., ALLEN, E.F., QUINN, A.S. ve ALBERTINI, M.R., *Human somatic cell mutation; in vivo variant lymphocyte frequencies as determined by 6-thioguanine resistance, Population and Biological Aspects of Human Mutation*, (Ed: Hook, E.B., Porter, I. H.) Academic Press, New York, (Ed: Porter, I. H.) Academic Press, New York, 235-263 (1981).

ALBERTINI, R.J., ANDERSON, D., DOUGLAS, G.R., HAGMAR, L., HEMMINKI, K., MERLO, F., NATARAJAN, A.T., NORPPA, H., SHUKER, D.E.G., TICE, R., WATERS, M.D. ve AITIO, A., *IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans*, *Mutat. Res.*, **463**, 111-172 (2000).

ALEJANDRO, D.B. ve BIANCHI, M.S., *Genotoxicity of streptonigrin: areview*, *Mutat. Res.*, **488**, 25-37 (2001).

AMES, B.N., *Food constituents as a Source of Mutagens, Carcinogens and Anticarcinogens, Genetic Toxicology of the Diet, Proceeding of a satellite symposium of the Fourth International Conference on Environmental Mutagens Held in Copenhagen*, (Ed:Knudsen, I.B.) Denmark, 3-32 (1985).

AMES, B.N., *Identifying Environmental Chemicals Causing Mutation and cancer*, *Science*, **204**, 587-599 (1979).

AMES, B.N. ve Mc. CANN, J., *Validation of salmonella test: Areply to Riskus and Legator*, *Cancer Res.* **41**, 4192 (1981).

ANDERS, M.W. ve DEKANT, W., *Conjugation-dependent carcinogenicity and toxicity of foreign compounds*, Adv. Pharmacol. **27**, 511-519 (1994).

ANDREW, S.E., BAROSS-FRANCIS, A., NARAYANAN, L., MILHAUSEN, K., LISKAY, R.M., JIRIK, F.R. ve GLAZER, P.M., *Mutagenesis in PMS2-and MSH2-deficient mice indicates differential protection from transversions and frameshifts*, Carcinogenesis, **21**, 1291-1295 (2000).

ATALAY, F., BALTACI, V., ALPAS, I., SAVAŞ, I., ATIKCAN, S. ve BALCI, S., *Sister chromatid exchange rate from pleural fluid cells in patients with malignant mesothelioma*, Mutat. Res., **465**, 159-163 (2000).

AVERBECK, D., *Recent advances in psoralen phototoxicity mechanism*, Photochem. Photobiol. , **50**, 859-882 (1989).

AWARA, W. M., EL-GOHARY, M., EL-NABI, S. H. ve FADEL, W. A., *In vivo and invitro evaluation of the mutagenic potential of carbamazepine: Does melatonin have anti-mutagenic activity?*, Toxicology, **125**, 45-52 (1998).

BACCHI, A., BONARDI, A., CARCELLI, M., MAZZA, P., PELAGATTI, P., PELLIZI, G., SOLINAS, C. ve ZANI, F., *Organotin Complex with Pyrole-2,5-dicarboxaldehyde bis (acylhydrazones)*. J-Inorg-Biochem. Feb. **1**; **69** (1-2):101-12 (1998).

BALASEM, A.N., ALI, S.K., MOSA, H.S. ve HUSSAIN, K.O., *Chromosomal aberration analysis in peripheral lymphocytes of radiation workers*, Mutat. Res., **271**, 209-211 (1992).

BARBIN, A., FROMENT, O., BOIVIN, S., MARION, M.J., BELBOGGI, F., MALTONI, C. ve MONTESANO, R., *p53 gene mutation pattern in rat liver tumors induced by vinyl chloride*, Cancer Res. **57** 1695-1698 (1997).

BARQUINERO, J.F., BARRIOS, L., CABALLIN, M.R., MIRO, R. ve RIBAS, A., *Cytogenetic analysis of lymphocytes from hospital workers occupationally exposed to low levels of ionizing radiation*, Mutat. Res., **286**, 275-279 (1993).

BARTSCH, H., MALAVEILLE, C., BARBIN, A., BRESIL, H., TOMATIS, L. ve MONTESANO, R., *Mutagenicity and metabolism of vinyl chloride and related compounds*. Environ. Health. Persp., **17**, 193-198 (1976).

BECKER, R., NIKOLOVA, T., WOLF, I., LOVELL, D., HUTTNER, E. ve FOTH, H., *Frequency of HPRT mutants in humans exposed to vinyl chloride via an environmental accident*, Mutat. Res., **494**, 87-96 (2001)

- BENN, P. A. ve PERLE, M. A., *Chromosome staining and banding techniques, human cytogenetics, A Practical Approach, Volume I, Constitutional analysis*, (Ed:Rooney, D.E., Czepulkowski, B.H.) Oxford University Press, New York, USA (1992).
- BERNARDINI, S., PELIN, K., PELTONEN, K., JARVENTAUS, H., HIRVONEN, A., NEAGU, C., SORSA, M. ve NORPPA, H., *Induction of sister chromatid exchange by 3,4-epoxybutane-1,2-diol in cultured human lymphocytes of different GSTT1 and GSTM1 genotypes*, *Mutat. Res.*, **361**, 121-127 (1996).
- BIGATTI, M.P., CORONA, D. ve MUNIZZA, C., *Increased sister chromatid exchange and chromosomal aberration frequencies in psychiatric patients receiving psychopharmacological therapy*, *Mutat. Res.*, **413**, 169-175 (1998).
- BOLSOVER, R.S., HYAMS, J.S., STEVE, J., SHEPHARD, E.A. ve WHITE, H.A., *From genes to cells*, Willey-Liss, Inc., New York, USA (1997).
- BOLZAN, A.D. ve BIANCHI, M.S., *Genotoxicity of streptonigrin: a review*, *Mutat. Res.*, **488**, 25-37 (2000).
- BOLZAN, A.D., GONZALEZ, M.C. ve BIANCHI, M.S., *The effect of 1,10-phenanthroline on the chromosome damage and sister-chromatid exchanges induced by streptozotocin in mammalian and insect cells*, *Mutat. Res.*, **447**, 221-226 (2000).
- BOROWY-BOROWSKI, H., LIPMAN, R. ve TOMASZ, M., *Recognition between mitomycin C and specific DNA sequences for cross-link formation*, *Biochemistry*, **29**, 2999-3004 (1990).
- BOSTROM, E., ENGEN, S. ve EIDE, I., *Mutagenicity Testing of Organic Extracts of Diesel Exhaust Particles After Spiking with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PHA)*, *Arch-Toxicol.*, **72(10)**, 645-9 (1998).
- BRADSHAW, T.D., SHI, D.F., SCHULTZ, R.J., PAULL, K.D., KELLAND, L., WILSON, A., GARNER, C., FIEBIG, H.H., WRIGLEY, S. ve STEVENS, M.F., *Influence of 2-(4-aminophenyl)benzothiazoles on growth of human ovarian carcinoma cells in vitro and in vivo*, **78(4)**, 421-429 (1998).
- BRADSHAW, T.D., STEVENS, M.F. ve WESTWELL, A.D., *The discovery of the potent and selective antitumor agent 2-(4-amino-3-methylphenyl)benzothiazole (DF 203) and related compounds*, *Curr. Med. Chem.*, **6(2)**, 203-210 (2001).
- BROOKES, P., *The early history of the biological alkylating agents*, *Mutat. Res.* **233**, 3-14 (1990).

CALLEJA, F., JANSEN, J.G., VRIELING, H., LAVAL, F. ve VANZEELAND, A. A., *Modulation of the toxic and mutagenic effects induced by methyl methanesulfonate in Chinese hamster ovary cells by overexpression of the rat N-alkylpurine-DNA glycosylase*, *Mutat. Res.* **425**, 185-194 (1999).

CHARLES, J.M., CUNNY, H.C., WILSON, R.D., BUS, J.S., LAWLOR, T.E., CIFONE, M. A., FELLOWS, M. ve GOLLAPUDI, B., *Ames assays and unscheduled DNA synthesis assays on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives*, *Mutat. Res.*, **444**, 207-216 (1999).

