NONİLFENOL VE BİSFENOL A'NIN
AMES/*SALMONELLA*/MİKROZOM
TEST YÖNTEMİ KULLANILARAK
MUTAJENİK ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Fahriye ZEMHERİ

MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Cevdet UĞUZ

TEZ NO: 2011-002
2011-Afyonkarahisar

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NONİLFENOL ve BİSFENOL A'NIN AMES/*SALMONELLA*/MİKROZOM TEST YÖNTEMİ KULLANILARAK MUTAJENİK ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Fahriye ZEMHERİ

MEDİKAL BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Cevdet UĞUZ

TEZ NO: 2011-002
2011 – Afyonkarahisar

KABUL ve ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Medikal Biyoloji ve Genetik programı

çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından

Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19 / 01 / 2011

Doç. Dr. Cevdet UĞUZ
(Danışman)
ÜYE

Doç. Dr. Mine DOSAY AKBULUT
ÜYE

Doç. Dr. Gülcan ERBİL AVCI
ÜYE

Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Fahriye Zemheri'nin ''Nonilfenol ve Bisfenol A'nın Ames/*Salmonella*/Mikrozom test yöntemi kullanılarak mutajenik etkisinin belirlenmesi'' başlıklı tezi 27./01./2011..günü saat10.00'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü
Doç. Dr. Esma KOZAN

ÖNSÖZ

Çalışmalarım esnasında her türlü desteğini ve yardımını esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren danışman hocam Doç. Dr. Cevdet UĞUZ‘ a, malzemelerin temininde ve bana her zaman yardımcı olan hocam Yard. Doç. Dr. Metin ERDOĞAN’ a, Medikal Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı; öğretim üyesi hocam Doç. Dr. Mine DOSAY AKBULUT’ a, Araş. Gör. Selcen Süheyla ERGÜN’ e, Araş. Gör. Dr. Ö. Faruk LENGER’ e ve Serkan EROL’ a, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Bölüm Başkanı Prof. Dr. Muhsin KONUK’ a, hocam Araş. Gör. Dr. Recep LİMAN’ a, tezimin tüm aşamalarında bana yol gösteren ve her aşamada yanımda olan sevgili hocalarım Araş. Gör. Yasin EREN’ e ve Araş. Gör. Dilek K. AKYIL’ a, her zaman yanımda olan dostum Canan EROL’a, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen arkadaşlarım Gözde ÇELİKELOĞLU’ na ve Mükerreme ÇELİKÖRS’ e, sevgili dostum Şebnem BALKIR’ a, çalışmam ve eğitimim boyunca her zaman bana destek olan sevgili aileme de teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

Kabul ve Onay ……ii

Önsöz ……iii

İçindekiler …….....iv

Simgeler ve Kısaltmalar……..vi

Şekiller…...…….……...….....vii

Tablolar……...……..…..…….....viii

ÖZET ……1

ABSTRACT……...……..2

1. GİRİŞ ……..…….....3

2. GENEL BİLGİLER……...……6

2.1. Nonilfenol ve Bisfenol A'nın Genel Özellikleri…….……..…….6

2.2. Mutasyon…….……..…….....10

2.2.1. Kromozomların Yapısının Değişmesi...…….……...11

2.2.2. Kromozomların Sayısının Değişmesi…..…….……....11

2.2.3. Gen Mutasyonlarının Özellikleri ve Çeşitleri……..……12

2.2.3.1. Baz Değişimi Mutasyonları……...……12

2.2.3.2. Sessiz, Yanlış Anlamlı ve Anlamsız Mutasyonlar…..…….....13

2.2.3.3. Çerçeve Kayması Mutasyonları…….…13

2.3. Mutajenik Faktörler…….....…15

2.4. DNA Onarım Mekanizmaları……..17

2.4.1. Fotoreaktivasyon……...…….…….…..17

2.4.2. Alkil transferaz……...……...……18

2.4.3. Kesip-çıkarma Tamiri..…… …….....…18

2.4.4. Yanlış Eşleşme Onarımı……...……...…….……18

2.4.5. SOS Onarımı……..……...19

2.5. Biyotransformasyon…….....19

2.5.1. Mikrozomal Enzimler……..…….20

2.5.2. Faz I Reaksiyonları..…… …….....20

2.5.3. Faz II Reaksiyonları…….……..…21

2.6. Mutajenite Test Yöntemleri…….……21

2.6.1. Sitogenetik Metodlar…..……...……...23
2.6.2. Bakteriyal Yöntemler…….....24
2.6.2.1. Ames/*Salmonella*/Mikrozom Test Yöntemi……..24
2.6.2.1.1. Ames/*Salmonella*/Mikrozom Test Yöntemi ile Yapılan Bazı Çalışmalar..25

3. MATERYAL VE METOD …….27
3.1.MATERYAL…….....27
3.1.1. Kimyasal Maddeler……..…….……..…..27
3.1.2. *Salmonella typhimurium* Test Suşları…….....27
3.1.3. Deneyde Kullanılan Ortamların İçerikleri ve Hazırlanışı…….28
3.2. METOD…….……..36
3.2.1.*S. typhimurium* Suşlarının Kültürlerinin ve Master Plaklarının Hazırlanması..36
3.2.2. Bakterilerin Genotiplerinin Kontrol Edilmesi…..……37
3.2.2.1. Histidin Gereksinimi Kontrolü…..……37
3.2.2.2. *uvr*B Mutasyonu Kontrolü…...……...……...37
3.2.2.3. Rfa Mutasyonu Kontrolü…...……....38
3.2.2.4. R-faktör Varlığı Kontrolü…...……...…….39
3.2.2.5. Spontan Olarak Geriye Dönüş Sıklığının Kontrolü…….....39
3.2.3. Test Maddelerinin ve Dozlarının Hazırlanışı…..…….……40
3.2.4. Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması…….……40
3.2.5. Ames Mutajenite Testinin Yapılışı……...41
3.2.5.1. S9'suz deneyin yapılması……..……41
3.2.5.2. S9'lu deneyin yapılması…….……...42

4. BULGULAR …….....43
4.1. Nonilfenol ve Bisfenol A'nın Sitotoksik Dozlarının Saptanması……..…….43
4.1.1.Nonilfenol' un Sitotoksik Dozunun Belirlenmesi…..……...……43
4.1.2.Bisfenol A' nın Sitotoksik Dozunun Belirlenmesi ……..44
4.2. Nonilfenol ve Bisfenol A'nın S9'lu ve S9'suz Deneyinin Yapılması……44

5. TARTIŞMA VE SONUÇ…….49
KAYNAKLAR …….……....53

SİMGELER VE KISALTMALAR

NF	Nonilfenol
BFA	Bisfenol A
OF	Oktilfenol
ER	Endoplazmik retikulum
DMSO	Dimetilsülfoksid
NFE	Nonilfenol Etoksilat
2AF	2-Aminofluorene
NPD	4- Nitro-*o*-Fenilendiamine
HBA	Histidin/Biyotin/Ampisilin Plakları
50XVB:	Vogel-Bonner-E Ortamı
MGA	Minimal Glikoz Agar Plakları
NA	Nutrient Agar Plakları
NB	Nutrient Broth Sıvı Kültür Ortamı
His	Histidin
Mg	Miligram
G	Gram
Kg	Kilogram
gL^{-1}	Gram/Litre
mgL^{-1}	Miligram/Litre
µg/plak	Mikrogram/Plak
µg/L	Mikrogram/Litre
S9'lu	Metabolik aktivasyonlu
S9'suz	Metabolik aktivasyonsuz

ŞEKİLLER

Şekil.1. Bisfenol A'nın kimyasal yapısı……..……6
Şekil.2. Nonilfenol'un kimyasal yapısı……..…….……..7
Şekil.3. *Salmonella typhimurium* TA 100 suşunun pozitif kontrol S9'lu ve S9'suz deneyi sonuçları……..……..…..46
Şekil.4. *Salmonella typhimurium* TA 98 suşunun pozitif kontrol S9'lu ve S9'suz deney sonuçları……..…….....46
Şekil.5. *Salmonella typhimurium* TA 98 suşunun DMSO kontrolünün S9'lu ve S9'suz deney sonuçları……47
Şekil.6. *Salmonella typhimurium* TA 100 suşunun pozitif kontrol S9'lu ve S9'suz deney sonuçları……..…….....47
Şekil.7. *Salmonella typhimurium* TA 98 suşunun kontrol S9'lu ve S9'suz deney sonuçları……..……..…….….47
Şekil.8. *Salmonella typhimurium* TA 100 suşunun kontrol S9'lu ve S9'suz deney sonuçları…….……48

TABLOLAR

Tablo.1. *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşlarının kendiliğinden (spontan) *his*$^{-}$ durumundan *his*$^{+}$ durumuna dönüşmesi durumundaki bakteri sayıları……..……40

Tablo.2. Nonilfenol'un *Salmonella typhimurium*'un TA100 suşu ile denenen sitotoksik doz belirleme deney sonuçları……..…….....43

Tablo.3. Bisfenol A'nın *Salmonella typhimurium*'un TA100 suşu ile denenen sitotoksik doz belirleme deneyi sonuçları…….…….44

Tablo.4. *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları ile denenen Nonilfenol ve Bisfenol A'nın (S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda) plak inkorporasyon deneyi sonuçları……..……45

ÖZET

Bilimsel ve teknolojik gelişmeler insan hayatını önemli ölçüde kolaylaştırmıştır. Ancak, teknolojinin ilerlemesi ile birlikte bazı olumsuz gelişmeler yaşanmaktadır. Bunların başında da çevre kirliliği gelmektedir. Çevre kirliliğinin insan dâhil bütün canlılara olumsuz etkileri vardır. Doğadaki tüm canlılar günlük yaşamda doğal ya da yapay kimyasal maddelerle karşı karşıya gelmektedir. Bu maddeler; gıdalarda bulunan doğal kimyasallar, pestisitler, gıda katkı maddeleri, kozmetik ve ilaç gibi kimyasallar, sigara dumanı, su ve havadaki kirleticiler gibi karmaşık bileşikler olabilir. Genellikle de, bu kimyasallarda bulunan bileşiklerin mutajenik ve toksik etkileri bilinmemektedir. Bisfenol A (BFA) ve Nonilfenol (NF) bu kimyasallar arasındadır. Ames mutajenite testi kimyasal maddelerin mutajenik etkilerini tespit etmekte kullanılan, test parametreleri açısından en iyi standardize edilmiş bir yöntemdir. Bu testle, çok sayıda kimyasalın mutajenik ve buna bağlı olarak şüphelenilen karsinojenik etkilerinin bir ön taraması yapılabilmektedir. Bu çalışmada BFA ve NF'nin mutajenik etkisi Ames/*Salmonella*/Mikrozom test yöntemi ile araştırılmıştır. Çeşitli dozlarda kullanılan test maddelerinin mutajenik etkisi S9'suz (metabolik aktivasyonsuz) ve S9'lu (metabolik aktivasyonlu) olarak, *Salmonella typhimirium*' un TA98 ve TA100 suşlarında araştırılmıştır. Sonuç olarak, her iki madde içinde toksik olmayan 100 µg/plak, 10 µg/plak, 1 µg/plak, 0,1 µg/plak dozları S9'lu ve S9'suz deneylerde kullanılmıştır ve her iki suş içinde yapılan deneylerde mutajenik etkiye rastlanmamıştır.

Anahtar kelimeler: Nonilfenol, Bisfenol A, Ames/*Salmonella*/Mikrozom Testi, *Salmonella typhimirium*, mutajenik etki

ABSTRACT

Scientific and technological developments facilitated human life significantly. However, some adverse effects are experienced with the devalopment of technology. Environment pollution is one of the main consequences of this development. Environment pollution may have adverse effects on all creatures including human beings. All living organisms are exposed to artificial chemicals in their daily life. These substances may be chemicals such as natural chemicals in food, pesticides, food additives, cosmetics, medicine and also complex compounds such as cigarette smoke, water and air pollutants. In general, mutagenicity and toxic effects of the compounds present in these chemicals are remained to be obscured. Among these are bisphenol A and nonylphenol. Ames mutagen test, used to detect mutagenicity of the chemical substances, is one of the best standardized methods in terms of test parameters. With this test pre-scanning of mutagenicity and corresponding suspected carcinogenic effects of numerous chemicals is possible. In this study, mutagenicity of bisphenol A and nonylphenol is examined by Ames/Salmonella/Microsome Test method. Mutagenicity of various doses of test substances with S9 (metabolic activated) or without S9 (non-metabolic activation) has been investigated in the TA98 and TA100 strains of *Salmonella typhimirium.* As a result, nontoxic 100 µg/ plaque, 10 µg/ plaque, 1 µg/ plaque, 0,1 µg/ plaque doses were used with and without S9 in the experiments in both substances and mutagenicity was discovered in the experiments performed in both strains.

Keywords: Nonylphenol, Bisphenol A, Ames/*Salmonella*/Microsome Test, *Salmonella typhimirim*, mutagenicity

1. GİRİŞ

Çevremizde sayıları milyonları bulan ve biyolojik etkileri bilinmeyen kimyasal maddeler bulunmaktadır. Bu maddelerin çoğunun günlük kullanımda yer alması, özellikle karsinojenik potansiyelleri yönünden test edilmelerini gerekli kılmaktadır (Forman, D., Ames, B., 1991).

Evsel, endüstriyel ve zirai uygulamalar sonucu çevreye verilen atıklar sucul ve karasal canlılarda üreme, gelişme ve diğer yaşamsal faaliyetlerin olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır. Genel olarak çevreye verilen bu atıklar fenolikler, alkoller, aldehitler, steroller, pestisitler, alkilfenolik bileşikler, farmosötik kaynaklı hormonal veya anti-hormonal ilaçlar, deterjanlar, ağır metaller vb. gibi kimyasallardır. Ksenoöstrojenler olarak adlandırılan bu grupta yer alan kimyasalların çoğu veya bunların parçalanma ürünleri de östrojenik, mutajenik, karsinojenik veya toksik olabilmektedir. Çevrede bu kimyasalların büyük çoğunluğu biokütle tarafından çeşitli yollarla bünyelerine alınarak depolanmaktadır (Paxeus ve ark., 1992; Toppari ve ark., 1996).

