

**THİMEROSAL'İN İNSAN LENFOSİT HÜCRE  
KÜLTÜRLERİNDE GENOTOKSİK, MUTAJENİK  
VE TOKSİK ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**DİLEK EKE**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ  
ANA BİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MERSİN  
HAZİRAN-2007**

**THİMEROSAL'İN İNSAN LENFOSİT HÜCRE  
KÜLTÜRLERİNDE GENOTOKSİK, MUTAJENİK VE TOKSİK  
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

**DİLEK EKE**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ  
ANA BİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Ayla ÇELİK**

**MERSİN  
HAZİRAN-2007**

Bu tezin gerek bilimsel içerik, gerekse elde edilen sonuçlar açısından tüm gerekleri sağladığı kanaatine ulaşan ve aşağıda imzaları bulunan biz jüri üyeleri, sunulan tezi oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul ediyoruz.

Tez Danışmanı  
Doç. Dr. Ayla ÇELİK

Jüri Üyesi  
Prof. Dr. Emin ERDAL

Jüri Üyesi  
Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ

Bu tezin Fen Bilimleri Enstitüsü yazım kurallarına uygun olarak yazıldığı Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../.....tarih ve ...../..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr.Mahir TURHAN  
Enstitü Müdürü

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

## ÖZ

Bu çalışmada, organik bir civa bileşiği olan Thimerosal'ın ve S-9 lu ortamda oluşan metabolitlerinin , insan lenfositleri üzerindeki genotoksik, toksik ve mutajenik etkileri araştırılmıştır. Çalışmada; in vitro Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) ve sitokinez blok mikronukleus (MN) teknikleri kullanılmış ayrıca mitotik indeks (MI) ve sitokinez blok hücre proliferasyon indeksi (CBPI) hesaplanmıştır.

Sodyum etil civa ve tiosalisilattan oluşan bu bileşik, biyolojik ürünlerde ve aşılarda ; 0.003 - 0,01% (30-100µg/ml) konsantrasyon aralığında bulunmakta ve antibakterial , antifungal olarak kullanılmaktadır. 49,6% sı civadan oluşan Thimerosal vücuda girdikten sonra etil civaya metabolize olmakta ve özellikle beyin ve böbreklerde biriken ve membran ile DNA hasarına neden olan inorganik civaya dönüşmektedir.

Bu çalışma için kullanılan kan örnekleri sigara kullanmayan sağlıklı üç erkek bireyden alınmıştır. Doz aralığı aşılardaki miktarı göz önüne alınarak belirlenmiştir. Thimerosal, 100µl lik saf su çözeltisi şeklinde lenfosit kültürlerine eklenmiş ve son konsantrasyonlar; 0,2 µg/ml 0,4 µg/ml 0,6 µg/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Negatif kontrol hücre kültürlerine, 100µl lik saf su, pozitif kontrol hücre kültürlerine ise 2µg/ml lik mitomisin-C yada S-9 kullanılan kültürlere siklofosfamid (cyclophosphamid) (1,4µg/ml) eklenmiştir.

Sonuçlar tek yönlü varyans analizinde değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizde SPSS windows 11 post hoc analiz LSD testi uygulanmıştır. Sonuçlar kontrol guruplarıyla kıyaslandığında; KKD ve MN oranı düşerken MI ve CBPI oranı artmıştır. KKD ve MI değerleri S-9 un varlığından etkilenirken MN ve CBPI değerleri etkilenmemiştir.

ANAHTAR KELİMELER; Thimerosal , mutajenite, toksisite, mikronukleus

## ABSTRACT

In this study, the genotoxic, toxic and mutagenic potential of thimerosal, an organic mercury compound, and the metabolite of thimerosal in cultures with S-9 were investigated in human lymphocyte cells, using Sister Chromatid Exchange (SCE), micronucleus (MN), mitotic index (MI) and Cytokinesis block cell proliferation index (CBPI).

This compound (sodium ethyl mercury-thiosalicylate) is an antibacterial and antifungal in biological production and vaccines, in concentrations ranging from 0.003 to 0.01% (30-100 µg/ml). Thimerosal contains 49.6% mercury weight and releases ethyl mercury as a metabolite. In the body ethylmercury can be converted to inorganic mercury, which then preferentially accumulates in the kidneys and brain. Inorganic mercury is known to induce membrane and DNA damage.

The study was carried out by using blood samples from three healthy non-smoking male donors, aged 25 years. The dose range was selected according to the amount in vaccines of thimerosal. Thimerosal was added to cell cultures in 100 µl of double-distilled water to final concentrations of 0.2 µg/ml, 0.4 µg/ml, 0.6 µg/ml. Negative control cell cultures received 100 µl of water without thimerosal. Mitomycin C (2 µg/ml) or cyclophosphamide for culture with S-9 (1.4 µg/ml) was used as a positive control.