CHAVBEY, R.C., BHILWADE, H.N., RAJAGOPALAN, R. ve BANNUR, S.V., *Gamma ray induced DNA damage in human and mouse leucocytes measured by SCGE-Pro: a software developed for automated image analysis and data processing for comet assay*, *Mutat. Res.*, **490**, 187-197 (2001).

CHLOPKIEWICZ, B., *Studies on the mutagenic activity of hydralazine and dihydralazine in Salmonella typhimurium strains differing in expression of antioxidant genes*, *Toxicology Letters*, **110**, 203-207 (1999).

CHUA, M.S., KASHIYAMA, E., BRADSHAW, T.D., STINSON, S.F., BRANTLEY, E., SAUSVILLE, E.A. ve STEVENS, M.F., *Role of Cyp 1A1 in modulation of antitumor properties of the novel agent 2-(4-amino-3-methylphenyl) benzothiazole in human breast cancer cells*, **18**, 5196-5203 (2000).

COLE, J. ve SKOPEK, T. R., *International commission for protection against environmental mutagens and carcinogens, working paper 3, somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population in vivo*, *Mut. Res.* **304**, 33-106 (1994).

COOPER, M. T. ve PORTER, T.D., *Mutagenicity of nitrosamines in methyltransferase-deficient strains of Salmonella typhimurium coexpressing human cytochrome P450 2E1 and reductase*, **454**, 45-52 (2000).

CORTES-GUTIERREZ, E.I., CERDA-FLORES, R.M. ve LEAL-GARZA, C.H., *Sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes from women with carcinoma of the uterine cervix*. *Cancer genetics and cytogenetics*, **122**, 121-123 (2000).

ÇETİNKAYA, E., ALICI, B., GOK, Y., DURMAZ, R. ve GUNAL S., *New derivatives of benzimidazole and their antimicrobial activity*, *J Chemother* **11**(2), 83-9 (1999).

DESESSO, J.M., LAVIN, A.L., HSIA, S.M. ve MAVIS, R.D., *Assesment of the carcinogenicity associated with oral exposures to hydrogen peroxide*, *Food and Chemical Toxicology*, **38**, 1021-1041 (2000).

DHILLON, V. S. ve DHILLON I. K., *Chromosome aberrations and sister chromatid exchange studies in patients with prostate cancer: Possible evidence of chromosome instability*, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **100**, 143-147 (1998).

DOMINGUEZ, I., MATEOS, S. ve CORTES, F., *Yield of SCEs and translocations produced by 3 aminobenzamide in cultured Chinese hamster cells*, *Mutat. Res.*, **448**, 29-34 (2000).

DRONKERT, M. L. ve KANAAR, R., *Repair of DNA interstrand cross-links*, *Mutat. Res.*, **486** (4), 217-247 (2001).

DUNKERN, T.R., FRITZ, G. ve KAINA, B., *Cisplatin-induced apoptosis in 43-3B and 27-1 cells defective in nucleotide excision repair*, *Mutat. Res.*, **486**(4), 249-258 (2001).

DURMAZ, R., KORUGLU, M., KUCUKBAY, H., TEMEL, I., OZER, M.K., REFİK, M. ve CETİNKAYA, E., *Investigation of serum minimal inhibitory concentrations of some benzimidazole, imidazole and benzothiazole derivatives and their effects on liver and renal functions*, *Arzneimittelforschung*, **48**(12), 1179-84 (1998).

EASTMAN, A., *The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes*, *Pharmacol. Ther.*, **34**, 155-166 (1987).

ECKERT, K.A. ve OPRESKA, P.L., *DNA polymerase mutagenic bypass and proofreading of endogenous DNA lesions*, *Mutat. Res.*, **424**, 221-236 (1999).

EDENHARDER, R., KERKHOFF, G. ve DUNKELBERG, H., *Effects of β -carotene, retinal, riboflavin, α -tocopherol and vitamins c and k₁ on sister-chromatid exchanges induced by 3-amino-1-methyl-5H-pyrido [4,3-b] indole (Trp-p-2) and cyclophosphamide in human lymphocyte cultures*, *Food and Chemical Toxicology*, **36**, 897-906 (1998).

EISEN, J.A. ve HANAWALT, P.C., *A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins and processes*, *Mutat. Res.*, **435**, 171-213 (1999).

EL-SHERBENY, M.A., *Synthesis of certain pyrimido (2,1-b) benzothiazole and benzothiazolo (2,3-b) quinazoline derivatives for in vitro antitumor and antiviral activities*, *Arzneimittelforschung*, **50**(9), 848-853, (2000).

ELLIOTT, W. H. ve ELLIOTT, D.C., *Chemistry and Molecular Biology*, Oxford University Press, USA, New York (2001).

EMERIT, I., KHAN, S.H. ve CERUTTI, P., *Treatment of lymphocyte cultures with hypoxanthine-xanthine oxidase system induces the formation of transferable clastogenic material*, *Free Radical Biol. Med.*, **1**, 51-57 (1985).

EMERIT, I., *Reactive oxygen species, chromosome mutation and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis*, Free Radical Biol. Med., **16**, 99-109 (1994).

FATIMA, S.K., PRABHAVATHI, P.A., PADMAVATHI, P. ve REDDY, P.P., *Analysis of chromosomal aberrations in men occupationally exposed to cement dust*, Mutat. Res., **490**, 179-186 (2001).

FELLAY-REYNIER, I., ORSIERE, T., SARI-MINODIER, I., AUQUIER, P., ZATTARA-CANNONI, H., CAPODANO, A.M., COZE, C., DE MEO, M., BERNARD, J.L. ve BOTTA, A., *Evaluation of micronucleated lymphocytes, constitutional karyotypes and anti-p53 antibodies in 21 children with various malignancies*, Mutat. Res., **467**, 31-39 (2000).

FENDER, H. ve WOLF, G., *Cytogenetic investigations in employees from waste disposal sites*, Toxicology Letters, **96**, 149-154 (1998).

FENECH, M. ve MORLEY, A., *Measurement of micronuclei in lymphocytes*, Mutat. Res., **147**, 29-36 (1985).

FENECH, M., *the in vitro micronucleus technique*, Mutation Research, Fund. Mol. Mec. Mut., **455**, 81-95 (2000).

FERENC, T., JANIK-SPIECHOWICZ, E., BRATKOWSKA, W., LOPACZYNSKA, D., STROZYNSKI, H., DENYS, A. ve MORDALSKA, A., *Genotoxicity assessment of new synthesized acridine derivative-3,6-diamino-10-methyl-9,10-dihydroacridine*, Mutat. Res., **444**, 463-470 (1999).

FOX, M. ve SCOTT, D., *The genetic toxicology of nitrogen and sulfur mustard*, Mutat. Res., **75**, 131-168 (1980).

FRAM, R.J., *Cisplatin and platinum analogues: recent advances*, Curr. Opin. Oncol., **4**, 1073-1079 (1992).

FRANKFURT, O.S., *Inhibition of DNA repair and the enhancement of cytotoxicity of alkylating agents*, Int. J. Cancer, **48**, 916-923 (1991).

FREEMAN, B.A., WILSON, R.E., BINDER, R.G. ve HADDON, W.F., *Halogenated 2,5-pyrrolidinediones: synthesis, bacterial mutagenicity in Ames tester strain TA-100 and semi-empirical molecular orbital calculations*, Mutat. Res., **490**, 89-98 (2001).

FRIEDBERG, E.C. ve HANAWALT, P.C., *DNA repair: A laboratory manual of research procedures*, Markel Dekker, Inc., New York, USA (1988).

FRIEDBERG, E.C., WALKER, G.C. ve SIEDE, W., *DNA repair and mutagenesis*, ASM Press, Washington, D.C., USA (1995).