Kimyasal maddelerin karsinojenik risklerini ortaya çıkarmak için en akılcı yaklaşım, deney hayvanlarında tümör indüksiyonudur. Ancak bu testler sonuçlanması uzun zaman almakta ve maliyetleri yüksek olmaktadır (Mortelmans K., Zeiger E., 2002). Bu nedenle araştırıcılar, kısa zamanda sonuç verebilen ve düşük maliyetli birçok kısa zamanlı mutajenite test sistemleri geliştirmişlerdir (Petek, M. 1999).

Bugün için en iyi bilinen kanser, onkogenlerin ve tümör supresörlerle ilişkili olan genlerdeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle mutasyona neden olan kimyasallar insanlar için sıklıkla karsinojeniktir. Çoğu kimyasallar insanlarla sürekli kontak halindedirler. Bu kimyasalların her biri karsinojenik

potansiyelleri için test edilmek zorundadır. Çoğu karsinojenik kimyasallar DNA'ya zarar vermektedir. Bu kimyasallar insanlar kadar bakteriler için de mutajeniktir.

Mutajenite testlerinden en yaygın kullanılanı 1970'lerin başında Bruce Ames ve onun çalışma arkadaşları tarafından geliştirilen Ames testidir. Bu test *Salmonella typhimirium*'un *his* mutasyonunun revertantları kullanılarak yapılır (Synder ve Champness, 2007).

Ames testi birçok kimyasalın mutajenik aktivitesinin tespitinde kullanılmaktadır. Örneğin; yapılan bir çalışmada, ilaç ön maddesi olarak sentezlenmiş olan on farklı 9- aril substitue fenantren türevi Ames testi kullanılarak *S. typhimurim* TA 98 ve TA 100 suşları yardımı ile mutajenik potansiyelleri açısından test edilmiş ve 9- (5-nitro-1H -benzimidozal-2- il) fenanatren bileşiği mutajenik bulunmuştur (Aydoğdu, K.F., 2003).

İnsan dâhil tüm canlılar çevrede bulunan kimyasal maddelere az ya da çok maruz kalmaktadır. Örneğin, deterjanlar, ot ve böcek ilaçları, gıda katkı maddeleri ve kozmetiklerin içerdiği kimyasalların canlılara olumsuz etkiler yaptığı rapor edilmektedir. Genellikle de, bu kimyasallarda bulunan bileşiklerin mutajenik ve toksik etkileri olduğu düşünülmektedir. Bu kimyasallar arasında Bisfenol A (BFA) ve Nonilfenol (NF)' de bulunmaktadır.

BFA'nın geniş bir kullanım alanı vardır. Örneğin, gıdaların tüketime sunulduğu kaplarda, bebek biberonlarında, polikarbonat plastik ve epoksi reçinelerin üretiminde; dişçilikte kullanılan karışımlarda ve dolgu macunlarında kullanılmaktadır.

En önemli Alkilfenoller, NF ve Oktilfenol (OF)' dur. Alkil fenoller izomerler ya da daha farklı şekillerde bulunur ve Nonilfenol Etoksilat ve Oktilfenol Etoksilat üretmek için kullanılır. Nonilfenol Etoksilat'ları reçine, plastik ve özellikle deterjanlarda yüzey aktif maddesi olarak kullanılmıştır. NF'ler gres yağı, kozmetikler, plastik boyalar, ev ve sanayi deterjanları, kâğıt ve tekstil sanayide kullanılır. 1997 yılında NF'nin kullanımının kısıtlanmasından önce Avrupa Birliği'ndeki üretimi ve toplam NF kullanımı sırasıyla 73.500 ve 78.500 tondur (BOYACIOĞLU, M.,ve ark. 2007).

Kim ve arkadaşları (2006), OF ve NF'nin insanlarda erken embriyonik gelişme üzerindeki zehirli etkilerini çalışmışlar ve insan embriyonik kök hücrelerinde doza bağlı apoptoza neden olduğunu belirtmişlerdir.

İn vitro ve in vivo biyoanalizlerinde test edilmiş birkaç organizmanın üzerinde OF ve NF'nin kronik, ağır ve zehirli özelliklerinin endokrin bozulmasına neden olduğuna dair pek çok kanıt vardır (BOYACIOĞLU, M., ve ark. 2007).

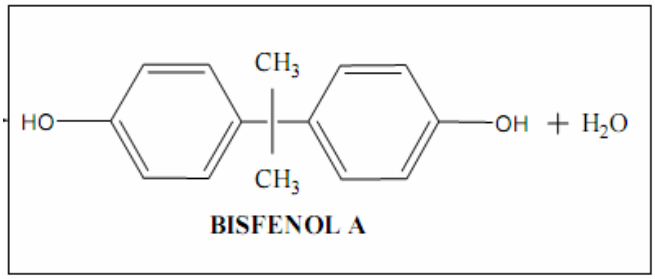
Alkil fenol Etoksilatlarının genetik zarara neden olma güçlerinin tespiti için yapılan pek çok testin negatif olmasına rağmen, şimdiye kadar bu maddelerin mutajenik özellikleri üzerine hiçbir rapor bulunmamaktadır.

Genellikle de, bu kimyasallarda bulunan bileşiklerin mutajenik ve toksik etkileri olduğu düşünülmektedir. Bu kimyasallar arasında BFA ve NF'de vardır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nonilfenol ve Bisfenol A'nın Genel Özellikleri

BFA katı, krem-beyaz renkte, fenolik kokulu, kristal yapıdadır. 25°C'deki yoğunluğu 1,1-1,2 gL^{-1}'dir. Etanol, aseton ve dimetilsülfoksid (DMSO) gibi çözücülerde iyi çözünmektedir. Sudaki çözünürlüğü 25°C'de 120 mgL^{-1}'dir.

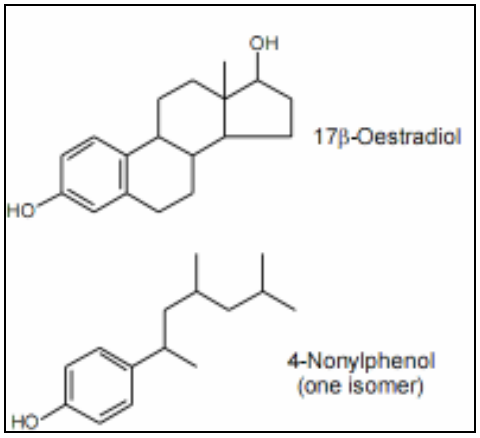


Şekil. 1. Bisfenol A'nın kimyasal yapısı

http://en.wikipedia.org/wiki/Bisphenol A

NF organik bileşiklerin ailesindendir ve alkil fenollerin alt kümesindendir. 25°C'deki yoğunluğu 0,953 gL^{-1}'dir. Etanol ve dimetilsülfoksid (DMSO) gibi çözücülerde iyi çözünmektedir. Sudaki çözünürlüğü 6 mg/L (pH 7)'dir.

Polikarbonat plastiklerin, epoksi reçinelerin, yiyecek ve içecek kutularının ve dişçilikte kullanılan materyallerin yapımında kullanılan BFA ve ot ve böcek ilaçlarında, deterjanlarda, boyalarda ve kozmetik eşyalar gibi çeşitli endüstriyel, tarımsal ve evsel tüketim ürünlerinde bulunan NF, östrojeni taklit ederek endokrin sisteme zarar vermektedir.



Şekil. 2. 17β-Estradiol ve 4-Nonilfenol yapılarının karşılaştırılması
http://en.wikipedia.org/wiki/Nonylphenol

Yıllık üretimi ~1,7 milyar kg civarında olan BFA'nın, özellikle endüstriyel amaçlı üretilen veya endüstriyel aktiviteler sonucu oluşan ksenoöstrojenik kimyasalların artışı, karasal ve sucul hayatın devamlılığının korunmasından dolayı üzerinde durulması gereken önemli bir maddedir.

Alkil fenol Etoksilatlar, temizlik ürünleri, boya, herbisit, pestisit gibi maddelerin yapımında kullanılan yüzey aktif bileşiklerdir. Alkil fenol Etoksilatların biyolojik olarak kolay parçalanma özelliği vardır. Alkil fenol Etoksilatların parçalanma ürünleri toksik ve biyodegradasyona karşı dirençli yapılardır (Warhurst, 1995).

Ahel et al. (1985) raporuna göre, ticari olarak elde edilen nonilfenol gibi alkil fenol türevleri, saf değildir. Örneğin, ticari olarak Aldrich firmasından elde edilen NF'nin, etoksi ünitesine sahip Nonilfenol Etoksilat hatta Oktilfenol ve Oktilfenol Etoksilat içerdiği rapor edilmektedir (BOYACIOĞLU, M., ve ark. 2007).

Noniyonik yüzey aktif madde tayini Nonilfenol Etoksilat (NFE) eşdeğeri olarak potansiyometrik yöntemle yapılmıştır. Noniyonik deterjan konsantrasyonu 50.00 g / 1 - 1 1 0,2 g / l arasında; ortalama konsantrasyon 76.14 ± 21.79 g/ 1, ortalama kirlilik yükü ise 57.26 ± 19.86 kg/ gün olarak saptanmıştır (Vural, N., ve Duygu, Y., 1991-1992).

BFA, bebek biberonları, sert plastik su bardakları, yeniden doldurulabilen plastik damacanalar, yeniden kullanılabilir besin kapları, tıbbi cihazlar ve plastik gıda ambalaj malzemelerinde bulunabilen bir maddedir. Avrupa Gıda Kurumu (EFSA) ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından tolere edilebilir günlük alım sınırları içerisindeki BFA'nın vücuttan hızla atılabileceği sınırlar standartlaştırılmış olup, polikarbonat ürünlerde litrede maksimum 0.02 mg BFA maddesi bulunmasına müsaade edilmektedir (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2008).

Alkil fenollerin balık dokularında ölçülmesi, nehirlerimizde alkilfenol varlığını göstermektedir. Gerek literatür gerekse laboratuar çalışmaları göstermektedir ki, alkil fenoller ve özellikle NF canlı dokularda biyolojik birikime neden olmaktadır. Biyolojik birikim, biokonsantrasyon faktörü olarak ölçülmektedir ve dokularda ölçülen alkil fenol miktarının, sudaki miktarına oranı olarak hesap edilmektedir. Literatürde biokonsantrasyon faktörünün 1 ile 1000 arasında değiştiği rapor edilmektedir. Laboratuarda yapılan deneylerde ise NF'nin, balıkların karaciğerinde patolojik ve biyokimyasal bozukluklara neden olduğu ortaya konmuştur (Uğuz ve ark., 2003).

Vivacqua ve arkadaşları (2003), BFA ve NF'nin her ikisinin de iyonik olmayan yüzey aktif maddesi ürünlerine parçalanarak östrojen reseptörü alpha (ER-α)'yi aktive ederek östrojen bağımlı gen ekspresyonuna sebep olduklarını ve östrojene duyarlı meme kanseri hücreleri MCF7'nin büyümesini uyardıklarını belirtmiştir.

Lee ve arkadaşları (2003, 2004) antijenle uyarılmış fare T-hücreleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada; BFA, NF ve 4-tert-octylphenol (OF) ün T hücrelerinin alerjik duyarlılığını arttırdığını, interleukin-4 (IL-4)'te mRNA seviyelerinde bir artış şeklinde ölçerek göstermişlerdir. Fare ve insanlardaki IL-4 promoterı, aktive edilmiş T-hücrelerin nükleer faktörü (nuclear factor of activated Tcells (NF-AT) adı verilen transkripsiyon faktörü için çok sayıda bağlanma bölgesi içermektedir (Lee ve ark.. 2004). BFA, OF ve NF'nin, kalsiyum bağımlı kalsinerin sinyal yolunu uyararak IL-4 üretimini arttırdığı görülmüştür. Bu olay sitoplazmik NF-AT'nin, transkripsiyon faktörünün çekirdeğe sonraki translokasyonuyla defosforilasyonuna sebep olmaktadır.

Hung ve arkadaşları (2009), EDC'lerin, çevreyle ilişkili bağışıklık sistemi düzenleyici hücre tipi olan insan dendritik hücrelerinin fonksiyonlarını düzenlediği hipotezini test etmişlerdir. Araştırma sonuçlarına göre NF ve OF'nin mDC (miyeloid dendritik hücreler)'lerdeki östrojen reseptörlerinde, MKK3/6-p38 MAPK sinyal yollarında ve histon modifikasyonlarında, t-hücrelerindeki sitokin cevapları üzerinde fonksiyonel etkileri olduğunu belirtmişlerdir.

Ho ve arkadaşları (2006), hormonsal olarak aktif olan östrojenlere, özellikle BFA'ya, düşük seviyelerde maruz kalmanın insandaki prostat kanseri gibi hastalıklara yakalanmada arttırıcı bir etkisi olup olmadığını araştırmışlardır. Araştırma sonucunda çevredeki oranlarına eşdeğer miktarlarda düşük dozlarda BFA'ya veya estradiole maruz kalan ratlarda, prostat kanserine yol açabilen kanser öncesi lezyon ve hormonsal karsinogenezlerde artış olduğu gözlenmiştir.

Tsutsumi ve arkadaşları (2001), fungal ligninolitik MnP ve lakkaz enzimleri ile muamele ettikleri BFA ve NF'de meydana gelen değişimdeki hormonsal aktivite değişimini araştırmışlar, 1 saatlik MnP enzim muamelesi sonucunda BFA'nın büyük

kısmının parçalandığını, lakkaz enzimi ile muamele edilmesi sonucunda %70'nin parçalandığını belirtmektedirler. Enzim muamelesi sonucunda oluşan ürünlerin hormonsal aktivitesindeki değişimin belirlenmesi için yapılan çalışmada BFA'nın MnP ile muamelesi sonucunda 1. saatte %60, lakkaz ile 1 saatlik muamelede %40 hormonal aktivite azalmasının olduğu belirtilmiştir.

Mutajenleri tanımlama kansere neden olma ve gelecek nesillerdeki olumsuz değişmelere neden olabilecek hücre sayısına zarar verme potansiyelinden dolayı özellikle önemlidir.

Bundan dolaydır ki, NF ve BFA'nın mutasyona etkisini belirleyebilmek için, mutasyonlar hakkında kısaca bilgi vermek gerekmektedir.