Data were compared by one-way variance analysis. Statistical analysis was performed using the SPSS for Windows 11 package program. Post hoc analysis was performed by the least significant difference (LSD) test. The results of the frequency of SCE, MN, and the values MI and CBPI for each dose and control groups are compared. All doses of thimerosal caused an increase in the frequency of SCE, MN, and a decrease in the frequency of MI, CBPI. Values of SCE and MI were affected from S-9 and values of MN, CBPI were not affected from S-9.

**KEY WORDS;** Thimerosal, mutagenicity, toxicity, micronucleus

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam süresince değerli yardım ve katkılarını esirgemeyen danışman hocam Sn. Doç. Dr. Ayla ÇELİK'e teşekkür ederim.

Biyoloji Bölüm Başkanı Sn. Prof. Dr. Serap ERGENE'ye ve bilgilerinden yararlandığım Yrd. Doç. Dr. Tolga CAVAŞ'a ve Yrd. Doç. Dr. Birgül MAZMANCI'ya teşekkür ederim.

Tıp fakültesinin değerli hocalarından Prof. Dr. Emin ERDAL , Doç. Dr. Nurcan ARAS ATEŞ ve istatistiksel hesaplamadaki katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Bahar TAŞDELEN 'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü desteğini esirgemeyen ve laboratuvar çalışmalarında beni yalnız bırakmayan bölüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında yanımda olan maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim aileme teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|  | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| ÖZ.....  | i            |
| ABSTRACT.....  | ii           |
| ÖNSÖZ.....   | iii          |
| İÇİNDEKİLER.....   | iv           |
| ÇİZELGELER DİZİNİ.....   | vi           |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....   | vii          |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....   | viii         |
| <br>   |              |
| 1.GİRİŞ.....   | 1            |
| <br>   |              |
| 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....  | 4            |
| <br>   |              |
| 2.1. THİMEROSAL.....   | 4            |
| 2.2. AŞILAR VE THİMEROSAL .....  | 11           |
| 2.3. ÇEŞİTLİ CİVA FORMLARININ ORGANİZMA ÜZERİNE<br>ZARARLI ETKİLERİ .....            | 15           |
| 2.4. THİMEROSALİN METABOLİZMASI.....   | 16           |
| 2.5. THİMEROSAL'İN BEYİNİ ETKİLEMESİNDE GLUTATYONUN<br>KORUYUCU ROLÜ.....            | 19           |
| 2.6. DÜZENSİZLİKLER .....  | 22           |
| 2.6.1.Genotoksik Toksik Mutajenik Etki.....  | 22           |
| 2.6.2.KKD (SCE) .....  | 23           |
| 2.6.2.1.KKD oluş modelleri.....  | 23           |
| 2.6.2.2. KKD Testi .....   | 28           |
| 2.6.2.3. Kimyasal ajanlar ve KKD .....   | 29           |
| 2.6.2.Mikronukleus (MN).....   | 30           |
| 2.6.2.1. MN Testi .....  | 32           |
| 2.7. S-9 AKTİVASYON SİSTEMİ .....  | 37           |
| 2.8. SİTOKİNEZ BLOK HÜCRE PROLİFERASYON İNDEKSİ(CBPI)<br>VE MİTOTİK İNDEKS (MI)..... | 38           |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.MATERYAL ve METOT .....</b>  | <b>39</b> |
| 3.1.GEREÇLER .....  | 39        |
| 3.1.1.Tamponların Hazırlanması .....  | 39        |
| 3.1.2.Çözeltilerin Hazırlanması .....   | 39        |
| 3.1.3.Kimyasalların hazırlanışı .....   | 40        |
| 3.2.YÖNTEM .....  | 41        |
| 3.2.1.Periferik Kandan Lenfosit Hücre Kültürlerinin Hazırlanması...41                                     |           |
| 3.2.2.KKD İçeren Kromozomların Değerlendirilmesi.....42   |           |
| 3.2.3.Sitokalsin-Blok hücre proliferasyon indeksi<br>(CBPI) Ve Mitotik İndeks (MI) Değerlendirmesi.....43 |           |
| 3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ .....   | 44        |
| <br>  |           |
| <b>4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....</b>   | <b>45</b> |
| 4.1. BULGULAR .....   | 45        |
| 4.2.TARTIŞMA .....  | 54        |
| <br>  |           |
| <b>5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER .....</b>  | <b>64</b> |
| <br>  |           |
| <b>KAYNAKLAR.....</b>   | <b>66</b> |
| <br>  |           |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>   | <b>79</b> |



## ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>Çizelge</u>  | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| Çizelge 2.1. Aşıların içerdiği cıva miktarları.....   | 12           |
| Çizelge 2.2. 1999 da Amerika da bir bireyin yaşamının ilk 6 ayında, çocuklu çağı aşılarındaki Thimerosal vasıtasıyla maruz kaldıkları cıva miktarı..... | 13           |
| Çizelge 2.3. Bir bireyin yaşamının ilk 2 yılında, çocukluk çağı aşılarındaki thimerosal yoluyla maruz kaldığı cıva miktarlar.....                       | 13           |
| Çizelge 2.4. İn Vitro MN testinin avantajları ve dezavantajları .....   | 34,35        |
| Çizelge 4.1. Thimerosalin belirli dozlarına maruz bırakılan guruplardaki KKD değerleri .....  | 46           |
| Çizelge 4.2. Thimerosalin belirli dozlarına maruz bırakılan guruplardaki MN değerleri.....  | 48           |
| Çizelge 4.3. Thimerosalin belirli dozlarına maruz bırakılan guruplardaki MI değerleri .....   | 50           |
| Çizelge 4.4. Thimerosalin belirli dozlarına maruz bırakılan guruplardaki CBPI değerleri.....  | 52           |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Şekil</u>   | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| Şekil 2.1: Thimerosalin kimyasal formülü.....  | 4            |
| Şekil; 2.2. Thimerosalin vücuttaki dönüşümü.....   | 18           |
| Şekil 2.3. Bir antioksidan olarak glutatyon sentezi .....  | 20           |
| Şekil 2.4. Bir antioksidan olarak glutatyon sentezinde organların rolü.....                              | 21           |
| Şekil 2.5. Kimyasalların toksik etkilerinin sınıflandırılması .....                                      | 22           |
| Şekil 2.6 Genel KKD oluş mekanizması .....   | 24           |
| Şekil 2.7. Replikasyon Bypass Modeli .....   | 25           |
| Şekil 2.8. Holiday modeli .....  | 27           |
| Şekil 2.9. Mikronukleusun sebepleri .....  | 31           |
| Şekil 2.10. Mikronukleusa neden olan kromozom anomalileri .....  | 31           |
| Şekil 2.11. Mikronukleus testi .....   | 33           |
| Şekil 2.12. Mikronukleus tekniğinde giemsa ve floresan teknikleri ile FISH<br>metodu .....               | 36           |
| Şekil 3.1. KKD nin görünümü .....  | 43           |
| Şekil 4.1. Thimerosaldeki doz artışına bağlı olarak KKD oranındaki artış.....                            | 47           |
| Şekil 4.2. Metafaz evresindeki bir hücrede KKD (Kardeş Kromatid Değişimi) .....                          | 47           |
| Şekil 4.3. Thimerosaldeki doz artışına bağlı olarak MN oranındaki artış.....                             | 49           |
| Şekil 4.4. Çekirdek bölünmesinden sonra sitoplazma bölünmesi durdurulmuş<br>olan binukleuslu hücre ..... | 49           |
| Şekil 4.5. Binukleuslu bir hücrede mikronukleus MN .....   | 50           |
| Şekil 4.6. Thimerosaldeki doz artışına bağlı olarak MI değerindeki düşüş.....                            | 51           |
| Şekil 4.7. Thimerosaldeki doz artışına bağlı olarak CBPI oranındaki düşüş.....                           | 53           |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

TM; thimerosal

KKD; Kardeş kromatid değişimi

MN; mikronukleus

MI; mitotik indeks

CBPI; cytokinez blok hücre proliferasyon indeksi

MMC; mitomisin-C

CP; siklofosfamid

DTSA; ditiosalisilik asit

SEBA; 2-sulfenobenzoik asit

SIBA; 2-sulfinobenzoik asit

SOBA; 2-sulfobenzoik asit

AAP; amerikan pediatri akademisi

USPHS; Amerika halk sağlığı servisi

FDA; gıda ve ilaç bakanlığı

EPA; çevre koruma ajansı

WHO; dünya sağlık örgütü

ATSDR; toksik maddeler ve hasar tescili ajansı

GST; glutatyon S transferaz

TCVs; çocukluk çağı aşıları yoluyla

DTaP difteri- tetanoz- acellular Pertuccis (difteri ve tetanoz toksinleri ve hücreyel olmayan boğmaca aşıları)