- GALIEGUE-ZOVITINA, S., BAILLEVL, B. ve LOUCHEUX-LEFEBRE, M.H., *N²-Guanyl and N⁶-adenyl arylation of chicken erythrocyte DNA by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide*. *Cancer Res.*, **46**, 1858-1863 (1986).
- GARDNER, E.J., SIMMONS, M.T. ve SNUSTAD, D.P., *Principles of genetics*, John Willey and sons., New York, USA (1991).
- GASIOROWSKI, K., BROKOS, B., SZYBA, K. ve LESZEK, J., *Antimutagenic activity of fluphenazine in short-term tests*, *Mutat. Res.*, **16**, 31-38 (2001).
- GASPORRO, F.P. ve FRESCO, J.R., *Ultraviolet-induced 8,8-adenine dehydromers in oligo-and polynucleotides*, *Nucleic Acids Res.*, **14**, 4239-4251 (1986).
- GATEHOUSE, D.G., ROWLAND, I.R., WILCOX, P., CALLANDER, R.D. ve FOSTER, R., *Bacterial mutation assay, Basic mutagenicity Ukems recommended procedures* (Ed:Kirkland, D.J.), The Bath Press, Avon, Great Britain, UK (1990).
- GIRI, S. D., CHATTERJEE, A., *Modulation of mitomycin C-induced sister chromatid exchanges and cell cycle delay by buthionine sulfoximine and reduced glutathione in mouse bone marrow cells in vivo*, *Mut. Res.*, **413**, 227-234 (1998).
- GIRI, A.K., DAS, M., REDDY, V.G. ve PAL, A.K., *Mutagenic and genotoxic effects of theophylline and theobromine in Salmonella assa and in vivo sister chromatid exchanges in bone marrow cells of mice*, *Mutation research, Gen. Tox. Environ. Mut.*, **444**, 17-23 (1999).
- GOLLAPUDI, B. B., JACKSON, K. M. ve STOTT, W. T., *Hepatic lac I and cII mutation in transgenic (lambdaLIZ) rats treated with dimethylnitrosamine*, *Mutat. Res.*, **419**, 131-135 (1998).
- GOMEZ-ARROYO, S., DIAZ-SANCHEZ, Y., MENESES-PEREZ, M.A., VILLALOBOS-PIETRINI, R. ve LEON-RODRIGUEZ, J., *Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides*, *Mutat. Res.*, **466**, 117-124 (2000).
- GRDINA, D. J., KATAOKA, Y. ve BASIC, I., PERRIN, J., *The radioprotector WR-2721 reduces neutron-induced mutation at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase locus in mouse splenocytes when administered prior to following irradiation*, *Cracinogenesis*, **13**, 811-814 (1992).
- GRIFFITHS, A.J.F., MILLER, J.H., SUZUKI, D.T., LEWONTIN, R.C. ve GELBART, W.M., *An introduction to genetic analysis*, W.H. Freeman and Company, New York, USA (1996).
- GROOPMAN, J.D. ve CAIN, L.G., *Interactions of plant toxins with DNA: aflatoxins, sterigmacystin, safrole, cycasin and pyrrolizidine alkaloids*,

Chemical carcinogenesis and mutagenesis I (Ed: Cooper, C.S., Grover, P.L.), Springer-Verlag, KG, Berlin (1990).

GRZESIUK, E., GOZDEK, A. ve TUDEK, B., *Contribution of E. Coli AlkA, TagA glycosylases and UvrABC-excinuclease in MMS mutagenesis*, *Mutat. Res.*, **480-481 (1-2)**, 77-84 (2001).

GUADANO, A., GONZALEZ-COLOMA ve A., PENA, E., *Genotoxicity of the insecticide rotenone in cultured human lymphocytes*, *Mutat. Res.*, **414**, 1-7 (1998).

GUENGERICH, F.P., *Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer chemotherapy*, *Cancer Res.*, **1:48(11)**, 2946-2954 (1988).

GUENGERICH, F.P., *Metabolism and genotoxicity of dihaloalkenes, Cojugation-dependent carcinogenicity and toxicity of foreign compounds* (Ed: Ander, M.V., Dekant, W.), Academic Press, Inc., San Diego, California (1994).

GUVEN, K., *Biyokimyasal ve moleküler toksikoloji*, Dicle üniversitesi basımevi, Diyarbakır (1999).

HAACK, T., ERDINGER, L. ve BOCHE, G., *Mutagenicity in Salmonella typhimurium TA98 and TA100 of nitroso and respective hydroxylamine compounds*, *Mutat. Res.*, **491**, 183-193 (2001).

HALL, M. ve GROVER, P.L., *Polycyclic aromatic hydrocarbons: metabolism, activation and tumour initiation*, *Chemical carcinogenesis and mutagenesis I* (Ed:Cooper, C.S., Grover, P.L.), Springer-Verlag, KG, Berlin (1990).

HALL, I. H., PEATY, N. J., HENRY, J. R., EASMON, J., HEINISCH, G., PURSTINGER, G., *Investigations on the mechanism of action of the novel antitumor agents 2-benzothiazolyl, 2-benzoxazolyl and 2-benzimidazolyl hydrazones derived from 2-acetylpyridine*, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, **332(4)**, 115-123 (1999).

HANNA, M.G., NELSON, I.P., RAHMAN, S., LANE, R.J., LAND, J., HEALES, S., COOPER, M.J., SCHAPIRA, A.H., MORGAN-HUGHES, J.A. ve WOOD, N.W., *Cytochrome c oxidase deficiency associated with the first stop-codon point mutation in human mtDNA*, *Am.J.Hum.Genet.*, **63**, 29-36 (1998).

HARTMAN, P. E., *Mutagens: some possible health impacts beyond carcinogenesis*, *Environmental Mutagenesis*, **5**, 139-152 (1983).

HARTMAN, P.E. ve AUKERMAN, S.L., *Salmonella tester strains: mutational targets and correlation with animal carcinogenicity and teratogenicity*. In *Mechanisms of DNA Damage and Repair*, ed.M.G. Simic, L. Grossman and A.D. upton. Plenum Press, New York, 407-24 (1986).

HASS, B.S., HEFLICH, R.H., SHADDOCK, J.G. ve CASCIANO, D.A., *Comparison of mutagenicities in a Salmonella reversion assay mediated by uninduced hepatocytes and hepatocytes from rats pretreated for 1 or 5 days with Aroclor 1254*, Environmental Mutagenesis, **7**, 391-403 (1986).

HE, J.L., CHEN, W.L., JIN, L.F. ve JIN, H.Y., *Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation*, Mutat. Res., **469**, 223-231 (2000).

HOLLENBERG, P.F., *Mechanisms of cytochrome P450 and peroxidase-catalyzed xenobiotic metabolism*, FASEB J., **6**, 688-694 (1992).

HOLLOWELL, J.G. ve LITTLEFIELD, L.G., *Chromosome damage induced by plasma from irradiated patients. An indirect effect of X-ray*, Prof.Soc.Exp.Biol.Med., **129**, 240-244 (1968).

HUTCHINSON, I., CHUA, M.S., BROWNE, H.L., TRAPANI, V., BRADSHAW, T.D., WESTWELL, A.D. ve STEVENS, M.F., *Antitumor benzothiazoles. 14. Synthesis and in vitro biological properties of fluorinated 2-(4-aminophenyl)benzothiazoles*, J. Med. Chem., **26**, 44(9), 1446-1455 (2001).

JAGETIA, G.C., JAYAKRISHNAN, A., FERNANDES, D. ve VIDYASAGAR, M.S., *Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment*, Mutat. Res., **491**, 9-16 (2001).

JIN, S.G., CHOI, J. H., AHN, B., O'CONNOR T.R., MAR, W. ve LEE, C.S., *Excision repair of adozelesin-N3 adenin adduct by 3-methyladenin-DNA glycosylases and UvrABC nuclease*, Mol. Cells, **11**, 41-47 (2001).

JUNEJA, T.R., TALUKDAR, A., MEHTA, N. ve GUPTA, R.L., *Effect of various alkyl and unsaturated substituents on the mutagenicity of some nitrophenyl thioethers*, Mutat. Res., **495**, 97-102 (2001).

KADLUBAR, F. F., HAMMONS, G.J., *The role of cytochrome P-450 in the metabolism of chemical carcinogens*, Mammalian Cytochroms P-450, (Ed:Guengerich, F.P), CRC Press, Boca Raton, **2**, 81-130 (1987).

KANG, M.H., GENSER, D. ve ELMADFA, I., *Increased sister chromatid exhangens in peripheral lymphocytes of patients with crohn's disease*. Mutation Research, Fund. Mol. Mec. Mut., **381**, 141-148 (1997).