2.2. MUTASYON

Genetik şifrenin bulunduğu DNA'da kendiliğinden veya çeşitli etkenlere bağlı olarak meydana gelen kalıtsal değişikliklere mutasyon denir. Mutasyonu taşıyan hücreye veya bireye mutant, mutasyona neden olan faktörlere de mutajen adı verilmektedir (Yıldırım ve ark., 2007).

Genetikçiler, mutasyonun neden olduğu iki farklı düzeyi belirlemiştir. Gen mutasyonunda bir gen aleli değişerek farklı bir alel olabilir. Böyle bir değişim tek bir gen içinde olduğu için ve bir kromozomal lokusta haritalandığından gen mutasyonuna, nokta mutasyonu da denir. Soya çekimsel diğer değişim düzeyi kromozom mutasyonu olup, kromozom segmentleri, bütün kromozomların ve hatta kromozomun tüm takımının değişimi anlamında kullanılır. Başka bir ifadeyle,

kromozom mutasyonları, sayısal kromozom mutasyonları ya da yapısal kromozom mutasyonları olarak tanımlanabilir (Bozcuk, A., 2005).

2.2.1. Kromozomların Yapısının Değişmesi

Genel olarak kromozomlar ya kendiliğinden ya da iyonize edici radyasyon, fiziksel stres ve kimyasal bileşiklerle kırılabilir. Kromozomal kırılmalar ya kromotit ya da kromozom düzeyinde olur (Bozcuk, A., 2005). Bazen kromatitler krossing-over olmadan parça değişimine, yitirilmesine ve kazanılmasına sahip olabilir. Bu değişimler genel olarak şöyledir:

Delesyon: Kromozomun bir kısmının koparak yitirilmesidir.
Duplikasyon: Bir kromozomun herhangi bir parçayı fazla sayıda taşımasıdır.
İnversiyon: Bir kromozomun içinden kopan bir parçanın dönerek koptuğu yere ters yönde tekrar bağlanmasıdır.
Translokasyon: Bir kromozomun kaybolan bir parçasının diğer bir kromozoma yapışmasıdır.

2.2.2. Kromozomların Sayısının Değişmesi

Kromozomlar bazen mitoz ve mayoz bölünme sırasında düzenli olarak ayrılmayabilir ve kromozom sayısı bakımından farklı hücreler meydana getirebilirler.

- **Aneuploidi (Anöployidi)**

Kromozomlardan bir veya birkaçının sayıca değişmesine denir.

a. Monozomi: Diploid bir fertle tek bir kromozom eksik olması olayıdır.

b. Nullizomi: Bir canlıda bir kromozomun, homoloğu ile beraber eksik olmasıdır.

c. **Polizomi:** Bir takımda bulunan kromozomlardan birinin veya birkaçının sayısını yükseltmesi olayıdır.

- **Euploidi (öyployidi)**

Tüm kromozom sayısının haploit veya tam katlar halinde artmasıdır. Bazen de diploit kromozomların yarı sayısını içermesidir. Değişik şekilleri vardır.

a. Monoploidi: Bir türün orijinal kromozom takımının yarısına sahip olma durumuna monoploidi, bu bireylere de monoploid adı verilir.

b. Poliploidi: Bireyin sahip olduğu genomdaki kromozom sayısının birden 3n, 4n, 5n, 6n şeklinde kromozom takımının bulunmasıdır (Temizkan, 1994; Baydar, 2002).

2.2.3. Gen Mutasyonlarının Özellikleri ve Çeşitleri

Bir genin genomdaki sayısının ve yerinin değişmeksizin yapısının değişmesidir. Kromozom yapısında herhangi bir değişikliğe neden olmaz (Demirsoy, 2005).

Genetik şifre triplet adı verilen üçlü nükleotid gruplarından meydana geldiği ve her triplette bir amino asiti kodladığı için (sonlanma kodonları hariç), gen dizilerinde oluşan herhangi bir değişiklik şifrelenen bilgiyi bozabilmektedir. Şifrede değişikliklere neden olan çeşitli tipte gen mutasyonları vardır. Bunlar;

2.2.3.1. Baz Değişimi Mutasyonları

Bir gen bölgesi içinde bir bazın farklı bir bazla yer değiştirmesi ile meydana gelen mutasyonlardır. Bu tip mutasyonlarda bazların değişimi iki şekilde gerçekleşebilir. Primidin bazının yine bir primidinle veya pürin bazının yine bir pürinle yer değiştirmesi transisyon (karşılıklı geçiş) mutasyonu olarak ve bir primidinin bir pürinle karşılıklı yer değiştirmesi ise transversiyon (çapraz geçiş) mutasyonu olarak adlandırılır.

Genlerin kodlama yapan dizilerinde meydana gelen transisyon veya transversiyon mutasyonlarının tripletlerde değişime, dolayısıyla amino asit değişikliğine neden olması bazen ciddi sorunlar yaratabilmektedir. Nokta mutasyonlarının çoğu kendiliğinden ortaya çıksa da bazı mutajenik kimyasal maddeler ve radyasyon gibi faktörlerin spontane mutasyon oranını artırıcı rol oynadıkları bilinmektedir.

2.2.3.2. Sessiz, Yanlış Anlamlı ve Anlamsız Mutasyonlar

DNA bazlarında meydana gelen her türlü değişiklik mutasyon olarak kabul edilirse de, saptanabilir bir fenotipik etki oluşturmayan tipte mutasyonlarda mevcuttur. Bu mutasyonlar gen ürününün yapısını ve aktivitesine değiştirmedikleri için sessiz (silent) mutasyon olarak adlandırılır. Tripletlerin anlamlarının değişmesine ve proteini yapısına farklı bir amino asit katılmasına neden olan nokta mutasyonlarına yanlış anlamlı (missense) mutasyon denir.

Gen mutasyonları bazen bir tripletin hiçbir amino asiti şifrelemeyip, dur anlamına gelen tripletlere (UAA, UAG, UGA) dönüşmesine neden olabilmektedir ki bu tip mutasyona da anlamsız (nonsense) mutasyon denir.

2.2.3.3. Çerçeve Kayması Mutasyonları

DNA'daki bazlara üç ve üçün katları olmayan sayıda insersiyon ya da delesyonlar sonucunda tripletlerin değişmesine yol açan mutasyonlara çerçeve kayması (frame-shift) mutasyonları adı verilir. Bu tip mutasyonlar eklenen/eksilen baz sayısına ve insersiyon/delesyon pozisyonuna bağlı olarak son derece dramatik sonuçlar doğurabilir (Yıldırım, 2007).

Gen mutasyonlarının çok çeşitli oluşu nedeniyle çok değişik sınıflandırmaları yapılmakta ve bir mutasyon bazen birden fazla kategoride yer alabilmektedir. Bu mutasyonlar;

Spontane ve Uyarılmış Mutasyonlar

Doğal ortamda ve belirgin bir mutajenik faktörün etkisi olmadan kendiliğinden meydana gelen mutasyonlara 'spontane mutasyonlar' denir. Mutasyon yapıcı faktörler kullanılarak laboratuar ortamında yapay olarak oluşturulan mutasyonlara ise 'uyarılmış mutasyonlar' denir.

Somatik ve Gametik Mutasyonlar

Eşeyli üreyen çok hücreli organizmalarda mutasyonlar değişikliğin görüldüğü hücre tipine bağlı olarak ikiye ayrılır. Vücut hücrelerinde meydana gelen mutasyonlara 'somatik mutasyonlar', üreme hücrelerinde meydana gelen mutasyonlara ise 'gametik mutasyonlar' adı verilir.

Morfolojik Mutasyonlar

Organizmanın dış görünümünü etkileyen mutasyonlara morfolojik mutasyonlar adı verilir.

Biyokimyasal Mutasyonlar

Bir organizmanın herhangi bir biyokimyasal veya sentez reaksiyonunu gerçekleştiremez duruma gelmesine neden olan mutasyonlara biyokimyasal mutasyonlar denir.

Letal (Öldürücü) Mutasyonlar

Ölüme yol açan tipteki mutasyonlara letal mutasyonlar denir. Bu mutasyonlar genel olarak hayati önemi olan genlerde görülmektedir.

Koşullu Mutasyonlar

Etkisi sadece belirli şartlarda görülen mutasyonlara denir.

2.3. Mutajenik Faktörler

Geni, depolanmış kimyasal bilgiyi temsil eden nükleotid çiftlerinin doğrusal bir dizisi olarak değerlendirmek kolaydır. Genetik şifre üçlü (triplet) olduğundan üç nükleotidin her dizisi, ilgili proteinde tek bir aminoasidi belirler. Bu dizileri veya şifrelenen bilgiyi bazen herhangi bir değişiklik mutasyon için yeterlidir. En az karmaşık olan değişiklik bir nükleotidin bir nükleotidle yer değiştirmesidir. Bunlar daha uygun olarak baz yer değiştirmeleri veya nokta mutasyonları olarak adlandırılan mutasyonlara analogdur. Temel olarak mutasyon oluşturabilen faktörler üç ayrı grupta; fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere sınıflandırılabilir.

Fiziksel etmenler arasında ultraviyole (UV) ve X ışınları sayılabilir. DNA molekülleri 250-260 nm olan UV ışınlarını spesifik olarak absorbe eder. Bu ışınlara maruz kalan DNA moleküllerinde mutasyon oluşur. Biyolojik mutajenler olarak virüsler ve transposibil elementler bilinmektedir. Virüs genomu konak hücrelerin DNA'sına girdiğinde kendi DNA'sından da bazı genleri konak DNA'ya aktarmakta veya ayrılırken beraberinde bir parçayı da götürmektedir. Kimyasal mutajenler ise etki biçimlerine göre 5 alt grupta incelenebilir. Bunlar;

Baz Analogları

Nükleik asit biyosentezi sırasında, pürin ve piri midinler yerine geçebilen moleküllere baz analogları denir ve bunlar genellikle mutajenik kimyasallardır.

Akridin Ajanlar

Hardal gazları alkilleyici ajanlardır. Nükleotidlerin amino veya keto gruplarına $-CH_3$ veya CH_3-CH_2- gibi bir alkil grubu eklerler. Baz analoglarında olduğu gibi, baz eşleşme yatkınlıkları değiştirilmiş ve sonuçta transisyon mutasyonlar 'akridin boyaları' adını alan kimyasal mutajenler çerçeve kayması mutasyonlarına neden olur.

Apürinik Bölgeler ve Diğer Lezyonlar

Mutasyonun diğer bir tipi de, sağlıklı bir çift-sarmal DNA molekülündeki azotlu bazlardan birinin, genellikle guanin ya da adeninin, spontane olarak kaydedilmesiyle ilgilidir. Pürin halkasının 9 nolu azotu ile deoksiribozun 1 nolu karbonu arasındaki glikozidik bağın kırılmasıyla oluşan bu bölgelere "Apürinik Bölgeler" (AP bölgeler) denir. Bir AP bölgede bir bazın yokluğu, eğer ilgili zincir transkripsiyon ve translasyona uğramaktaysa genetik kodu değiştirecektir. Eğer replikasyon olursa, AP bölge kalıp olarak uygun olmayacak ve replikasyonun durmasına neden olabilecektir. Eğer yapıya bir nükleotid girmişse, bu nükleotid genellikle yanlıştır ve diğer bir mutasyonun oluşmasına neden olur.

Tautomerik Değişmeler

Pürin ve pirimidinlerin tautomerik formlarda yani azotlu bir bazın her birinin, molekülde sadece tek bir protonun kayması ile farklılık gösteren, yapısal izomerler olarak adlandırılan alternatif kimyasal formları halinde bulunabileceğini ileri sürülmüştür. Biyolojik bir öneme sahip olan tautomerler, sitozin ve adeninin amino-

imino formları ile timin ve guaninin keto-enol formlarını içerir. Bu tür bir kayma molekülün bağ özelliğini değiştireceğinden, tautomerik kaymaların baz çifti değişmelerine veya mutasyonlara yol açacağı ileri sürülür.

Ultraviyole Radyasyonu ve Timin Dimerleri

UV radyasyonunun zararlı etkisi, özellikle iki timin bazı arasında dimerlerin oluştuğu pirimidinler üzerindedir. Sitozin-sitozin ve timin-sitozin dimerleri de oluşabilir, fakat sayıları daha azdır. Dimerler DNA konformasyonunu bozar ve normal replikasyonu durdurur. Replikasyonun durması, UV radyasyonunun mikroorganizmalar üzerindeki öldürücü etkisinin sorumlusu olarak görülmektedir (Klug, 2002).

2.4. DNA Onarım Mekanizmaları

Spontane ya da indüklenen mutasyonlar DNA'da hasara sebep olmaktadır. Bu hasar eğer giderilmezse replikasyon yoluyla aktarılabilir. Bunun sonucu olarak mutant hücre ya da organizmalar oluşur. Buna karşın, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde çeşitli onarım sistemleri gelişerek bu DNA hasarlarını giderme yolunda işlev görmektedir. Bilinen DNA onarım mekanizmaları şunlardır (Yüksel, 2005);

2.4.1. Fotoreaktivasyon

DNA fotoliyazları tarafından primidin dimerlerinin siklobütan halkasının koparılması, orijinal DNA yapısını yeniden oluşturur. Fotoliyazlar, reaksiyona enerji sağlamak için mavi ışık absorblayan kromatoforlara sahiptir. Fotoreaktivasyon

primidin dimerleri için özeldir. Bu bir lezyonun doğrudan tersine çevirme örneğidir ve hatasızdır.

2.4.2. Alkil transferaz

Hatasızca doğrudan tersine çevirmenin diğer örneği alkilleyici ajanlara adaptif cevabın bir kısmını oluşturur. Mutajenik koruma, doğrudan mutajenik O^6-alkilguaninden (timinle baz çifti yapabilen) alkil grubu uzaklaştıran bir alkil transferazla sağlanır.