DTP; difteri ve tetanoz toksinleri ve tüm hücre boğmaca aşıları

HgIA; Hg-bağımlı otoimmünite sendromu

TSA, tiosalisilik asit

EtHg, etil civa iyonu

VAERS; aşı karşıtı varolan raporlar sistemi

ACIP; aşılamada öneriler komitesi

SK-N-SH; İnsan Nöroblastoma Hücre Dizileri

ROS; reaktif oksijen türevleri

IQ; sistemik immün kompleks

LDH; Laktat Dehidrogenaz

NAC; N-asetil sistein

HIB; menenjit aşısı

OPV; çocuk felci aşısı

BCG; verem aşısı

## 1. GİRİŞ

Ticari ismi Merthiolate olan Thimerosal 1929 da, ELI LILLY adlı bir ilaç şirketi tarafından antibakteriyal ve antifungal olarak aşı ve diğer bileşiklerde bakteriyel kontaminasyonu önlemek amacıyla piyasaya sunulmuştur.

Thimerosal'ın kimyasal formülü  $C_9H_9HgNaO_2S$  dür. Ve vücutta ethylmercury (etilciva) ( $C_2H_5Hg^+$ ) ve thiosalicylate (tiosalisilat) a metabolize olduğu belirlenmiştir[1].

Sinonimleri; ethyl-2-mercaptobenzoato (2-) – O, S --mercurate sodium, mercury ( (o-carboxyphenyl) thio) ethyl sodium salt, mercurothiolate, merzonin sodium, SET, sodium ethylmercuric thiosalicylate, sodium merthiolate, thimerosalate, thiomersalate, merfamin, merthiolate, merthiolate sodium, merzonin, nosemack, merseptyl, 2-mercaptobenzoic acid mercury complex, elcide 75, thiomersal, ethylmercurithiosalicylic acid sodium salt.

Kullanımı; ilaçlarda anti fungal, anti bakterial ve koruyucu olarak kullanılmaktadır.

Fiziksel özellikleri;

Molekül formülü;  $C_9H_9HgNaO_2S$

Molar kütlesi; 404.81 g/mol

CAS No: 54-64-8

Sudaki çözünürlüğü: 1000 g/l (20 °C)

Thimerosal (thiomersal, mercurothiolate), 1930'lardan beri aşılarında, göz damlalarında ve kontakt lens solüsyonlarında yaygın olarak kullanılan organik bir civa birleşimidir. Aşıların içeriklerine eklenen bu madde, viral kültürlerde bakteri çoğalmasını önlemek, antijen ve antikörleri stabilize etmek için kullanılmaktadır. Rutin immünizasyon (aşılama) şemasında önerilen bazı aşılarında (örneğin DBT

aşıları, hepatit B ve bazı hemofilis influenza aşıları...) bu maddenin olması son yıllarda tartışmalar yaratmaktadır. Çünkü, ağırlığının %46.9'unu oluşturan civanın yaşamın erken döneminde alınmasının, çocuğun nörolojik gelişimini ne şekilde etkileyeceği tam olarak açık değildir[1].

Doğada organik civa bileşikleri çoğunlukla metil civa şeklinde, en çok tatlı su balıkları ve bu sulara yaşayan diğer canlılarda bulunmaktadır. Balık yiyen kuşlar ve memeliler yüksek oranda metil civaya maruz kalabilmektedir. Thimerosal'deki civa ise etil civa şeklinde olup organik moleküllere bağlandığı için vücutta serbest olarak dolaşmaktadır. Bununla birlikte bu organik civa bileşiğinin hangi dozlarda nörolojik gelişimi bozacağı tam olarak belirlenmemiştir. Ayrıca FDA tarafından şimdiye kadar metil civanın güvenlik aralığı tanımlanmış ( günde en fazla 0,4 ug/kg) olsa da etil civanın kullanımı için yazılı bir bilgi yoktur [1].

Civanın, özellikle yenidoğan ve anne karnındaki bebeklerin santral sinir sistemi için toksik olduğu belirlenmiştir. Gebelerde saç ve kanda civa ölçümünün yapılabildiği ancak bu ölçümlerin bebekteki nörolojik yan etkilerle her zaman ilişkili olmadığı belirtilmektedir[1].

Özellikle birden çok dozu içeren aşı paketlerinde, bu madde yaygın olarak bakteriyel kontaminasyonu engellemek için kullanılmaktadır. Ancak özellikle DBT multidoz aşı flakonlarındaki thimerosal kısa süreli bakteriyel kontaminasyonları önleyememekte, kullanılan konsantrasyonlarda ideal bir koruyucu madde olarak görülmektedir. Aşı flokanlarının kontaminasyonu en çok flakon tıpasının yüzeyinden gelen mikroorganizmalarla olduğu bildirilmektedir[1].