KASSIE, F., LAKY, B., NOBIS, E., KUNDI, M. ve KNASMULLER, S., *Genotoxic effects of methyl isothiocyanate*, Mutat. Res., **490**, 1-9 (2001).

KATSIFIS, S.P., KINNEY, P.L., HOSSELET, S., BURNS, F.J. ve CHRISTIE, N.T., *Interaction of nickel with mutagens in the induction of sister chromatid exchanges in human lymphocytes*, Mutat. Res., **35**, 7-15 (1996).

KAUR, I.P. ve SAINI, A., *Sesamol exhibits antimutagenic activity against oxygen species mediated mutagenicity*, *Mutat. Res.*, **470**, 71-76, (2000).

KNOBLER, R.M., HONIGSMANN, H. ve EDELSON, R.L., *Psoralen phototherapies, Psoralen DNA Photobiology* (Ed: Gasparro, F.P.), CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla. (1988).

KOHDA, K., TAKA, K., KASAI, H., NISHIMURA, S. ve KAWAZOE, Y., *Formation of 8-hydroxyguanine residues in cellular DNA exposed to the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**, 626-632 (1986).

KORNBERG, A. ve BAKER, T., *DNA replication*, W.H. Freeman Co., New York, USA, (1991).

KUCUKBAY, H., CETINKAYA, F., DURMAZ, R., *Synthesis and antimicrobial activity of substituted benzimidazole, benzothiazole and imidazole derivatives*, *Arzneimittelforschung*, **45:12**, 1331-1334 (1995).

KUCUKBAY, H. ve DURMAZ., *Antifungal activity of organic and organometallic derivatives of benzimidazole and benzothiazole*, *Arzneimittelforschung*, **47(5)**, 667-670 (1997).

LAFFON, B., PASARO, E. ve MENDEZ, J., *Genotoxic effects of styrene-7,8-oxide in human white blood cells: comet assay in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei*, *Mutat. Res.*, **491**, 163-172 (2001).

LANDI, S., HANLEY, N.M., KLIGERMAN, A.D. ve DE MARINI, D.M., *Induction of sister chromatid exchanges in human peripheral blood lymphocytes by bromoform: investigation of the role of GSTT1-1 polymorphism*, *Mutation Research, Fund. Mol. Mec. Mut.*, **429**, 261-267 (1999).

LAWLEY, P.D., *Mutagens as carcinogens: development of current concepts*, *Mutat. Res.*, **213**, 3-25 (1989).

LAWLEY, P.D., *N-Nitroso compounds*, *Chemical carcinogenesis and mutagenesis I*. (Ed: Cooper, C.S., Grover, P.L.), Springer-Verlag, KG, Berlin (1990).

LAZUKA, J.R., LEKEVICIUS, R., DEDONYTE, V., MACIULEVICIUTE-GERVERS, L., MIERAUSKIENE, J., RUDAITIENE, S. ve SLAPSYTE, G., *Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in Lithuanian populations: effects of occupational and environmental exposures*, *Mutat. Res.*, **445**, 225-239 (1999).

- LEE, C. C., LIU, I. Y., LIN, J. K., CHU, J. S., SHEW, J. Y., *p53 point mutation enhanced by hepatic regeneration in aflatoxin B1-induced rat liver tumors and preneoplastic lesions*, *Cancer Lett.*, **125**, 1-7 (1998).
- LEE, S-H., SHIN, M., LEE, K-J., LEE, S-Y., LEE, J-T. ve LEE, Y-H., *Frequency of sister chromatid exchange in chrysotile-exposed workers*, *Toxicology Letters*, **108**, 315-319 (1999).
- LELIE, D., REGNIERS, L., BORREMANS, B., PROVOOST, A. ve VERSCHAEVE, L., *The VITOTOX test, an SOS bioluminescence Salmonella typhimurium test to measure genotoxicity kinetics*, *Mutat., Res.*, **389**, 279-290 (1997).
- LEMOS, C.T. ve ERDTMANN, B., *Cytogenetic evaluation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes*, *Mutat. Res.*, **467**, 1-9 (2000).
- LEVIN, D. E., AMES, B. N., *Classifying mutagens as to their specificity in causing the six possible transitions and transversions: a simple analysis using the Salmonella mutagenicity assay*, *Environmental Mutagenesis*, **8**, 9-28 (1986).
- LIU, C., WANG, W., SHEN, W., CHEN, T., HU, L. ve CHEN, Z., *Evaluation of the Biocompatibility of a Nonceramic Hydroxyapatite*, *J-Endod*, **23(8)**, 490-493 (1997).
- LOEB, L.A. ve PRESTON, B.D., *Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites*, *Annu. Rev. Genet.*, **20**, 201-230 (1986).
- MARON, D. M. ve AMES, B. N., *Revised methods for the Salmonella mutagenicity test*, *Mut. Res.*, **113**, 173-215 (1983).
- MASKALERIS, T., LIALIARIS, T. ve TRIANTAPHYLLIDIS, C., *Induction of cytogenetic damage in human lymphocytes in vitro and of antineoplastic effects in Ehrlich ascites tumor cells in vivo treated by methotrexate, hyperthermia and/or caffeine*, *Mutation Research, Fund. Mol. Mec. Mut.*, **422**, 229-236 (1998).
- MCKENZIE, G.J., HARRIS, R.S., LEE, P. L. ve ROSENBERG, S. M., *The SOS response regulates adaptive mutation*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 6646-6651 (2000).
- MIGLIORE, L., COCCHI, L., ROBERTO, S. ve SBRANA, I., *Induction of aneuploidy by antineoplastic drug estramustine in human lymphocytes*, *Mutat. Res.*, **412**, 33-40 (1998).
- MILLER, J.A. ve SURH, Y.J., *Historical perspectives on conjugation dependent bioactivation of foreign compounds*, *Adv. Pharmacol.*, **27**, 1-16 (1994).

- MOL, C.D., HOSFIELD, D.J. ve TAINER, J.A., *Abasic site recognition by two apurinic/apyrimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: the 3' ends justify the means*, *Mutat. Res.*, **460**, 211-229 (2000).
- MONARCA, S., FERETTI, D., ZANARDINI, A., MORETTI, M., VILLARINI, M., SPIEGELHALDER, B., ZERBINI, I., GELATTI, U. ve LEBBOLO, E., *Monitoring airborne genotoxicants in the rubber industry using genotoxicity tests and chemical analyses*, *Mutat. Res.*, **490**, 159-169 (2001).
- MUNZNER, R., GUIGAS, C. ve RENNER, H.W., *Re-examination of potassium sorbate and sodium sorbate for possible genotoxic potential*, *Food Chem. Toxic.*, **28**, 397-401 (1990).
- NAKAMURA, S., ODA, Y., SHIMADA, T., OKI, I. ve SUGIMOTO, K., *SOS inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in Salmonella typhimurium TA 1535/pSK 1002: Examination with 151 chemicals*, *Mut. Res.*, **192**, 239-246 (1987).
- NATARAJAN, A. T. ve DARROUDI, F., *Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens*, *Mutagenesis*, **6**, 399-403 (1991).
- ODA, Y., NAKAMURA, S., OKI, I., KATO, T. ve SHINAGAUSA, H., *Evaluation of the new system (umu test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens*, *Mut. Res.*, **147**, 219-229 (1985).
- ODA, Y., SHIMADA, T., WATANABE, M., ISHIDATE, M. ve NOHMI, T., *A sensitive umu test system for the detection of mutagenic nitroarenes in Salmonella typhimurium NM 1011 having a high nitroreductase activity*, *Mut. Res.*, **272**, 91-99 (1992).
- ODA, Y., YAMAZAKI, H., WATANABE, M., NOHMI, T. ve SHIMADA, T., *Highly sensitive umu test system for the detection of mutagenic nitroarenes in Salmonella typhimurium NM 3009 having high o-acetyltransferase and nitroreductase activities*, *Environ. and Molecular Mutagenesis*, **21**, 357-364 (1993).
- ODA, Y., ARYAL, P., TERASHITA, T., GILLAM, E.M.J., GUENGERICH, F.P. ve SHIMADA, T., *Metabolic activation of heterocyclic amines and other procarcinogens in salmonella typhimurium umu tester strains expressing human cytochrome p4501A1, 1A2, 1B1, 2C9, 2D6, 2E1, and 3A4 and human NADH-p450 reductase and bacterial O-acetyltransferase*, *Mutat. Res.* **492**, 81-90 (2001).
- OGILUIE, W.W., YOAKIMA, C., DO, F., HACHA, B., LAGACE, I., NAUD, J., O'MEARE, J.A. ve DEZIEL, R., *Synthesis and Antiviral Activity of Monobactams Inhibiting the Human Cytomegalavirus Protease*. *Bioorg. Med. Chem. Aug.* **7:8** 1521-31 (1999).