2.4.3. Kesip-çıkarma Tamiri

Her yerde mevcut olan bu mekanizma, çok çeşitli lezyonlar üzerinde çalışır ve aslında hatasızdır. Nükleotid kesip-çıkarma onarımı (NER) ve baz kesip-çıkarma onarımı (BER) olmak üzere iki formu vardır. NER'de bir endonükleaz lezyonun her bir tarafındaki belirli sayıdaki bazları DNA'dan koparır. BER'de modifiye bazlar, değişmiş baz ve şeker arasındaki N-glikozilik bağı koparark apürinik veya aprimidinik (AP) yerleri bırakan spesifik DNA glikozilazlar tarafından teşhis edilir.

2.4.4. Yanlış Eşleşme Onarımı

Kesip-çıkarmanın özel bir formu olan yanlış eşleşme onarımı, replikasyon sırasında ve düzeltme okumasından kaçmış olan herhangi bir yanlış baz eşleşmesi ile ilgilenir (Konuk, 2004).

2.4.5. SOS Onarımı

SOS cevaptaki reaksiyonlar, E.Coli'de onarım için temel enzim olan RecA proteini ile LexA baskılayıcısının etkileşimiyle gerçekleşir. Cevabın başlangıç aşaması zarar verici uygulama tarafından RecA'nın aktif duruma geçirilmesidir. RecA ve LexA, SOS devresinde karşılıklı hedeflerdir. RecA, LexA'nın kesilmesini sağlayarak onun baskılayıcı etkisini yok eder; LexA ise hem RecA hem de kendi geninin anlatımını baskılar. Bu nedenle SOS cevap RecA ve LexA proteinlerinde artışa yol açar (Temizkan, 1994).

2.5. BİYOTRANSFOMASYON

Vücuda giren ksenobiyotiklerin enzim etkisiyle kimyasal değişikliğe uğrayarak yıkım ürünlerine (metabolit) dönüşmesine 'biyotransformasyon' denir. Biyotransformasyonla toksik maddelerin daha az etkili ya da etkisiz bileşiklere dönüşmesine 'detoksifikasyon' denir. Bazen biyotransformasyon sonucu daha aktif ya da toksik bileşikler oluşabilir. Bu durumda toksifikasyon (biyoaktivasyon) söz konusudur. Biyotransformasyon kapasitesi tür, nesil, cinsler arasında birçok farklılık göstermektedir. Bunun yanında yaş, cinsiyet, beslenme ve maruz kalınan diğer kimyasal maddeler de biyotransformasyonu etkileyebilir.

Biyotransformasyon için en önemli organ karaciğer olmakla birlikte akciğer, mide, barsak, cilt, böbrekler, burun mukozası ve gözde ksenobiyotiklere maruz kalan ve biyotransformasyon yapan organlardır (Ergun, 2008).

2.5.1. Mikrozomal Enzimler

Mikrozomal enzimler, o organı oluşturan hücrelerin düz endoplazmik retikuluma yerleşmişlerdir. Doku homejenatına çeşitli devirlerde santrifüj işlemi uygulanarak, endoplazmik retikulumun çöktürülmesiyle elde edilen pellete 'mikrozom' denir. Ultrasantrifüj bulunamazsa $CaCl_2$ ile çöktürülerek 10.000 devir/dk ile de elde edilebilir (Şahin, 2008). Mikrozom, hangi doku olursa olsun elde edilebilir. (karaciğer, böbrek, beyin v.b.) Endoplazmik retikulum'da (ER) bulunan ilaç metabolize edici enzimlere bu nedenle 'mikrozomal enzimler' adı verilir. Faz I reaksiyonlarında yer alan enzimler özellikle ER'de bulunurlar. Faz II konjugasyon enzim sistemleri ise çoğunlukla sitozoliktir. ER'de faz I reaksiyonu ile biyotransformasyona uğrayan bir ilaç aynı hücrenin sitozolik fraksiyonunda konjuge olur.

2.5.2. Faz I Reaksiyonları

Faz I reaksiyonları, oksidasyon (yükseltgenme), redüksiyon (indirgenme) ve hidrolizdir.

Oksidasyon

Karışık fonksiyonlu oksidasyonlar, birçok oksitlenme reaksiyonlarını kataliz ederler. Mikrozomal oksidasyon tiplerinden bazıları başlıklar halinde şunlardır:

a. Aromatik hidroksilasyon ve epoksit oluşumu
b. Dealkilasyon
c. N-dealilasyon
d. Oksidatif deaminasyon
e. Tersiyer azot oksidasyonu

Redüksiyon

Bu reaksiyonlar hem mikrozomal hem de sitolojik redüktazlar tarafından katalizlendiği gibi, redüktaz ihtiva eden barsak bakterileri tarafından da katalizlenebilir. Nitro, diazo, karbonil, disülfir, sülfoksit ve alkon gibi fonksiyonel gruplar organizmada indirgenebilir.

Hidroliz

Ester, amid veya substitüe ve fosfat ester bağını içeren ksenobiyotiklerin büyük bir kısmı organizmada hidrolizlenebilir. Esterler esterazlar tarafından, amidler ise amidazlar tarafından hidrolizlenirler.

2.5.3. Faz II 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 Faz I reaksiyonları sonucunda oluşan hidroksil gibi gruplara konjuge olabilir. Polar gruplar, yabancı molekülleri suda daha çözücü kılar ve böylece vücuttan uzaklaştırmayı kolaylaştırarak toksik etkide de bir azalmaya sebep olabilir (Korkmaz, 2005)

2.6. Mutajenite Test Yöntemleri

Kimyasalların, kullanılan yiyeceklerin ve gıda katkı maddelerinin insanda oluşturduğu mutajenite ve karsinojenite olgusunun belirlenmesinde bakterilerin

kullanımı yaygındır. Nedeni yaşayan tüm canlıların ortak genetik materyali DNA'nın primer yapısının aynı olmasına dayanır (Tüylü, 2001).

Memelilerde mutajenite testlerinin en önemli zorluğu, memelilerin mutajen maddelere az duyarlı olmalarıdır. Ayrıca deney hayvanlarının bakımı ve çoğaltılması zaman alıcı ve pahalıdır. Fakat buna karşın mikroorganizmalar mutajenlere karşı çok daha duyarlıdır. Kısa zamanda çok sayıda jenerasyon geçirdikleri için çalışmaları daha kolay ve ucuzdur. Mutajen maddelerin araştırılması için çeşitli uzun ve kısa zamanlı test yöntemleri geliştirilmiştir (Zeytinoğlu ve ark., 1998). Bunlardan bazıları şunlardır:

2.6.1. Sitogenetik Metodlar

Sitogenetik çalışmaları, çevresel olarak ya da çalışma ortamında klastojenlere ve radyasyona maruz kalan belirli popülasyonlar için, bireysel olarak etkilenme dozunu saptamak için kullanılabilmektedir (Tüylü, 2001) Bu yöntemlerden bazıları şunlardır;

Yapısal kromozom bozulma analizi, hücre bölünmesinin metafaz evresinde, kromozom hatalarını ortaya koyan bir yöntemdir.

Mikronukleus testi (MN), bazı mitoz anomalileri örneğin, kromozom kaybı gibi durumları ortaya koyar ve bölünme yeteneğine sahip olan tüm hücrelere uygulanabilir (Öztaş, 2005).

Comet (Single Cell Gel Elektrophoresis) testi, çapraz bağlanma, iplik kıvrılmaları, alkali labine site gibi DNA hasarlarını ve kesme çıkarma onarım

bölgelerindeki hataları bir jel sistemi kullanarak belirleyebilmektedir. Uygulamada kan lökositleri, mesane, yanak, mide, nasal ve sperm hücrelerindeki DNA hasarını belirlemek amacıyla kullanılmaktadır.

HPRT mutasyon yöntemi, somatik gen mutasyonlarının *in vivo* ortamda 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 yansıtma yeteneğine dayanır (Tüylü, 2001).

Kardeş kromatid değişimi (SCE) yöntemi, kardeş kromatidlerin birbirine kontrast sağlayacak şekilde boyanma prensibine dayanır. Kardeş kromatidlerde meydana gelen parça değişimi, boyanma farklılığına göre anlaşılır (Öztaş, 2005).

2.6.2. Bakteriyel Yöntemler

DNA çok farklı bölgelerde ve çeşitli mekanizmalarla hasara uğrayabilir. Bunun için hasarın direkt olarak gösterilmesi teknik olarak zordur. Fiziksel ya da kimyasal ajanların DNA'da meydana getirdiği bozukluk, bakteriyel mutasyonları ölçebilen kısa zamanlı testlerle saptanmaktadır. Bu testlerden bazıları şunlardır (Tüylü, 2001):

E.Coli ile Lac 1 mutasyon test sistemi, bakterilerde meydana gelen mutasyonların moleküler ve genetik analizinde kullanılan mutasyon yöntemi olup ilk kez 1983'te Miller ve arkadaşları tarafından *E.Coli*'de geliştirilmiştir.

UMU (SOS) test sistemi, kimyasal ajanların genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla kullanılan kolorimetrik, bakteriyel bir sistemdir. Bu sistem dolaysız bir

şekilde mutajenesisle ilgili olduğu düşünülen *umu* operonunun ifade edilme düzeyini saptamaya dayanır.

Genotoksik kimyasallar ile hem Ames hem de umu test sisteminde yapılan çalışmalar, umu testinin duyarlılığının Ames testine çok benzer 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.

2.6.2.1. Ames/*Salmonella*/Mikrozom Test Yöntemi

Çoğu kimyasallar insanlarla sürekli kontak halindedir. Ve bu kimyasalların her biri karsinojenik potansiyelleri için test edilmek zorundadır. Fakat çoğu testte hayvanlar içindeki modeller çok pahalı ve zaman tüketicidir. Çünkü çoğu karsinojenik kimyasallar DNA'ya zarar verir. Bu kimyasallar insanlar kadar bakteriler için de mutajeniktir. Eğer kimyasallar karsinojenik olma eğilimindelerse bakteriler tanımlanmak için ilk olarak kullanılabilir. Bu testlerin en yaygın kullanılanı 1970'lerin başında Bruce Ames ve onun çalışma arkadaşları tarafından geliştirilen Ames testidir. Bu test *Salmonella typhimirium*'un *his* mutasyonunun revertantları kullanılarak yapılır. Ortaya çıkan mutasyonlar için kimyasal eksik *Salmonella typhimirium*'un his^- mutantlarının histidin plaklarına yayılmasından ileri gelir. Eğer kimyasallar *his* mutasyonuyla geri dönüşümlü ise his^+ geri dönen koloni sayıları plak üstünde ve kimyasal üzerinde görülecektir. Hatta bu test çeşitli farklılıklarla daha hassas olarak geliştirilmiştir.

Bazı kimyasallar kendi kendilerine mutajenik değildir fakat memeli karaciğerindeki enzimler tarafından mutajen hale dönüştürülebilmektedirler. Bu bulunan mutajenlerin öncül göstergesi şudur: bir karaciğer bölümü sıçanlardan

plaklara eklenebilir ve o bölüm üzerindeki kimyasallar işaretlenebilir. Eğer o bölümdeki kimyasal mutajen olarak dönüşümlü ise *his*$^+$ geri dönüşümlü olarak plaklarda görülmektedir.

Kısaca deneyin amacı; daha önceden büyümesi için histidin amino asidine gereksinim duyan oksotrofik suşların, kullandığımız test maddesi ile tekrar histidin sentezleyebilir (prototrofik) hale dönüşmesi temeline dayanmaktadır (Synder ve Champness, 2007).

2.6.2.1.1. Ames/*Salmonella*/Mikrozom Test Yöntemi ile Yapılan Bazı Çalışmalar

Kimyasallarla yapılan bir çalışmada ilaç ham maddesi olarak kullanılması amaçlanan 2, 4, 5 tri- fenil imidazol ve dokuz türevinin Ames testi kullanılarak TA 98 ve TA 100 suşları yardımıyla mutajenik aktiviteleri tespit edilmiştir. Test bileşenleri TA 98 suşunda daha anlamlı sonuçlar vermiş, buna göre bileşenlerinin çerçeve kayması şeklinde direkt mutajenik etkili olduğu saptanmıştır (Ayaz, B., 1993)

Ames/*Salmonella*/mikrozom test sistemi kullanılarak Doğu Anadolu Bölgesinde yetişen ve tıbbi öneme sahip *Origanum vulgare, Artemisia absinthium, Achillea millefolium, Helychrysum pilicatum, Salvia nemerosa; Salvia verticillata*, *Nepeta racemosa* ve *Salvia limbata* bitki türlerinin antimutajenik ve antikarsinojenik özelliklerinin varlığı araştırılmıştır. *O.vulgare, A.absinthium, A.millefolium, H.pilicatum ve S.nemerosa; Salmonella typhimurium* TA 1535 suşunda doza bağlı olarak belli ölçülerde antimutajenik aktivite gösterirken, *Salmonella typhimurium* TA 1538 suşunda sadece *S.verticillata* ve *H.pilicatum* bitki ekstraktları yine doza bağlı olarak antimutajenik aktivite göstermiştir. Çalışılan *N.racemosa* ve *S.limbata* bitki ekstraktları ise her iki bakteri suşunda ve uygulanan her üç dozda da antimutajenik aktiviteye rastlanmamıştır (Özbek, T., 2006).