- OGILVIE W.W., YOAKIM, C., DO, F., HACHE, B., LAGACE, L., NAUD, J., O'MEARA J.A. ve DEZIEL, R., *Synthesis and antiviral activity of monobactams inhibiting the human cytomegalovirus protease*, Bioorg. Med. Chem., **7(8)**, 1521-1531 (1999).
- OTOSHI, E., YAGI, T., MORI, T., MATSUNAYA, T., NIKAIDO, O., KIM, S.T., HITOMI, K., IKENAGA, M. ve TODO, T., *Respective roles of cyclobutane pyrimidine dimers, (6-4) photoproducts and minor photoproducts in ultraviolet mutagenesis of repair-deficient xeroderma pigmentosum A cells*, Cancer Res., **60**, 1729-1735 (2000).
- OSTLING, O. ve JOHANSON, K. J., *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **123**, 291-298 (1984).
- ÖZTÜRK, Ş., PALANDUZ, Ş., AKTAN M., ÇEFLE, K., SERAKİNCİ, N. ve PEKÇELEN, Y., *Sister chromatid exchange frequency in B-cells stimulated by TPA in chronic lymphocytic leukemia*, Cancer genetic and cytogenetics, **123**, 49-51 (2000).
- PAI, C.A., *Foundation of genetics. Ascience for society*, Kefford Press, Singapur (1985).
- PALAGINO, F., ARENARE, L., DE CAPRARIIS, P., GRANDOLINI, G., AMBROGI, V., PERIOLI, L., FILIPPELLI, W., FALCONE, G. ve ROSSI, F., *Synthesis and SAR study of imidazo (2,1-b) benzothiazole acids and some related compounds with anti-inflammatory and analgesic activities*, Farmaco., **51(7)**, 483-491 (1996).
- PARK, J.H., LEE, B.J., LEE, S.K., KIM, K., LEE, K.H., CHE, J.H., KANG, K.S. ve LEE, Y.S., *Genotoxicity of drinking water from three korean cities*, Mutat. Res., **466**, 173-178 (2000).
- PERLOW, R.A. ve BROYDE, S., *Evading the proofreading machinery of a replicative DNA polymerase induction of a mutation by an enviromental carcinogen*, J. Mol. Biol., **309**, 519-536 (2001).
- PHILLIPS, D.H., *Modern methods of DNA adduct determination, Chemical carcinogenesis and mutagenesis I (Ed:Cooper, C.S., Grover, P.L.)*, Springer-Verlag, KG, Berlin (1990).
- PLUTH, M.J., RAMSEY, M.J ve TUCKER, J.D., *Role of maternal exposures and newborn genotypes on newborn chromosome aberration frequencies*, Mutat. Res., **465**, 101-111 (2000).
- POPESCU, N. C. ve ZIMONJIC, D. B., *Molecular cytogenetic characterization of cancer cell alterations*, Cancer Genet. Cytogenet., **93**, 10-21 (1997).

- PORTER, T.D. ve COON, M.J., *Cytochrome P.450. Multiplicity of isoforms, Substrates and catalytic and regulatory mechanisms*, J.Biol. Chem, **266**,13469-13472 (1991).
- QUENEAU, P. E., ADESSI, G. L., THIBAUT, P., CLEAU, D., HEYD, B., MANTION, G. ve CARAYON, P., *Early detection of pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis: diagnostic utility of a K-ras point mutation in the pancreatic juice*, Am. J. Gastroenterol, **96**, 700-704 (2001).
- QUILLARDET, P. ve HOFNUNG, M., *The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures*, Mutat. Res., **147**, 65-78 (1985).
- RAABE, F., WOLFF, G., JANZ, S., LANDROCK, A., BIRKENFELD, T. ve HERZSCHUH, R., *Genotoxicity assesment of waste products of auminum plasma etching with the SOS chromotest*, Mutat. Res., **300**, 99-109 (1993).
- RENCÜZOĞULLARI, E., İLA, H.B., KARAYILDIZ, A. ve TOPAKTAŞ, M., *Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes treated with sodium metabisulfite, a food preservative*, Mutation Res, Gen. Tox. Environ. Mut., **490**, 107-112 (2001).
- REYNIER-FELLAY, I., ORSIERE, T., SARI-MINODIER, I., AUQUINER, P., ZATTARA-CANNONI, H., CAPODANO, A.M., COZE, C., DE MEO, M., BERNARD, J.L. ve BOTTA, A., *Evaluation of micronucleated lymphocytes, constitutional karyotypes and anti-p53 antibodies in 21 children with various malignancies*, Mutat. Res., **467**, 31-39 (2000).
- RIBAS, G., SURRALLES, E., CARBONELL, E., CREUS, A., XAMENA, N. ve MARCOS, R., *Lack of genotoxicity of the herbicide atrazine in cultured human lymphocytes*, Mutat. Res., **416**, 93-99 (1998).
- RICH, A., NODHEIM, A. ve WANG, A.H., *The chemistry and biology of left-handed Z-DNA*, Annu. Rev. Biochem, **53**, 791-846 (1984).
- ROBERTS, J.J., *The repair of DNA modified by cytotoxic mutagenic and carcinogenic chemicals*, Adu. Radiat. Biol., **7**, 211-435 (1978).
- ROY, S. K., TRIVEDI, A.H., BAKSHI, S. R., PATEL, R. K., SHUKLA P. H., PATEL, S. J., BHATAVDEKAR, J.M., PATEL, D. P. ve SHAH, P.M., *Spontaneous chromosomal instability in breast cancer families*, Cancer Genet. Cytogenet., **118**, 52-56 (2000).
- RUIZ, M.J. ve MARZIN, D., *Genotoxicity of six pesticides by Salmonella mutagenicity test and SOS chromotest*, Mutat. Res., **390**, 245-255 (1997).
- RUSSELL, P.J., *Genetics*, The Benjamin-Cummings publishing company, inc., Canada, USA (1998).

- SAGE, E., *Distribution and repair of photolesions in DNA genetic consequences and the role of sequence context*, Photochem. Photobiol., **57**, 163-174 (1993).
- SALAMA, S. A., SERRANA, M. ve AU, W. A., *Biomonitoring using accessible human cells for exposure and health assessment*, Mutat. Res. **436**, 99-112 (1999).
- SARKAR, A., SAHA, B.K., BASAK, R., MUKHOPADHYAY, I., KARMAKAR, R. ve CHATTERJEE, M., *Anticlastogenic potential of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in murine lymphoma*, Cancer Letters, **150**, 1-13 (2000).
- SARKER, A.H., WATANABE, S., SEKI, S., AKIYOMA, T. ve OKADA, S., *Oxygen radical-induced single-strand DNA breaks and repair of the damage in a cell-free system*, Mutat. Res., **337**, 85-95 (1995).
- SATO, G., ASAKURAA, S., HAKURAB, A., TSUTSUI-HIYOSHIA, Y. ve KOBAYASHIC, N., *Assessment of potential mutagenic activities of a novel benzothiazole MAO-A inhibitor E2011 using Salmonella tphimurium YG1029*, Mut.Res., **472**, 163-169 (2000).
- SAVAGE, J.R.K., *Annotation: Classification and relationships of induced chromosome structural change*, Journal Medical Genetics, **13**, 103-122 (1976).
- SCARPATO, R., PISTELLI, L., BERTOLI, A., NIERI, E. ve NIGLIORE, L., *In vitro genotoxicity and cytotoxicity of five new chemical compounds of plant orijin by means of the human lymphocyte micronucleus assay*, Toxicology in vitro, **12**, 153-161 (1998).
- SCHAAPER, R.M. ve DUNN, R.L., *Spontaneous mutation in the Escherichia coli lacI gene*, Genetics, **129**, 317-326 (1991).
- SCHNEIDER, M., QUISTAD, G. B. ve CASIDA, J.E., *Glutathione activation of chloropicrin in the Salmonella mutagenicity test*, Mutat. Res., **439**, 233-238 (1999).
- SEEL, K., WALBER, U., HERBOLD, B. ve KOPP, R., *Chemical behaviour of seven aromatic diisocyanates (toluenediisocyanates and diphenyl methane diisocyanates) under in vitro conditions in relationship to their results in the Salmonella/microsome test*, Mutat. Res., **438**, 109-123 (1999).
- SEO, K.W., PARK, M., KIM, J.G., KIM, T.W. ve KIM, H.J., *Effects of benzothiazole on the xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of acetaminophen*, J. Appl. Toxicol., **20**(6), 427-430 (2000).
- SHAHAM, J., KAUFMAN, Z., GURVICH, R. ve LEVI, Z., *Frequency of sister-chromatid exchange among greenhouse farmers exposed to pesticides*, Mutat. Res., **491**, 71-80 (2001).

- SHANAM, M., BECKER, Y. ve COHEN, M.M., *A diffusible clastogenic factor in ataxia telangiectasia*, Cytogenet. Cell Genet., **27**, 155-161 (1980).
- SHI, D.F., BRADSHAW, T.D., WRIGLEY S., MCCALL, C.J., LELIEVELD, P., FICHTNER, I. ve STEVENS, M.F., *Antitumor benzothiazoles. 3.Synthesis of 2-(4-aminophenyl)benzothiazoles and evaluation of their activities against breast cancer cell lines in vitro and in vivo*, J. Med. Chem., **16;39(17)**, 3375-3364 (1996).
- SHIMADA, T., HAYES, C.L., YAMAZAKI, H, AMIN, S., HECHT, S. S., GUENGERICH, F. P., SUTTER, T.R., *Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-4501B1*, Cancer Res., **56**, 2979-2984 (1996).
- SILVA, M.J., CAROTHERS, A., BRANCO, N.C., DIAS, A. ve BOAVIDA, M.G., *Increased levels of sister chromatid exchanges in military aircraft pilots*, Mutation Research, Gen. Tox. Environ. Mut., **441**, 129-134 (1999).
- SIMPSON, A.J., *The natural somatic mutation frequency and human carcinogenesis*, Adv. Cancer Res., **71**, 209-240 (1997).
- SINDEN, R.R. ve COLE, R.S., *Repair of cross-linked DNA and survival of Escherichia coli treated with psoralen plus lights: effects of mutation influencing genetic recombinations and DNA metabolism*, J. Bacteriol., **136**, 538-547 (1978).
- SINGER, B. ve GRUNBERGER, D., *Molecular biology of mutagens and carcinogens*, Plenum Publishing Corp., New York, USA (1983).
- SINGER, B., *O-Alkly pyrimidines in mutagenesis and carcinogenesis: occurrence and significance*, Cancer Res., **46**, 4879-4885 (1986).
- SINGH, N.P., MCCOY, M.T., TICE, R.R. ve SCHNEIDER, E.L., *A simple technique for quantitation of low livils of DNA damage in individual cells*. Experimental Cell research, **175**, 184-191 (1988).
- SIVIKOVA, K. ve DIANOVSKY, J., *Genotoxic activity of the commercial herbicide containing bifenox in bovine peripheral lymphocytes*, Mutation research, Gen. Tox. Environ. Mut., **439**, 129-135 (1999).
- SLAPSYTE, G., JANKAVSKIENE, A., MIERAUSKIENE, J. ve LAZUTKA, J.R., *Cytogenetic analysis of children under long-term antibacterial therapy with nitroheterocyclic compound furagin*, Mutat. Res., **491**, 25-30 (2001).
- SOBTI, R.C., BHARDWAJ, D.K. ve GRUPTA, B.D., *Spontaneous chromosomal aberrations in the peripheral blood lymphocytes of patients with cancer*, Med. Sci. Res., **19**, 23-25 (1991).

- SORENSEN, K.J., ZETTERBERG, L.A., NELSON, D.O., GRAWE, J. ve TUCKER, J.D., *The in vivo dose rate effect of chronic gamma radiation in mice: translocation and micronucleus analyses*, *Mutat. Res.*, **457**, 125-136 (2000).
- SOWERS, L.C., SHAW, B.R., VEIGL, M.L. ve SEDWICK, W.D., *DNA base modification: ionized base pairs and mutagenesis*, *Mutat. Res.*, **177**, 201-218 (1987).
- SÖNMEZ, K., KAYA, M., AKTAŞ, A., İKBAL, M. ve ŞENEL, K., *High frequency of sister exchanges in lymphocytes of the patients with bechet's disease*, *Mutat. Res.*, **397**, 235-238 (1998).
- SPEIT, G., *Consideration on the Mechanism of Differential Giemsa Staining of BrdU-substituted Chromosomes*, *Hum. Gen.*, **67**:264-269 (1984).
- SPEIT, G. ve HAUPTER, S., *On the mechanism of differential giemsa staining of bromodeoxyuridine-substituted chromosomes*, *Hum. Genet.*, **70**, 126-129 (1985).
- SPIECHOWICZ-JANIK, E. ve WYSZYNSKA, K., *Genotoxicity of farbasol and its component: 4-ethyltoluene*, *Mutat. Res.*, **417**, 95-100 (1998).
- SRAM, R.J., ROSSNER, P., PELTONEN, K., PODRAZILOVA, K., MRACKOVA, G., DEMOPOULOS, N.A., STEPHANOU, G., VLACHODIMITROPOULOS, D., DARROUDI, F. ve TATES, A.D., *Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cells with high frequency of SCE, micronuclei and comet assay parameters in 1,3-butadiene-exposed workers*, *Mutat. Res.*, **419**, 145-154 (1998).
- SURRALLES, J., FALCK, G. ve NORPPA, H., *In vivo cytogenetic damage revealed by FISH analysis of micronuclei in uncultured human T lymphocytes*, *Cytogenet. Cell Genet.* **75**, 151-154 (1996).
- ŞAPLAKOĞLU, V. ve İŞCAN, M., *Sister chromatid exchanges in human lymphocytes treated in vitro with cadmium in G₀ and S phase of their cell cycles*, *Mutation Research, Gen. Tox. Environ. Mut.*, **412**, 109-114 (1998).
- ŞARDAŞ, S., YILMAZ, M., ÖZTOK, U., ÇAKIR, N. ve KARAKAYA, A.E., *Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation*, *Mutat. Res.*, **490**, 123-129 (2001).
- THEIS, K., SKORVAGA, M., MACHIUS, M., NAKAGAWA, N., VANHOUTEN, B. ve KISKER, C., *The nucleotide excision repair protein UvrB, a helicase-like enzyme with a catch*, *Mutat. Res.*, **460**, 277-300 (2000).
- THOMA, F., *Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair*, *EMBO J.*, **18**, 6585-6598 (1999).

TOPAKTAŞ, M. ve SPEIT, G., *Sister chromatid exchange (SCE) testinin mutajenite ve kanserojenitenin belirlenmesinde kullanılması*, Ç.Ü. Sağlık Bil. Der. **5(1,2,3)**, 73-84 (1990).

TOPAKTAŞ, M., RENCÜZOĞULLARI, E. ve İLA, H. B., *In vivo chromosomal aberations in bone marrow cells of rats treated with Marshal*, Mutat. Res., **371**, 259-264 (1996).

TOPAL, M., D., *DNA repair, oncogenes and carcinogenesis*, Carcinogenesis, **9**, 691-696 (1988).

TOROUS, D.K., DERTINGER, S.D., HALL, N.E. ve TOMETSKO, C.R., *An automated method for discriminating aneugen- vs. clastogen-induced micronuclei*, Environ. Mol. Mutagen., **31**, 340-344 (1998).