Diğer bir çalışmada, Ponceau 4R, Tartrazin, Indigotin, Cochineal Carmin, Sunset Yellow adlı gıda boyalarının mutajenik potansiyelleri *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile araştırılmıştır. Yapılan çalışmada, *Salmonella*/mikrozom test sisteminde *Salmonella typhimurium* TA 100 ve TA 102 suşları kullanılmıştır. S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda deneyler tekrar edilmiştir. Test edilen gıda boyalarından Ponceau 4R ve Sunset Yellow, S9 fraksiyonu yokluğunda mutajenik etki göstermiştir. S9 fraksiyonu yokluğunda, Ponceau 4R ve Sunset Yellow'un test edilen tüm konsantrasyonlarında geri dönen koloni sayısı negatif kontrol plağından fazla bulunmuştur. Diğer taraftan, S9 fraksiyonu yokluğunda Tartrazin, Indigotin ve Cochineal Carmin'de mutajenik aktivite gözlenmemiştir. Fare karaciğer enzimleri varlığında deneyler tekrarlandığında, Cochineal Carmin hariç test edilen gıda boyalarının tümünün mutajenik etkilere sahip olduğu belirlenmiştir. Test edilen gıda boyaları arasında, mutajenitesi en fazla olan Ponceau 4R ve Sunset Yellow'dur. Çalışmada mutajenik etkilerin belirlenmesinde kullanılan *Salmonella*/mikrozom test sistemiyle, test edilen gıda boyalarından Ponceau 4R, Tartrazin, Indigotin ve Sunset Yellow mutajenik maddelerdir (Öncül, Ö., 2009).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. MATERYAL

3.1.1 Kimyasal Maddeler

Magnezyum sülfat ($MgSO_4.7H_2O$) (Merck), Citric acid monohydrate ($C_6H_8O_7$) (Merck), Potassium phosphate dibasic (anhydrous) (K_2HPO_4) (Sigma), Sodium ammonium phosphate ($NaNH_4HPO_4.4H_2O$) (sigma-aldrich), L-Histidine.HCI (F.W. 191.7) (Applichem) , D- Biotin (F.W.247.3) (Supelco), Sodium chloride (NaCI) M: 58.44 g/mol, (Merck), DMSO (dimethyl sulfoxide) (C_2H_6OS) (Merck), Agar-Agar (Merck), Oxoid Nutrient Broth No:2 (Sigma), Glikoz (Merck), Ampicillin trihydrate (Sigma), Potasyum Klorür (KCI) (Merck), Magnezyum Klorür ($MgCl_2.6H_2O$) (Merck), Sodyum dihidrojen fosfat ($KH_2PO_4.H_2O$) (Merck), Disodyum hidrojen fosfat ($N_2HPO_4.7H_2O$) (Merck), β-NADP (F.W.765.4) (Applichem), Glucose-6-phosphate sodium salt ($C_6H_{12}O_9P.Na$) (Sigma), Sodium hydroxide (NaOH) (Merck), 2-Aminofluorene (Fluka), 4- Nitro-*o*-Fenilendiamine (Fluka), Sodyum Azid (Riedel)

3.1.2. *Salmonella typhimurium* Test Suşları

Deneyde kullanılan, *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşunun in vitro mutasyonlarla geliştirilmiş TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. Bu suşlar Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden sağlanmıştır. TA 98 suşu kodon kayması, TA 100 ise baz çifti dönüşümü tipindeki mutasyonların saptanmasında kullanılmıştır.

3.1.3. Deneyde Kullanılan Ortamların İçerikleri ve Hazırlanışı

Vogel-Bonner-E Ortamı (50XVB tuzları)

Kullanım: MGA ve HBA (master) plakları

	1000 ml
Magnezyum sülfat ($MgSO_4.7H_2O$)	10 gr
Sitrikasit monohidrat	100 gr
Potasyum fosfat (K_2HPO_4)	500 gr
Sodyum amonyum fosfat ($NaHNH_4 PO_4.4H_2O$)	175 gr
Distile su (45°C)	670 ml

Maddeler yukarıda yazıldıkları sıra ile distile suya ilave edildi. Son hacimlerine tamamlanıp otoklavda 110°C'de 20 dakika steril edilerek, oda sıcaklığında karanlıkta saklandı.

(0.5 mM) Histidin/Biyotin Solüsyonu

Kullanım: Mutajenite deneyi (90 ml top agara 10 ml olarak)

	250 ml için
D-Biyotin (F.W. 247.3)	0,0309 g
L-Histidin-HCl (F.W. 191.7)	0,024 g
Distile su	250 ml

Biyotin distile suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözüldü, daha sonra histidin ilave edilerek otoklavda 110°C'de 20 dakika veya 0.22 µm membran filtre ile steril edilerek, +4 °C'de saklandı.

Serum Fizyolojik

Kullanımı: Bakteri sulandırmada kullanıldı.

	500 ml
NaCl	4,5 g
Distile su	500 ml

(%0,1) Kristal Viyole Solüsyonu

Kullanım: Suşların kristal viyoleye duyarlılıkları, dolayısıyla rfa mutasyonunu taşıyıp taşımadıklarının kontrolü.

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

Kristal viyole ve distile su karıştırıldı ve solüsyon ışık geçirmeyen bir şişede +4 °C'de saklandı.

(% 0,13) Biyotin Çözeltisi

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

	100 ml
D-biyotin	0,0013 g
Distile su	100 ml

Biyotin distile suyun kaynama noktasına kadar ısıtılarak çözüldü. Otoklavda 110°C'de 20 dakika steril edilerek, +4°C'de saklandı.

(% 0.5) Histidin Çözeltisi

Kullanım: Genotip kontrolü ve HBA plakları hazırlanması

	100 ml
L-Histidin-HCl (F.W. 191.7)	0,5 g
Distile su	100 ml

Otoklavda 110°C'de 20 dakika steril edilerek, +4 °C'de saklandı.

(%20) Glikoz Çözeltisi

Kullanım: MGA ve HBA plakları hazırlanması

	100 ml
Glikoz	20 g
Distile su	100 ml

Glikoz distile su içinde tamamen çözülerek otoklavda 110°C'de 15 dakika steril edilerek, +4 °C'de saklandı.

(2 μg/μl) 2-Aminofluorene (2AF)

Kullanım: Pozitif kontrol

1.0 mg/petri başına olmak üzere dimetilsülfoksitde (DMSO) çözülerek kullanıldı.

	10 ml
2AF	0,02 g
DMSO	10 ml

+4 °C'de saklandı.

(2 μg/μl) 4- Nitro-*o*-Fenilendiamine (NPD)

Kullanım: Pozitif kontrol

200 μg/petri olmak üzere DMSO'da çözülerek kullanıldı.

	10 ml
NPD	0,02 g
DMSO	10 ml

Oda sıcaklığında saklandı.

(0.1 μg/μl) Sodyum Azid Çözeltisi

Kullanım: Pozitif kontrol

1.0 mg/petri başına olmak üzere distile suda çözülerek kullanıldı.

	100 ml
Sodyum azid	0,01 g
Distile su	100 ml

+4 °C'de saklandı.

Histidin/Biyotin/Ampisilin Plakları (HBA agar)

Kullanım: Ampisiline dirençlilik testi ve master plak hazırlanması

	1000 ml
Agar	15 g
Distile su	860 ml
50XVB tuzları	20 ml
% 20 glikoz	100 ml
Histidin HCl.H_2O	10 ml

0.5 mM Biyotin	6 ml
(%0.8/0.02 NaOH) Ampisilin	3150 µl

Agar ve distile su otoklavlandı, 45°C'ye soğutulup % 20 glikoz, 50XVB tuzları ve histidin bu sıcak solüsyona eklenip karıştırıldı ve biraz daha soğuyunca biyotin ve ampisilin eklenip plaklar petrilere 25 ml olarak aktarıldı. Bu plaklarda bakteriler 4°C'de 2 ay saklandı.

Minimal Glikoz Agar Plakları (MGA)

Kullanım: Mutajenite deneyi

	1000 ml
Agar	15 g
Distile su	880 ml
50X VB	20 ml
% 20 glikoz	100 ml

Agar ve distile su karıştırıldıktan sonra otoklava koyularak steril edildi. 45°C'ye soğutulup (20-30 dakika) % 20 glikoz ve 50XVB tuzları karıştırılıp petri kutularına 25 ml olarak dağıtıldı.

Top Agar

Kullanım: Mutasyon deneyi

	1000 ml
Agar	6 g
NaCl	5 g
Distile su	1000 ml

Agar, distile su ve tuz manyetik karıştırıcıda ısıtılarak ve karıştırılarak çözüldü ve otoklavda 110°C'de 20 dakika steril edildi. Oda sıcaklığında karanlıkta saklandı.

Nutrient Agar Plakları (NA)

Kullanım: Gecelik kültürün ml'sindeki bakteri sayısını bulma ve genotip kontrolü (a. Kristal viyole b. UV duyarlılığı)

	1000 ml
Oxoid nutrient broth no:2	25 g
Agar	15 g
Distile su	1000 ml

Agar, broth ve distile su 2 litrelik kapta karıştırılıp 110°C'de 20 dakika steril edildi ve petri kutularına 25 ml olacak şekilde aktarıldı.

Nutrient Broth Sıvı Kültür Ortamı (NB)

Kullanım: Bakterilerin gecelik kültürde büyütülmeleri

	200 ml
Oxoid nutrient broth no:2	5 gr
Distile su	200 ml

Broth ve distile su karıştırılıp otoklavda 110°C'de 20 dakika steril edildi. Oda sıcaklığında karanlıkta saklandı.

Tuz Çözeltisi (1.65 M KCl + 0.4 M $MgCl_2$)

Kullanım: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

	500 ml
Potasyum klorür (KCl)	61,5 g

Magnezyum klorür ($MgCl_2.6H_2O$)	40,7 g
Distile su	500 ml

110°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi. Oda sıcaklığında ya da +4°C'de saklandı.

0.2 M Sodyum-Fosfat Tamponu (pH=7,4)

Kullanım: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

Stok A ve stok B maddelerinden 250 ml ayrı ayrı hazırlandı.

	250 ml
Stok A: 0,2 M Sodyum dihidrojen fosfat ($KH_2PO_4.H_2O$)	6,8 g
Stok B: 0,2 M Disodyum hidrojen fosfat ($Na_2HPO_4.7H_2O$)	13,41 g
Distile su	250 ml

Stok A ve Stok B'den ayrı ayrı 250 ml hazırlanır. Daha sonra;

	600 ml
Stok A	57 ml
Stok B	243 ml
Distile su	son hacim 600 ml'ye tamamlandı.

Karışım pH 7,4'e ayarlandıktan sonra 110 °C'de 20 dakika otoklavda steril edildi. Oda sıcaklığında karanlıkta saklandı.

0,1 M β-NADP Çözeltisi

Kullanımı: Mutajenite deneyinde S9 karışımı

	10 ml
β-NADP (F.W. 765.4)	0,76 g
Steril distile su	10 ml

Sterilizasyon 0.22 μm delik çaplı filtre ile yapıldı. -20°C'de saklandı.

1 M Glikoz-6-Fosfat Çözeltisi

Kullanım: Mutajenite deneyi için S9 karışımı

	2,5 ml
Glikoz-6-fosfat	0,705 g
Steril distile su	2,5 ml

Sterilizasyon 0.22 μm delik çaplı filtrelerle yapıldı**.** -20°C'de saklandı.

S9 Karışımı (rat karaciğeri mikrozomal enzimleri + kofaktörler)

Kullanım: Mutajenite deneyi

	50 ml
Rat karaciğeri S9 fraksiyonu	2 ml
$MgCl_2$-KCl tuz çözeltisi	1 ml
1 M Glikoz-6-fosfat	250 μl
0.1 M β-NADP	2 ml
0.2 M fosfat tamponu pH=7.4	25 ml
Steril distile su	19,75 ml

Karışım, her zaman aşağıdan yukarıya doğru taze olarak ve yeterince hazırlandı. İçerikler daima buz içinde tutuldu.

(% 0.8/0.02 NaOH) Ampisilin Solüsyonu

Kullanım: Suşların ampisiline dirençlilik özelliğinin kontrolü ve R-faktör plazmidi taşıyan suşların master plakları

	100 ml için
Ampisilin trihidrat	0,8 gr
0.02 N Sodyum hidroksit	100 ml

Ampisilin trihidrat, 0.02 N NaOH içinde çözüldü ve sterilizasyon için 0.22 mμ çaplı filtreden geçirilerek, +4 °C'de saklandı.

0,02N NaOH Hazırlanışı

	250 ml
NaOH	0,2 g

Son hacim 250 ml'ye distile su ile tamamlandı.

3.2. METOD

3.2.1. *Salmonella typhimirium* Suşlarının Kültürlerinin ve Master Plaklarının Hazırlanması

- 80°C'de saklanan bakteri suşlarından erimeden bir öze yardımı ile kazıntı alındı ve TA 98 ve TA 100'ün HBA plaklarına çizgi ekimleri yapılıp 37 °C'de 48 saat inkübasyona bırakıldı. Sürenin sonunda iyi izole olmuş bir koloni seçilip, 2 ml NB ortamı içinde (TA 98 ve 100 için 6,3 μl ampisilin çözeltisi ilave edildi.) süspanse edilerek 16 saat 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde 140 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra platin öze ile bir öze dolusu sıvı kültür alınıp HBA üzerine çizgi ekim yapılarak plaklar 37 °C'de 48 saat inkübe edildi.

Bu plaklar +4°C'de 2 ay süre ile saklandı ve pasajlar yapıldı. Bu plaklar buzdolabında alüminyum folyoya sarılarak muhafaza edildi.

3.2.2. Bakterilerin Genotiplerinin Kontrol Edilmesi

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

3.2.2.1. Histidin gereksinimi kontrolü

Her test suşu, histidin operonunun değişik bölgelerinde çeşitli mutasyonlar içermektedir. Bunlar, ya çerçeve kayması ya da baz değişimleri mutasyonlarıdır. Bakterilerin MGA üzerine ekilmeleri sonucu *his*$^-$ bakteriler *his*$^+$'lardan ayırt edilir. Bu amaçla HBA'dan gecelik kültür hazırlandı. NB'de bir gece üretilen bakterilerden sabah MGA ve HB plaklarına çizgi ekim yapıldı. 37°C'de 48-72 saat inkübasyondan sonra HB plaklarında üreme gözlenirken MGA plaklarında üreme gözlenmedi. Böylece kullanacağımız bakterilerin his$^-$ mutasyonunu taşıdığı anlaşıldı.

3.2.2.2. *uvr*B mutasyonu kontrolü

*uvr*B mutasyonu, DNA'nın kesme-onarım-tamir mekanizmasından sorumlu uvr B genindeki delesyon sonucu oluşur. Bu kısımda normalde uvr B$^+$, chl$^+$ ve bio genleri bulunmaktadır. *uvr*B geni kesme-onarmada görevli bir enzimi kodlamaktadır.

Sonuçta bu enzimin yokluğunda mutant suşu değişik mutajenlere karşı daha hassas hale gelmektedir (Yüksel, 2005).