TORRES DE LEMOS, C. ve ERDTMANN, B., *Cytogenetic evalvation of aquatic genotoxicity in human cultured lymphocytes*, Mutation Research, Gen. Tox. Environ. Mut., **467**, 1-9 (2000).

TSUKIYAMA, T., SATO, K., *Preparation of benzothiazole and benzoxazoles*, JP. Appl., **96**, 130-145 (1996).

ULITZUR, S., WEISER, I. ve YANNAL, S., *A new, sensitive and simple bioluminescence test for mutagenic compounds*, Mutat. Res., **74**, 113-124 (1980).

UMBUZEIRO, G.A., ROUBICEK, D.A., SANCHEZ, P.S. ve SATO, M.I.Z., *The Salmonella mutagenicity assay in surface water quality monitoring program based on a 20-year survey*, Mutat. Res., **491**, 119-126 (2001).

VAHL, H.H., KARBE, L. ve WESTENDORF, J., *Genotoxicity Assessment of Suspended Particulate Matter in the Elbe River : Comparison of Salmonella Microsome test, Arabinose Resistance test, and Umu-test*. Mutat. Res., **394** (1-3) 81-93 (1997).

VIJAYALAXAMI, R.R. ve TICE, G.H.S., *Assesment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique*, Mutat. Res., **271**, 243-252 (1992).

VILLARINI, M., MORETTI, M., PASQUINI, R., FATIGONI, C., MARCARELLI, M. ve MONARCA, S., *In vitro genotoxic effects of the insecticide deltametrin in human peripheral blood levkocytes: DNA damage ('comet' assay) in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei*, Toxicology, **130**, 129-139 (1998).

VRIJSEN, R., MICHOTTE, Y. ve BOEYE, A., *Metabolic activation of quercetin mutagenicity*, Mutat. Res., **232**, 243-248 (1990).

WALKER, G. C., *Inducible DNA repair systems*, Ann. Rev. Biochem, **54**, 425-457 (1985).

WANG, C.K., SU, H.Y. ve LIU, C.K., *Chemical Composition and Toxicity of Tawanese Betel Quid Extract*. Food-Chem-Toxicol.Feb-Mar; **37 (2-3)** : 135-44 (1999).

WASILEWSKA-CEBULSKA, A., NOWAK, D., NIEDZWIEDZ, W., WAGNER, E. D. ve PLEWA, M. J., *Studies on the genotoxic effects of aminophenazines using two cellular models and three different methods*, Mutat. Res., **446**, 57-65 (1999).

WELLS, G., BRADSHAW, T.D., DIANA, P., SEATON, A., SHI, D.F., WESTWELL, A.D. ve STEVENS, M.F., *Antitumour benzothiazoles. Part 10: the synthesis and antitumour activity of benzothiazole substituted quinol derivatives*, Bioorg. Med. Chem. Lett., **6;10(5)**, 513-515 (2000).

WILCOX, P., NAIDOO, A., WEDD, D.J. ve GATEHOUSE, D. G., *Comparison of Salmonella typhimurium TA 102 with Escherichia coli WP2 tester strains*, Mutagenesis, **5**, 285-291 (1990).

WU, F., IJIMA, K., NISHIDA, A. ve HIGURASHI, M., *Sister chromatid exchanges in the peripheral lymphocytes of newborns with Down syndrome after in vitro exposure to blue or green light*, Mutat. Res., **367**, 261-264 (1996).

WU, F.Y., TSAI, F.J., KUO, H.W., TSAI, C.H., WU, W.Y., WANG, R.Y. ve LAI, J.S., *Cytogenetic study of workers exposed to chromium compounds*, Mutat. Res., **464**, 289-296 (2000).

YAGUCHI, H., YOSHIDA, M., EJIMA, Y. ve MIYAKOSHI, J., *Effect of high-density extremely low frequency magnetic field on sister chromatid exchanges in mouse m5S cells*, Mutat. Res., **440**, 189-194 (1999).

YAMADA, H., KOTAKI, H., ITOH, T., SAWADA, Y. ve IGA, T., *Effect of anti-inflammatory bowel disease drug, E 3040, on urate transport in rat renal brush border membrane vesicles*, European Journal of Pharmacology, **406**, 45-48 (2000).

YANG, Q., HERGENHAHN, M., WENINGER, A. ve BARTSCH, H., *Cigarette smoke induces direct DNA damage in the human B-lymphoid line Raji*, Carcinogenesis, **20**, 1769-1775 (1999).

YOU, B.Y., WANG, Y.H. ve KUO, M.L., *Role of reactive oxygen species in cupric 8-quinolinoxide-induced genotoxic effect*, Mutat. Res., **491**, 45-56 (2001).

ZHANG, Y. ve WOLOSCHAK, G.E., *Detection of codon 12 point mutation of the K-ras gene from mouse lung adenocarcinoma by 'enriched' PCR*. Int. J. Radiat. Biol., **74**, 43-51 (1998).

ZHOU, R., ZHOU, Y., CHEN, D., LI, S. ve HAVG, A., *Effects of soaking temperature and soaking time during preparation of water extract of tea an anticlastogenicity against environmental tobacco smoke in the sister-chromatid exchange assay*, Toxicology letters, 115, 23-32 (2000).

EK-1. DENEYDE KULLANILAN ORTAMLARIN İÇERİKLERİ VE HAZIRLANMALARI

(50X) Vogel Bonner Medium

Kullanım: MGA ve HBA (master) plakları

MgSO₄.7H₂O 10gr

Sitrikasit monohidrat 100gr

K₂HPO₄ 500gr

NaH₂NH₄(PO₄.4H₂O) 175gr

Distile su (45C) 670ml

Maddeler yukarıda yazıldıkları sıra ile suyun içine eklenir, daha sonra hacim 1lt' ye tamamlanır. 1litrelik 2 kaba bölünerek 121 °C de 20 dakika süreyle otoklav edilir.

(0.5mM) Histidin /Biyotin solüsyonu

Kullanım: Mutajenite deneyi (100ml top agara 10ml olarak)

D-Biyotin (F.W.247.3) 30.9mg

L-Histidin.HCl (F.W.191.7) 24.0mg

Distile su 250ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülür, daha sonra histidin ilave edilip otoklav edilir ve +4 °C' de saklanır.

(%0.8/0.02NaOH) Ampisilin solüsyonu

Kullanım :Ampisiline direnç kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

Ampisilin trihidrat 0.8g

0.02M sodyum Hidroksit 100ml

Ampisilin trihidrat, 0.02 M NaOH içinde çözülür ve sterilizasyon için 0.22 µm çaplı filtreden geçirilir ve +4 °C' de saklanır.

(% 0.1) Kristal viyole

Kullanım: rfa mutasyonu'nun kontrolü

Kristal viyole 0.1g

Distile su 100ml

Boya ve su karıştırılır ve solusyon ışık geçirmeyen bir kaba konup+4°C de saklanır.

(%0.13) Biotin çözeltisi

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

D-Biotin.....0.65mg

Distile su.....50ml

Biyotin suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözülür ve otoklav edilir.

(%0.5) Histidin çözeltisi

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

L-Histidin. HCl (F.W.191.7).....2gr

Distile su.....400ml

(%40) Glikoz çözeltisi

Kullanımı: MGA ve HBA plakları hazırlanması

Glikoz.....40gr

Distile su.....100ml

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

(0.1µg/µl) Sodyum Azid çözeltisi

Kullanım: pozitif kontrol

1.0 mg/petri başına olmak üzere distile suda çözülerek kullanılır. TA97 suşu için

S9 karışımı gerektirmeyen kimyasaldır. 0-4 °C de saklanır.

(2µg/µl) 2-Aminofluorene (2AF)

Kullanım: pozitif kontrol

1.0 mg/petri başına olmak üzere dimetilsüloksit' de (DMSO) çözülerek kullanılır.

S9 karışımı gerektirmeyen kimyasaldır. 0-4 °C de saklanır.

(2µg/µl) 4-Nitro-o-Fenilendiamin (NPD)

200 µg/petri olmak üzere DMSO da çözülerek kullanılır. TA 98 suşu için S9

karışımı gerektirmeyen kimyasaldır. Oda ısısında saklanır.

3-Metilkolontren

Kullanım: metabolik aktivasyonun hızlandırılması

3-metilkolontren.....64mg

Mısır yağı.....1ml

(80mg/kg olmak üzere) mısır yağında çözülerek 0.5ml intraperitoneal olarak enjekte edilir.

(0.15M) KCl çözeltisi

Kullanım: mikrozom izolasyonu

KCl.....11.275gr

Distile su.....1000ml

KCl, bir miktar distile suda çözülür ve toplam hacim 1000ml' ye tamamlanarak otoklav edilir ve +4 °C' de saklanır.

Top agar

Kullanım: Mutasyon deneyi

Agar.....6gr

NaCl.....5gr

Distile su.....1000ml

Agar-su ve tuz manyetik karıştırıcıda ısıtılarak ve karıştırılarak çözülüp otoklav edilir.

Histidin/ Biyotin plakları (HB Agar)

Kullanım: Histidin gereksinim deneyi

Agar.....15gr

%40 glikoz.....50ml

histidin.HCl.H₂O.....10ml

(2g/400ml.H₂O)

0.5mM Biyotin.....6ml

Distile su.....914ml

Agar ve su karıştırıldıktan sonra otoklav edilir. 45°Cye soğutulup %40 glikoz, 50 XVB tuzları ve histidin çözeltisi eklenir, solusyon biraz daha soğuduktan sonra biyotin eklenir, karıştırıp petri kutularına 30ml olarak dağıtılır.

Histidin/ Biyotin/ Ampisilin plakları (HBA Agar)

Kullanım: Ampisiline dirençlilik testi ve 'Master Plate' hazırlanmasında

Agar.....15gr

Distile su.....910ml

50 xVB tuzları.....20ml

%40 glikoz.....50ml

histidin.HCl.H₂O.....10ml

(2g/400ml.H₂O)

0.5mM Biyotin.....6ml

(%0.8/0.02NaOH) Ampisilin....3.15ml

Agar ve su. otoklavlanır, 45°Cye soğutulup %40 glikoz, 50x VB tuzları ve histidin bu sıcak solusyona eklenip karıştırılır ve biraz daha soğuyunca biyotin ve

ampisilin eklenip plaklar petrilere ve 30 ml olarak aktarılır. Bu plaklarda bakteriler +4°C de 2 ay saklanabilir.

Minimal Glikoz Agar Plakları

Agar.....15gr

Distile su.....930ml

50xVB.....20ml

%40 glikoz.....50ml

Agar ve su 2 lt'lik kapta karıştırılıp çözülür ve otoklavlanır, 45°C ye soğutulup %40 glikoz ve 50 xVB tuzları eklenip petri kutularına 30ml olarak aktarılır.

Nutrient Agar Plakları

Kullanım: Gecelik kültürün ml'sindeki bakteri sayısını bulma ve genotip kontrolü

a) kristal viyole b) UV ye duyarlılığı

Oxoid nutrient broth no 2..... 25gr

Agar.....15gr

Distile su.....930ml

Agar, broth ve su 2 lt'lik kapta karıştırılıp otoklavlanır ve petri kutularına 30ml olarak aktarılır .

Nutrient Broth sıvı kültür ortamı

Kullanım: Bakterilerin Gecelik kültürde büyütülmeleri

Oxoid nutrient broth no: 2.....5gr

Distile su.....200ml

Broth ve su karıştırılıp otoklavlanır ve +4 °C' de saklanır.

S9 karışımı

Ticari olarak alınmış S9 tabletleri (1 tablet için) 14ml distile su da çözülür ve 3ml rat mikrozomu ilave edilip toplam hacim 20ml'ye tamamlanır, buz içinde (0-2°C) kullanıma kadar muhafaza edilir (kullanılacağı zaman hazırlanıp hemen tüketilir).

Kromozom Medyumu

Biochrom firmasının ürettiği Chromosome Medium B (Biochrom no:F5023) hücre kültürü için kullanılmıştır. Chromosome Medium B'nin her litresinde aşağıdaki bileşikler belirtilen belirtilen miktarlarda bulunmaktadır.

MEM Joklik with non essential amino acids...	850 ml
FKS	150 ml
Heparin	25.000 E
Penisilin sodyum salt	75.000 E
Streptomisin sulfat	50 mg
Fitohemoglutinin	2.5 mg

Bubesiye steril şartlarda her tüpe 2.5 ml koyarak paylaştırılmıştır. Kültür tüpleri steril olarak temin edilmiştir.

Kolşisin

Kolşisin eriyiği steril saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom medyumunun her ml'sinde 0.06 µg olacak şekilde 2.5 ml'lik kromozom medyumunda (0.06 µg/ml) ilave edilmiştir.

Hipotonik Solüsyon

Hipotonik solüsyon olarak %0.4'lük potasyum klorür (KCl) (Merck) kullanılmıştır.

Fiksatif

Fiksatif 1 kısım glacial asetik asit'in 3 kısım metanol ile karıştırılması sonucu hazırlanmıştır. Fiksatif kullanılmadan 2 saat önce hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır. Her seferinde preparat yapım işleminden 2 saat önce hazırlanıp taze olarak kullanılmıştır.

5'-Bromo-2'-deoksiuridin (BrdUrd)

BrdUrd Sigma firmasından temin edilmiştir. (Sigma no:B5002). BrdUrd eriyiği steril saf su içerisinde hazırlanmıştır. Bu eriyikten kültür tüpleri içerisindeki besiyerine 10 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir.

Sorensen Tamponu

Sorensen tamponu, tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış olup, bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanılmıştır. Hazırlanışı:

Tampon A: 11.34 gr KH_2PO_4 250 ml saf su içerisinde eritilmiştir (pH 4.8)

Tampon B: 14.83 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 250 ml saf su içerisinde eritilmiştir (pH 9.3)

SCE'yi incelemek amacıyla preparat yapımı sırasında preparatlar Sorensen tamponu içerisinde UV lambası ile ışınlandırılmıştır. Ayrıca bu tampon %5'lik Giemsa boyası hazırlanmasında da kullanılmıştır.

Standart Saline Sitrat (SSC)

SSC eriyiğini hazırlamak için 11.05 gr trisodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) ve 21.9 gr NaCl kullanılmıştır.

Bu iki madde belirtilen miktarlarda ayrı ayrı kaplarda bir miktar saf suda çözülmüş, aynı kaba aktarılarak birbirleriyle karıştırılmış ve bu karışım 500 ml'ye tamamlanarak 5xSSC stok solüsyonu hazırlanmıştır. Bu eriyiğik buzdolabında saklanmıştır. Deneylerimizde bu stoktan 20 ml alıp üzeri 100 ml oluncaya kadar kaf su ile tamamlanarak elde edilen 1xSSC solüsyonu kullanılmıştır.

Heparin

Kan pıhtılaşmasını önlemek amacıyla % 0,1'lik oranda steril serum fizyolojik ile hazırlanmıştır.

Giemsa

Giemsa boya solüsyonu Fluka firmasında temin edilmiş olup, deneylerimizde Sorensen tamponu ile hazırlanmış olan %5'lik boya solüsyonu preparatların boyanmasında kullanılmıştır.

Entellan

Preparat kapatma solüsyonudur. Preparatlar daimi hale getirilirken lam ve lamelin birbirine yapıştırılmasında kullanılmıştır.

Nitrik Asit (HNO₃)

Lamları temizlemek amacıyla kullanılan nitrik asit, 1 N çözelti olarak hazırlanmıştır. Plastik şişede saklanarak her defasında tekrar tekrar kullanılmıştır.

İnce bir tabaka halinde ışınlama solüsyonu ile örtülen preparatlar, karanlıkta 15 cm yükseklikten ve 30 W'lık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen tek ultraviyole (UV) lambası ile 30 dakika ışınlandırılmıştır. Işınlama bittikten sonra preparatlar 1xSSC solüsyonu içerisinde 58-60°C arasındaki sıcaklıklarda 60 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitmeden 15 dakika önce Sorensen tamponu içerisinde % 5'lik Giemsa boya solüsyonu hazırlanmıştır.