Bu mutasyonun varlığı UV ışınlarına duyarlılık testi ile tespit edildi. Bu test için, gecelik kültür hazırlandı. NB'de bir gece büyütülen bakteri kültüründen 1 öze dolusu alınıp NA plağının tamamına paralel ekim yapıldı. Plağın yarısı (çizgileri kesecek şekilde) plastik bir plaka ile kapatılıp 15 watt gücünde bir UV lambası ile 33 cm yüksekten 8 sn süre ile ışınlandı. Işınlanmadan sonra petri kapakları kapatılıp 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. Bu sürecin sonunda UV'ye maruz kalan kısımda üreme olmazken, plastik kapakla kapatılan kısımda normal bir üreme gözlendi. Bu da bize kullanılacak bakterilerin *uvr*B mutasyonu taşıdığını gösterdi.

3.2.2.3. Rfa mutasyonu kontrolü

Rfa mutasyonu, hücre yüzeyini saran lipopolisakkarit tabakasını zayıflatarak normalde hücre içine giremeyen büyük moleküllerin hücre içine girmelerini sağlar (Yüksel, 2005).

Bu test için gecelik kültür hazırlandı, sabah NB'de bir gece büyütülen bakteri kültüründen 0,1 ml sıvı kültür alınarak, 45°C su banyosunda tutulan 2 ml top agar üzerine ilave edilip daha sonra NA plaklarına dökülerek plaklara 8 işareti yapılarak dağıtıldı. 10 dk. donması beklendikten sonra plağın ortasına 0,5 cm çaplı steril filtre kağıdı diski yerleştirilip diskin ortasına %0.1'lik kristal viyole karışımından 10 µl damlatıldı. Kağıdın boyayı emmesi beklendi, sonra plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda disk çevresinde 14 mm'lik üreme olmayan zon gözlendi.

Bu zonda, boya maddesi bakterilerin içine kolayca girip etkilediği bakterilerin üremesini engellediği için bakterilerin Rfa mutasyonunu taşıdıkları anlaşıldı.

3.2.2.4. R-faktör varlığı kontrolü

pKM101 ampisilin dirençlilik geni taşıyan, hücrede çok sayıda bulunan bir plazmiddir. Bu plazmidin hücrede bulunuşu, bu hücrelerde normalde bulunan, hata frekansı yüksek olan DNA onarım mekanizmasını aktif hale getirir. Sonuç olarak, kimyasalların etkisiyle veya spontan olarak mutasyonların artmasına neden olabilir (Yüksel, 2005).

Test bakterilerinin içerdiği, R-faktör taşıyan pKM 101 plazmidlerinin kaybolup kaybolmadıkları, ampisiline dirençliliğinin ölçülmesi ile tespit edildi. Bu amaçla, büyütülen NB içinde bakteri kültürü (%0,8 Ampisilin/0.02 M NaOH) ampisilin içeren HBA plaklarına çizgi ekim yapıldı, 37 °C'de 24 saat inkübasyonu sonunda, plazmid içeren mutant bakterilerin ampisilinli ortamda büyüdükleri gözlendi. Yani bakteriler R-faktör plazmidini içermektedir.

3.2.2.5. Spontan olarak geriye dönüş sıklığının kontrolü

Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden (spontan) his^- durumundan his^+ durumuna dönüşmesi, belirli sınırlar içinde mümkündür. Hazırlanmış olan gecelik kültürlerden 16 saat sonunda 500 µl alınıp 20 ml taze kültür hazırlandı. 110 rpm'de çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi ve bu kültürler 5., 6. ve 7. saatlerde çalışıldı. Top agar otoklavdan çıktıktan sonra içerisine 90 ml'ye 10 ml histidin/biyotin (HB) solüsyonu ilave edildi. Daha sonra tüplere 2'şer ml olarak dağıtıldı. Bu test için, 37°C'de, NB'da büyütülen bir gecelik bakteri kültüründen 0,1 ml alınıp, 45°C'deki su banyosunda tutulan top agar üzerine ilave edildi. Daha sonra test tüpü yavaşça çalkalanarak MGA plaklarına yayıldı ve 37°C'de 48-72 saat inkübe edilerek plaklarda üreyen koloniler sayıldı. Spontane olarak geriye dönüş kontrolünde saatli

çalışıldı. Taze kültür hazırlandıktan 5., 6. ve 7. saat sonra aynı çalışma tekrar edildi. Sayılan koloniler TA98 için ortalama 32 koloni olarak, TA100 için ise 121 koloni olarak bulundu.

Tablo.1. *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşlarının kendiliginden (spontan) *his*$^-$ durumundan *his*$^+$ durumuna dönüşmesi durumundaki bakteri sayıları

Salmonella typhimurium **suşları**	**S9'suz**	**S9'lu**
TA98	**20-50 revertant/plak**	**20-50 revertant/plak**
TA100	**75-200 revertant/plak**	**75-200 revertant/plak**

3.2.3. Test Maddelerinin ve Dozlarının Hazırlanışı

BFA ve NF'den 6'şar doz hazırlandı. BFA'dan 0,1g tartıldı ve 1 ml DMSO içinde çözüldü, NF'den de 0,01g tartıldı ve 10 ml DMSO içinde çözüldü. Bu şekilde 10^0 'lık tüp elde edildi. Yani 10000 µg/plak lık konsantrasyon hazırlanmış oldu. Vortekslenerek bu tüpten 100 µl alındı ve 900µl DMSO içerisinde çözülerek 10^{-1} konsantrasyonu hazırlanmış oldu. Uygulanacak dozları belirlemek için test maddelerinin 0,1 µg/plak; 1 µg/plak; 10 µg/plak; 100 µg/plak; 1000 µg/plak ve 10000 µg/plak konsantrasyonları hazırlandı.

3.2.4. Test Maddelerinin Sitotoksik Etkilerinin Saptanması

Kullanılan test bileşiklerinin, test bakterileri için öldürücü dozunun saptanması amacıyla 2 ml top agara 0,1 ml bakteri kültürü ve 0,1 ml değişik konsantrasyonlarda test bileşiği ilave edilmiştir. NF ve BFA için test bileşiklerinin 0,1µg/plak; 1µg/plak; 10µg/plak; 100µg/plak; 1000µg/plak ve 10000µg/plak konsantrasyonları test tüpüne eklenmiştir. Tüpteki karışım 3 ayrı NA plağına dökülerek plaklar 37°C'de 24 saat

inkübe edildi, inkübasyondan sonra plaklardaki ortalama koloni sayısı belirlendi ve kontrol plakları ile karşılaştırılarak toksik ve toksik olmayan dozlar belirlendi.

Eğer plaklarda kontrol grubundan az koloni varsa toksik, kontrol grubundan çok koloni varsa ya da eşitse toksik değil denir. Çalışmada toksik olmayan 100 µg/plak (10^{-2}); 10 µg/plak (10^{-3}); 1 µg/plak (10^{-4}) ve 0,1 µg/plak (10^{-5}) doz miktarları kullanıldı.

3.2.5. Ames Mutajenite Testinin Yapılışı

3.2.5.1. S9'suz deneyin yapılması

S9'suz yani metabolik aktivasyonsuz yapılan deneyde, içlerine 0,25 ml histidin biyotin çözeltisi ilave edilmiş 2 ml'lik top agar içeren deney tüpleri 45°C'lik su banyosunda ısıtılıp içlerine 0,1 ml test maddesi ve 0,1 ml 5 saatlik taze bakteri kültürü eklenmiştir. Tüpler çalkalanarak 37 °C'ye ısıtılmış MGA plaklarına dökülmüş, plaklara hızla 8 işareti yaptırılarak top agarın plak üzerine homojen dağılması sağlanmıştır. 15 dakika donması beklendikten sonra plaklar ters çevrilerek 37°C'lik etüvde 48-72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda petrilerdeki koloniler sayılmıştır.

Çalışmada herbir doz için 3 ayrı plak hazırlanmış ve iki bağımsız deney yapılmıştır. Sonuçların değerlendirilebilmesi için deneylere paralel olarak spontan kontrol, solvent kontrol (DMSO) ve pozitif (diagnostik) kontrol olarak TA 100 suşu için 0,1 µg/µl sodyum azid (NaN_3), TA 98 suşu için ise 2 µg/µl 4-nitro-ofenilendiamine (NPD) kullanılmıştır.

3.2.5.2. S9'lu deneyin yapılması

S9'lu yani metabolik aktivasyonlu deneyde, test bileşiği, bakteriyel test suşu, S9 karışımı top agara karıştırılarak MGA plaklarına dökülmüştür. Plaklar 37°C'de 48-72 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda plaklardaki his^+ revertant bakteri kolonileri sayılmıştır. Bu yöntemde, 0,25 ml histidin biyotin solüsyonu eklenmiş 45°C'deki 2 ml'lik top agara, test suşu kültüründen 0,1 ml, test edilecek kimyasaldan 0,1 ml ve S9 karışımından 0,5 ml eklenip düşük hızda 3 saniye vortekslenerek oda sıcaklığındaki MGA plaklarına yayılmıştır. Top agarın plağın bütün yüzeyine donmadan yayılmasını sağlamak için karıştırma, dökme ve yayma işleminin tümü, 20 saniyeden az bir sürede yapılmıştır. Her deneyde, her suşun geri dönme özgüllüklerini ve S9 karışımının etkisini doğrulamak için pozitif mutajen olarak TA 100 suşu için 0,1 µg/µl sodyum azid, TA 98 suşu için 2 µg/µl 2- aminofluorene (2AF) kullanılarak rutin olarak, pozitif mutajenik etki kontrolleri yapılmıştır. Bakteriyi, S9 karışımını ve kullanılan çözücüyü içeren fakat test edilen kimyasalı içermeyen negatif kontrol plakları her suş için kendiliğinden geriye dönen bakteri sayısının saptanmasında kullanılmıştır. Deney her doz için 3 ayrı plak uygulanarak yapılmıştır.

Sonuçların istatistiksel analizi için, SPSS 17.0 for Windows paket programında One- Way ANOVA Testi ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada NF ve BFA'nın mutajenik aktivitesi *S. typhimurium*'un TA 98 ve TA 100 mutant suşları ile araştırılmıştır.

4.1. NF ve BFA'nın Sitotoksik Dozlarının Saptanması

Sitotoksik doz belirlenirken *S. typhimurium*'un TA100 suşu kullanıldı. Her dozdan 6'şar plak kullanılarak deney yapıldı.

4.1.1. NF'nin Sitotoksik Dozunun Belirlenmesi

NF'nin sitotoksik dozu belirlenirken 0,01g NF 10 ml DMSO içinde çözüldü. Bu oran 10000 µg/plak doz miktarı olarak belirlendi.

Tablo. 2. NF'nin *Salmonella typhimurium*'un TA100 suşu ile denenen sitotoksik doz deneyi sonuçları

Denenen Doz Miktarları µg/plak	**Koloni Sayıları**
Kontrol	± 90
(+) Kontrol	Sayılamayacak kadar çok
(-) Kontrol	±75
0,1 µg/plak (10^{-5})	± 156
1 µg/plak (10^{-4})	± 127
10 µg/plak (10^{-3})	± 88
100 µg/plak (10^{-2})	± 78
1000 µg/plak (10^{-1})	Üreme yok
10000 µg/plak (10^{0})	Üreme yok

Sonuç olarak, NF'nin 10000 µg/ml, 1000 µg/ml dozlarının toksik olduğuna karar verilmiştir.

4.1.2. BFA' nın Sitotoksik Dozunun Belirlenmesi

BFA'nın sitotoksik dozu belirlenirken 0,1 g BFA 1000 µl DMSO içinde çözüldü. Bu oran 10000 µg/plak doz miktarı olarak belirlendi.

Tablo. 3. BFA'nın *Salmonella typhimurium*'un TA100 suşu ile denenen sitotoksik doz deneyi sonuçları

Denenen Doz Miktarları µg/plak	**Koloni Sayıları**
Kontrol	± 90
(+) Kontrol	Sayılamayacak kadar çok
(-) Kontrol	±110
0,1 µg/plak (10^{-5})	± 159
1 µg/plak (10^{-4})	± 145
10 µg/plak (10^{-3})	± 138
100 µg/plak (10^{-2})	± 112
1000 µg/plak (10^{-1})	Üreme yok
10000 µg/plak (100)	Üreme yok

Sonuç olarak BFA'nın 10000 µg/ml, 1000 µg/ml dozlarının toksik olduğuna karar verilmiştir.

4.2. NFve BFA'nın S9'lu ve S9'suz Deneyinin Yapılması

S9'lu ve S9'suz deney, *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşlarıyla toksik olmayan dozlar kullanılarak ve her bir dozdan 3'er plak kullanılarak deney yapılmıştır.

Tablo.4. *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşları ile denenen nonilfenol ve bisfenol A'nın (S9 fraksiyonu varlığında ve yokluğunda) plak inkorporasyon deneyi sonuçları

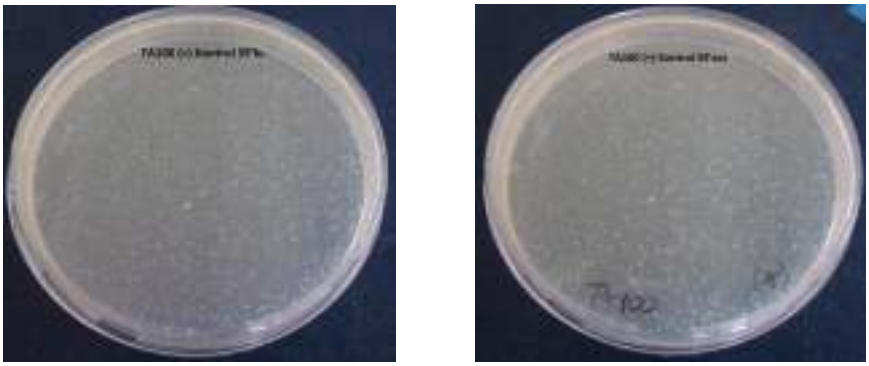
Test Maddesi	Denenen Doz (μg/plak)	Revertant Sayısı Aritmetik Ortalama ± Standart Sapma			
		TA98		TA100	
		S9'suz	S9'lu	S9'suz	S9'lu
Kontrol		22.0±2.6	31.00±2.6	78.00±3.6	108.66±4.9
DMSO		19.66±3.5	25.33±0.5	89.00±15.8	106.66±3.5
Sodyum azid				1174.00±109.6*	1144.66±22.5*
2-aminofluorene			1426.66±178.8*		
4-nitro ofenilendiamine		1359.00±35.9*			
Nonilfenol	0.1 (10^{-5})	27.66±4.1	24.33±10.0	100.66±25.0	93.00±6.0
	1 (10^{-4})	30.00±4.0	29.66±4.0	79.00±8.7	109.3±8.3
	10 (10^{-3})	30.33±2.5	31.33±2.3	80.66±5.0	104.0±12.2
	100 (10^{-2})	26.00±1.0	31.00±7.2	58.00±13.2	77.66±2.0
Bisfenol A	0.1 (10^{-5})	43.33±2.0	51.33±2.3	75.66±15.1	96.66±5.5
	1 (10^{-4})	48.6±3.2	54.33±1.5	81.00±7.2	105.6±17.0
	10 (10^{-3})	41.00±5.2	54.00±14.7	70.66±13.0	112.3±25.5
	100 (10^{-2})	29.00±5.2	32.66±5.5	61.00±13.7	60.00±13.2

* Kontrole göre revertant sayısı $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı (One-Way ANOVA Testi)

NF ve BFA'nın *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA 100 suşunda S9'lu ve S9'suz ortamda revertant koloni sayılarındaki değişimler One-Way ANOVA testi ile incelenmiştir. Kullanılan test maddeleri ve farklı dozları revertant sayısını değişik şekillerde etkilemiştir. TA 98 için ortalama revertant koloni sayısı S9 fraksiyonu varlığında 31.00±2.6, yokluğunda ise 22.0±2.6 bulunmustur. TA 100 için ise ortalama revertant koloni sayıları S9 fraksiyonu varlığında 108.66±4.9 iken S9 fraksiyonu yokluğunda 78.00±3.6 olarak bulunmuştur.

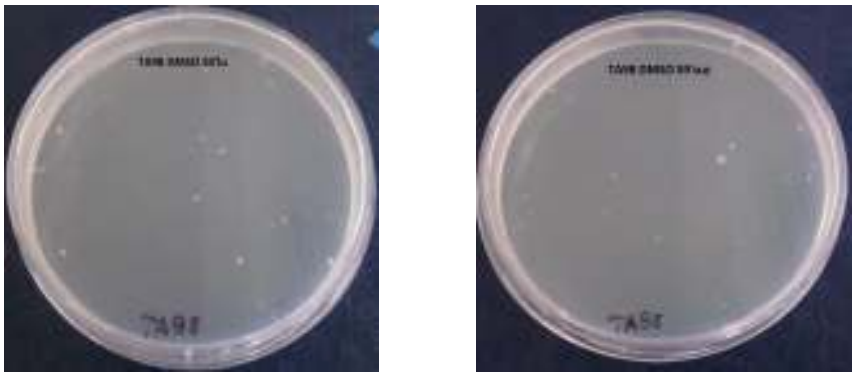
Test maddeleri DMSO'da çözülmüş ve bu çözücünün etkisi de TA 98 için S9 fraksiyonu varlığında 25.33±0.5 ve S9'suz 19.66±3.5 koloni sayısı olarak bulunmuştur. TA 100 suşnda ise bu değer S9 fraksiyonu varlığında 106.66±3.5 olarak, S9 yokluğunda ise 89.00±15.8 olarak bulunmuştur.

Her iki deneyde de test suşlarının geriye dönüş sıklığını ve S9 karışımının etkisini doğrulamak için mutajenik etkileri bilinen pozitif kimyasal maddeler kullanılarak pozitif mutajenik etki kontrolleri yapılmıştır. TA 98 suşu için S9 fraksiyonu varlığında 2-aminofluorene ve S9 fraksiyonu yokluğunda 4- nitro-*o*-fenilendiamine kullanıldığında revertant koloni sayısı artmış ve bu artışlar istatistiksel açıdan kontrol grubuna göre anlamlı olarak saptanmıştır. Şekillerde görüldüğü gibi kontrol grubunun sonuçlarında herhangi bir hata meydana gelmemiştir.

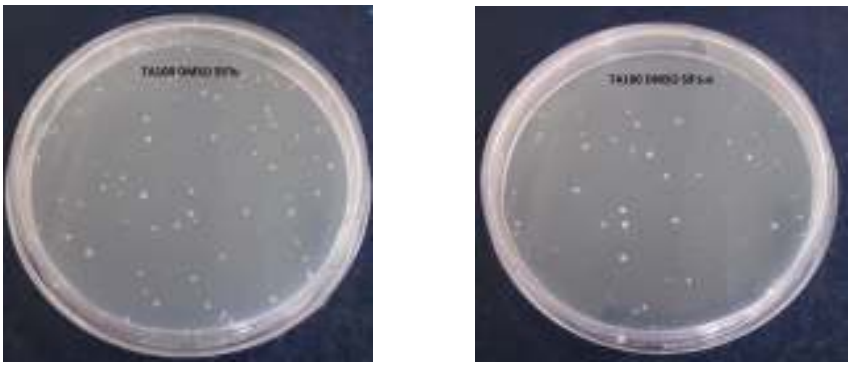


Şekil.3. *Salmonella typhimurium* TA 100 suşunun pozitif kontrol S9'lu ve S9'suz deneyi sonuçları

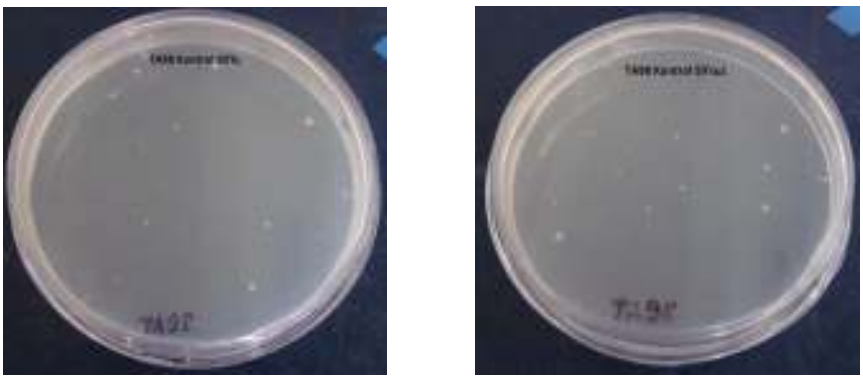
Şekil.4. *Salmonella typhimurium* TA 98 suşunun pozitif kontrol S9'lu ve S9'suz deney sonuçları



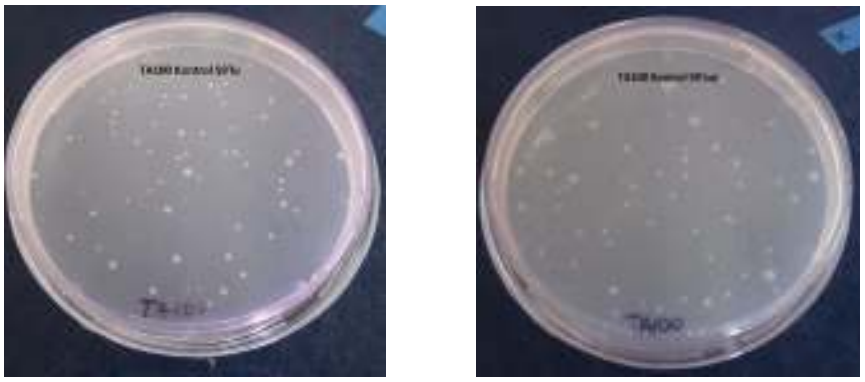
Şekil.5. *Salmonella typhimurium* TA 98 suşunun DMSO kontrolünün S9'lu ve S9'suz deney sonuçları



Şekil.6. *Salmonella typhimurium* TA 100 suşunun DMSO kontrolünün S9'lu ve S9'suz deney sonuçları



Şekil.7. *Salmonella typhimurium* TA 98 suşunun kontrol S9'lu ve S9'suz deney sonuçları



Şekil.8. *Salmonella typhimurium* TA 100 suşunun kontrol S9'lu ve S9'suz deney sonuçları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çevresel mutajenlerin, özellikle gelişmiş toplumlarda pek çok olumsuz etkiler meydana getirdiği pek çok bilimsel makalede rapor edilmektedir (Ref). Canlı organizmların bu etkilere yaşam süreleri boyunca maruz kaldıkları ve böylelikle genetik bozulmayı ve pek çok kanseri türünün ortaya çıkmasını tetiklediğine inanılmaktadır. Mutajenlerin kötü etkilerinden korunmak için önerilen çözüm yolları ise çevresel mutajenlerin tanımlanması ve canlı organizmaların bu ajanlara maruz kalmalarının en aza indirgenmesidir. Bu amacı gerçekleştirmek için ise hızlı ve doğru in vitro testlerin yapılması gerekmektedir. Mutajenlerin tanınlanması ve etkilerinin belirlenmesi için en yaygın kullanılan yöntem de Ames test yöntemidir (McCann and Ames, 1976)

Bu yöntemde *Salmonella typhimurium*'un çeşitli suşları kullanılır. Bu standart test suşları histidin oksotrofudur. Ancak her test suşu belirli bir frekansla geriye dönerek histidinsiz ortamda üreyebilen koloniler verir. Bu kolonilere "spontan revertant" adı verilir. Bir kimyasalın bu test sisteminde mutajen olarak kabul edilmesi için TA98 ve TA100 ile verdigi revertant koloni sayısının, o suşa özgü spontan revertant sayının en az iki katı olması gerekmektedir (Linstromber, W.W., 1983).

Çeşitli maddeler üzerinde Ames testi ile yapılan çalışmalar vardır. Örneğin; NF ve OF'nin toksisite ve östrojenik etkisine ait çok sayıda veri bulunmasına rağmen, bu kimyasalların mutajenik etkisi ile ilgili literatür az sayıdadır. Mutajenik etkinin belirlenmesi amacı ile NF 0.937- 4.685 µg/L aralığın da 6 farklı konsantrasyonda, OF ise 10- 160 µg/L aralığında 5 farklı konsantrasyonda test sistemi olarak seçilen *Salmonella thyphimirium* TA98 ve TA 100 suşları üzerinde (metabolik aktivasyonsuz) test edilmiştir. Sonuçlar revertant koloni sayılarına göre değerlendirildiğinde, tüm NF konsantrasyonlarının toksik olduğu buna rağmen mutajenik etkisinin olmadığı gözlenmiştir (Boyacıoğlu. M., 2007) Bizim çalışmamızda NF'nin S9'lu yani metabolik aktivasyonlu deneyi de yapılmıştır.

BF, NF ve OF ile yapılan diğer bir çalışmada bu maddelerin, üreme sistemi dışındaki bir organ olan karaciğer üzerindeki etkisi ve bu maddelerle birlikte uygulanan C vitamininin olası antioksidan etkisi araştırılmıştır. Çalışmada 42 adet erkek Wistar albino sıçandan 7 grup oluşturulmuştur (n=8). Uygulamalar oral yolla gün aşırı (haftada üç defa) olmak üzere 45 gün boyunca yapılmıştır. Kontrol (K) grubuna sadece zeytinyağı, BF, NF ve OF gruplarına, 25 mg/kg/gün dozunda zeytinyağı içinde çözülmüş sırasıyla BF, NF ve OF uygulaması yapılmıştır. BF+C, NF+C, OF+C gruplarına aynı dozda sırasıyla BF, NF ve OF uygulamasından hemen önce 60 mg/kg/gün dozunda C vitamini uygulaması yapılmıştır. BF, NF ve OF gruplarına ait sıçanların serum AST, ALT ve LDH miktarlarında ve doku MDA konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre P< 0,05 seviyesinde artış saptanırken, BF+C, NF+C, OF+C gruplarında bu parametrelere ait değerler sırasıyla BF, NF ve OF gruplarından daha yuksek bulunmuştur. Uygulama gruplarının doku GSH konsantrasyonları kontrol grubuna oranla P< 0,05 seviyesinde anlamlı ölçüde azalmıştır. BF+C, NF+C, OF+C gruplarında bu değerler sırasıyla BF, NF ve OF gruplarından daha düşüktür. BF, NF ve OF gruplarına ait karaciğer preparatlarında konjesyon ve mononüklear hücre infiltrasyonları gözlenirken BF+C, NF+C, OF+C gruplarında histopatolojik bulguların daha şiddetli ve yaygın olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak BF, NF ve OF sıçan karaciğerinde oksidatif strese bağlı olarak hasar yaratmıs, antioksidan olarak etki göstermesi beklenen vitamin C ise prooksidan etki göstererek endokrin bozucu bu kimyasalların yarattığı karaciğer hasarını artırmıştır (KORKMAZ. A., ve ark., 2009).

Çeşitli yiyecek ve içecek kaplarında, plastikler ve epoksi reçinelerde kullanılan BFA, yetişkin kadınların yumurtalık foliküler sıvısından rastgele alınan idrar örneklerinin % 95'inde tespit edilmiştir. Bazı çalışmalar göstermiştir ki, antral foliküller üzerindeki BFA'nın etkisi, eşeysel steroid hormonlarının temel üreticileri olan foliküller ovulasyon yapabilir. Bu nedenle, bu çalışmanın hipotezine göre doğum sonrası testlere göre, BFA'ya maruz kalanlarda antral folikül gelişimi ve steroidogenezi engeller. Sonuç olarak; BFA'nın (440mm) folikül büyümesine engel olduğu ve bu pregnenolone cotreatment büyümenin devamının olmadığı

gözlenmiştir. Ayrıca, BFA 44 ve 440mm, dehidroepiandrosteron progesteron, estron, testosteron ve androstenedion ve estradiol üretimini de engeller (Peretz. J.,ark. 2011)

Diğer bir çalışmada, şişe sularında endokrin bozucu bileşiklerin(EDCs) oluşumunu araştırmıştır. İncelenen bileşikler BFA, NF, octylphenol dimetil fitalat (DMP), dietil phthalate (DEP), di-n-butil fitalat (DKB), bütil benzil ftalat (BBP) , di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) ve di (n-oktil) (DNOP) phthalate gibi kimyasallardır. Kötü depolama koşullarında şişe sularındaki EDC'lerin varlığı 15 ve 30 gün arası dış ortamda kaldıktan sonra incelenmiştir. EDC'ler sıvı-sıvı ekstraksiyonu sonrası ve Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi kullanımıyla belirlenmiştir. Bu bileşiklerin çoğu yerel piyasadan satın alınan farklı markaların şişe sularında tespit edildi. Açık hava koşullarındaki depolanma şartlarında incelendiğinde bileşiklerin konsantrasyonları üzerinde önemli bir etkisi yoktur. Sadece BFA polikarbonat kaplarda yüksek konsantrasyonlarda artış gözlendi. İçme suyunun EDC' li tüketiminin tahmini miktarı çok düşüktür (Amiridou. D., 2011)

10 yılı aşkın bir zamandan beri, BFA'nın riskli miktarları uluslararası düzeyde tartışılmaktadır. 2008 yılında ABD Ulusal Toksikoloji Programı (NTP)'nda toksisite gelişimi üzerinde BFA'ya maruz kalma seviyesi üzerindeki etkileri açıklandı. Bu bağlamda, Fransız Gıda Güvenliği Ajansı (AFSSA) 5 mg/kg/gün (çeşitli düzenleyici kurumlar tarafından belirlenen hiçbir etki düzeyi) altındaki dozların toksisitesi açısından gözden geçirilmesi kararı alınmıştır. Bu yazıda AFSSA tarafından yürtülen değerlendirmeler özetlenmektedir. Bu çalışmalar 3 grup olarak sınıflandırıldı: (i) toksisite bulunmadı, (ii) kaygıyla ilişiği olmayan sonuçlar (iii) uyarı sinyalleri veren rapor sonuçları. Uyarı sinyalinin anlamı, resmi olmayan sonuçlar değerlere dayalı sağlık oluşumunun kurulumuyla ilişkisi çizilebilir. Fakat düşük dozlardaki BFA ile toksisite ile ilgili bazı sorular akla gelmektedir. Bu çalışmalarda, uyarı sinyallerinin insan sağlığı için önemini anlamak için BFA düşük dozlarda ve daha genel olarak endokrin bozucular ile ilgili risklerin değerlendirilmesi için yeni yöntemler geliştirilmesinin gerekli olduğu sonucuna varıldı (Arnich. N., ve ark., 2010)

NF ile yapılan çalışmamızın S9'lu deneyi sonucunda, *Salmonella typhimurium* TA 98 ve TA100 suşları ile yapılan çalışmada uygulanan tüm dozların S9 varlığında elde edilen ortalama revertant koloni sayılarının S9 yokluğundaki revertant koloni sayılarına göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Buna dayanarak test ettiğimiz NF ve BFA'nın da canlı vücuduna girdiğinde metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan metabolitlerinin DNA ile etkileşimini bir miktar artırdığı düşünülebilir.

Çalışmamızın amacı, NF ve BFA'nın Ames/*Salmonella*/Mikrozom Testi kullanılarak mutajenik potansiyellerini araştırmaktır. Mevcut çalışmamızda öncelikle toksik olmayan dozlar belirlendi ve hem S9'suz hem S9'lu deneyler ayrı ayrı 3'er plak halinde yapıldı.

Her iki madde içinde denenen dozlar, 10000 µg/plak; 1000 µg/plak; 100 µg/plak, 10 µg/plak; 1 µg/plak; 0,1 µg/plak olarak belirlendi. Bu dozlar arasında 10000 µg/plak ve 1000 µg/plak dozları toksik olarak bulundu. Daha sonra toksik olmayan dozlarla *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşlarıyla S9'lu ve S9'suz deneyleri her iki madde içinde çalışıldı.

Yapılan çalışmaların sonucunda BFA'nın ve NF'nin mutajenik olmadığı belirlenmiştir. Yani BFA ve NF ile ön inkübasyona bırakılan *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşları ile gerçekleştirilen çalışmada metabolik aktivasyonlu (S9'lu) ve metabolik aktivasyonsuz (S9'suz) test edilen bütün dozlarda revertantların sayısında artış olmadığı bulunmuştur.

KAYNAKLAR

AMIRIDOU, D., and VOUTSA, D., (2011) ‘’Alkylphenols and phthalates in bottled waters.’’, Journal of Hazardous Materials Volume 185, Issue 1, 15 January 2011, Pages 281-286

ARNICH, N., CHANTAL, M., LAVİER, C., , KOLF-CLAUW, M., COFFİGNY, H., CRAVEDİ, J., KONRAD., (2011), ‘’Conclusions of the French Food Safety Agency on the toxicity of bisphenol A.’’, 7 January 2011.

AYDOĞDU, K.F., (2003). ‘’Bazı 9-aril Substitue Fenantren türevlerinin genotoksik etkilerinin Ames testi ve Allium testi ile Araştırılması.’’, Doktora Tezi, Eskişehir.

AYAZ, B., (1993). ‘’2, 4, 5 Tri (Sübstitüe) fenil imidazol ve Türevlerinin Mutajenik Aktivitesinin Ames/Salmonella/Mikrozom Testi ile Araştırılması.’’, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.

BAYDAR, H., (2005). Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tıbbi, Aromatik ve Keyif Bitkileri Bilim ve Teknolojisi, SDÜ Yayınları No:51.

BOYACIOĞLU, M., ARSLAN, ÇAKAL, Ö., PARLAK, H., KARAASLAN, M., (2007).‘’Mutagenicity of Nonylphenol and Octylphenol Using Salmonella Mutation Assay.’’, E.Ü. Su Ürünleri Dergisi 2007, E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences 2007,Cilt/Volume 24, Sayı/Issue (3-4): 299–302

BOZCUK, A., (2005). Genetik, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Palme Yayıncılık, Ankara (215).

DEMİRSOY, A., (2005). Kalıtım Ve Evrim, Meteksan, Ankara.

ERGUN, B., (2008). Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Toksikoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi, Ders Notları

FORMAN, D., AMES, B., (1991). ‘’The Ames Test and the Causes of Cancer.’’, Br. Med. J. Vol. 303, 428-429.

HO, S.M., TANG, W.Y., FRAUSTO, J.B., PRINS, G.S. (2006) “Developmental Exposure to Estradiol and BisphenolA Increases Susceptibility to Prostate Carcinogenesis and Epigenetically Regulates Phosphodiesterase Type 3 Variant 3.”, *Cancer Research*. 66, 5624-5632.

HUNG, C. H., YANG, S. N., KUO, P. L., CHU, Y. T., CHANG, H. W., WEI W. J., HUANG, S. K., JONG, Y.J., (2009). ‘‘Modulation of Cytokine Expression in Human Myeloid Dendritic Cells by Environmental Endocrine Disrupting Chemicals Involves Epigenetic Regulation.”, Environmental Health Perspectives. (available at http://dx.doi.org/)

KİM, S.K., B. K. KİM, J.H. SHİM, J.E. GİL, Y.D. YOON and J.H. KİM., (2006). ‘’Nonylphenol and Octylphenol- Induced Apoptosis in Human Embryonic Stem Cells are related to Fas-Fas Ligand Pathway.’’, Tox. Sci., 94(2): 310-321.

KLUG, W.S. ve CUMMINGS, M.R., (2002). Concept of Genetics, 6 th Edition, 0-13-081626-4 (Çev. ÖNER, C. Genetik Kavramlar, Palme Yayıncılık, 816.

KONUK, M., (2004). Moleküler Biyoloji Önemli Notlar Nobel Yayın Dağıtım P.C.Turner, A.G.McLennan A.D.Bates&M.R.H.White, Ankara (96-98).

KORKMAZ, Burcu., (2005). ‘’Bazı 2-Sübstitüe Perimidin Bileşiklerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames Mutajenite Testi ile Belirlenmesi.’’,Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı (25-28).

KORKMAZ, A., AYDOĞAN, M., KOLANKAYA, D., BARLAS, N., (2009), ‘‘C vitamininin Bisfenol a, Nonilfenol ve Oktilfenolün İndüklediği Karaciğer Hasarı Üzerindeki Etkileri.’’, Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı, Ankara

LEE, M.H., KIM, E., KIM, T.S., (2004). “Exposure to 4- tert-octylphenol, an environmentally persistent alkylphenol, enhances inter-leukin-4 production in T cells via NF-AT activation.”, *ToxicolAppl Pharmacol*. 197(1):19-28.

LINSTROMBER, W.W., (1983). Modern Organik Kimya, Çev. Tahsin Uyar, Hacettepe Tas Kitapçılık, Ankara, 345.

MCCANN, J. AND B.N.AMES., (1976). ‘’Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals: discussion. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 73:950-954.

MONTGOMERY-BROWN, J., ; Reinhard, M., (2003). “Occurrence and Behavior of Alkylphenol Polyethoxylates in the Environment.”, Environmental Engineering Science, Vol.20(5): 471-486

MORTELMANS, K., ZEIGER E., (2002), The Ames Salmonella/Microsome mutagenicity assay. Elsevier, Mutation Research, 455(2000) 29-60.

ÖNCÜL, Ö., (2009).''Bazı gıda boyalarının mutajenik potansiyellerinin Ames/ mikrozom testi ile araştırılması ve β-galaktozidaz üzerine etkileri'' Doktora Tezi, Biyoloji, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, ANKARA

ÖZTAŞ, E., (2005). ''Bazı 9-Sübstitüe Fenantren Türevlerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames Salmonella Mikrozom Test İle Araştırılması.'', Yüksek Lisans Tezi, Anadolu niversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (25).

ÖZBEK, T., (2006). ''Doğu Anadolu tıbbı bitkilerine ait bazı türlerin Ames/*Salmonella* mikrozom testi kullanılarak antimutajenik özelliklerinin saptanması.'', Erzurum Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

PAXEUS, N., ROBINSON, P., BALMER, P., (1992). ''Study of Organic Pollutants İn Municipal Wastewater in Gotenberg, Sweden.'', Water Sci. Technol., 25: 249-256.

PERTZ, J., GRUPTA, K. R., SİNGH. J., HERNA´NDEZ-OCHOA. I., and A. FLAWS1, A., (2011) '' Bisphenol A Impairs Follicle Growth, Inhibits Steroidogenesis, and Downregulates Rate-Limiting Enzymes in the Estradiol Biosynthesis Pathway'', Department of Comparative Biosciences, University of Illinois, Urbana, Illinois 618021To whom correspondence should be addressed at Department of Comparative Biosciences, University of Illinois, 2001 S. Lincoln Avenue, Room 3223, Urbana, toxıcologıcal scıences 119(1), 209–217 (2011), doi:10.1093/toxsci/kfq319 Advance Access publication October 18, 2010

PETEK, M., 1999, ''İstanbul Boğazı'ndaki Toplam Kirliliğin Canlılardaki Mutajenik Ekilerinin Salmonella/ Mikrozom Test Sistemi ile Araştırılması.''

SYNDER, L., CHAMPNESS, W. (2007). ''Third Edition Moleküler Genetics of Bacteria'', Department of Microbiology and Moleculer Genetics, Michigon State University East Lansing, Michigan Washigton, DC (492).

ŞAHİN, G., (2008). Toksikokinetik, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Toksikoloji Anabilim Dalı.

TEMİZKAN, G.O., (1994) Genetik İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi Basımevi , İstanbul.

TSUTSUMI, Y., HANEDA, T. NISHIDA, T. (2001). Removal of Estrogenic Activities of Bisphenol A and Nonylphenol by Oxidative Enzymes From Lignin-Degrading Basidiomycetes. Chemosphere. 42: 271–276.

T.C. Sağlık Bakanlığı, Temel Sağlık Bülteni Yıl:3 Sayı:24 Kasım 2008 'Ayın Mesajı' syf:3

TOPPARI, J., LARSEN, J., CHRISTIANSEN, P., GIWERCMAN, A., GRANDJEAN, P., GUILLETTE Jr, L., JEGOU, B., JENSEN, T., JOUANNET, P., KEIDING, N., LEFFERS, H., MCLACHLAN, J., MEYER, O., MULLER, J., RAJPERT-DE-MEYTS, E., SCHEIKE, T., SHARPE, R., SUMPTER, J., SKAKKEBAEK, N., (1996). Male Reproductive Health and Environmental Xenoestrogens. Environ. Health Perspec., 104(Suppl 4): 741-803.

TÜYLÜ, B., (2001). ''Bazı İlaç Öncül Maddelerinin Mutajenik Etkilerinin Bakteriyal ve Hücre Kültürü Testleri İle Araştırılması.'', Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Ana Bilim Dalı (15).

UĞUZ, C., İŞCAN, M., ERGÜVEN, A., and TOGAN, İ. (2003). ''The bioaccumulation of nonylphenol and its adverse effects on the liver of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*).'', *Environmental Research*, 92(3):262-270.

VIVACQUA, A., RECCHIA, A.G., FASANELLA, G., GABRIELE, S., CARPINO, A., RAGO, V., (2003). "The food contaminants bisphenol A and 4-nonylphenol act as agonists for estrogen receptor alpha in MCF7 breast cancer cells.", Endocrine. 22(3):275-284.

VURAL, N., DUYGU, Y., (1991-1992). ''Ankara Çayının Anyonik ve Noniyonik Yüzey Aktif Madde Kirliliğinin Araştırılması''Ankara Ecz. Fak. Der. 21, 1-2 (1991-1992) J. Fac. Pharm. Ankara 21, 1-2 Monitoring of Anionic and Nonionic Surfactants in Ankara Stream

WARHURST, A.M., (1995). “An Environmental Assessment of Alkylphenol Ethoxylates and Alkylphenols.”

YILDIRIM, A., BARDAKÇI.F.,KARAKAŞ.M.,TANYOLAÇ.B., (2007). Moleküler Biyoloji; Nobel Yayın Dağıtım

YÜKSEL, S., (2005). ‘’Bazı Sübsititüe Benzinidenilin Türevlerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames Salmonella Mikrozom Testi İle Araştırılması.’’, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı (20).

ZEYTİNOĞLU, H., ERGENE, E., TÜYLÜ, B.,‘’Bazı (Kloro-Fenil) Fenantroimidazol Türevlerinin Mutajenik Aktivitesinin Ames/ Salmonella/ Mikrozom Testi İle Araştırılması.’’, Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (79-80)

http://en.wikipedia.org/wiki/Nonylphenol (20.12.2010)

http://en.wikipedia.org/wiki/Bisphenol A (20.12.2010)