Deneylerde neoplastijen ve teratojen olduğu rapor edilmiştir. Solunması ya da yutulması durumunda ya da deriyle teması halinde de zararlı olduğu belirtilmiştir[2].

Thimerosal aşılarından başka tıbbi ürünlerde de kullanılmaktadır. En geniş kullanım alanı çocuk aşılama programlarındaki aşılarla bulunmaktadır. Fakat 2001 yılından beri yan etkilerinden dolayı yoğun olarak araştırılmaya başlanmıştır.

Genotoksik etkileri çok az sistemde çalışılmış ve elde edilen sonuçların yetersiz ve tartışmalı olduğu bildirilmiştir. Mutajenik etkilerine ilişkin hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Sinir sistemi hücrelerinde ve fibroblastlarda yapılmış genotoksikite çalışmaları az sayıdadır [3,4]. Ball ve ark. [5] a göre Thimerosal'ün toksik etkilerinin içermiş olduğu civa ağır metalinden kaynaklanmış olduğu bilinmektedir[5].

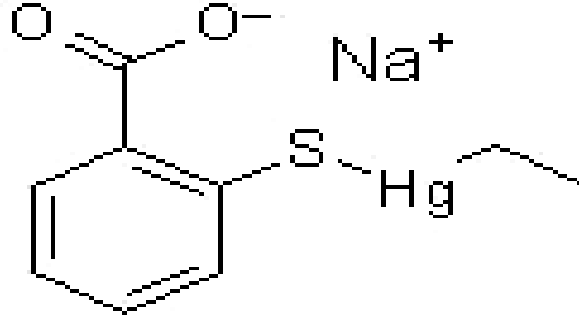
Civa (Hg) volkanlardan erozyonla doğal olarak oluşan metaldir fakat antropojenik kaynaklar bu kirlenmeyi arttırmıştır. Hg'nin çevredeki en genel formu element haldeki Hg ( $Hg^0$ ), metil ve etil gruplar eklenmiş olan Hg bileşikleri gibi organik bileşiklerdir. Thimerosal, organik radikal olarak adlandırılan etil civa (EtHg) ihtiva etmektedir. EtHg salisilik asitin thiol gruplarına bağlanır. Hg'nin en önemli biyokimyasal özelliği sülfidril gruplarına olan ilgisi aracılığı ile merkaptid olarak isimlendirilen bileşiği oluşturmasıdır. Havaranisab ve Hultman [6] tarafından çeşitli civa bileşiklerinin hücre içi reaktif oksijen türevlerinin artışına neden olduğu ve bu artışın glutatyon seviyesindeki düşüşle ilişkili olduğu bildirilmiştir [4].

Kemiricilerde yapılan in vivo çalışmalarda genotoksik veriler elde edilmiş fakat yeterli olmadığı rapor edilmiştir. Avrupa'da bulunan bir çalışma grubu tarafından genotoksik etkilere ilişkin sadece iki raporun geçerli olduğu Miller [7] tarafından bildirilmiştir.

Bu çalışmada; tıp dünyasında üzerinde büyük tartışmaların olduğu Thimerosal'in insan lenfositleri üzerindeki genotoksik mutajenik ve toksik etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca testlerde S-9 aktivasyon sistemi kullanılarak Thimerosal için in vivo ortam yaratılıp, metabolitlerinin etkilerinin de araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1.THİMEROSAL



Şekil 2.1: Thimerosal'ın kimyasal formülü [8].

Ticari ismi Merthiolate olan Thimerosal 1929 da bir ilaç şirketi olan ELİ LİLLY tarafından antibakteriyal ve antifungal olarak aşı ve diğer bileşiklerde bakteriyel kontaminasyonu önlemek amacıyla piyasaya sunulmuştur[1,2].

Thimerosal in kimyasal formülü C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>HgNaO<sub>2</sub>S dür. Vücutta etilciva (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>Hg<sup>+</sup>) ve tiosalisilat (thiosalicylate) a metabolize olduğu ve beyin ve böbrekte biriktiği belirtilmiştir [8].

Thimerosal'ın toksisitesi içerdiği civa bileşiğinden kaynaklanmaktadır. Çünkü civa bileşiklerinin yağda erime özellikleri fazladır. Civa bileşikleri özellikle membran (zar) yapısında bulunan proteinlere bağlanarak hücre zarlarının işlevlerini bozarlar; akıcılığı kaybolan membran sertleşerek hücrenin çabuk yaşlanmasına neden olur. Beyin hücrelerinde onlara özgü nörotübül denilen yapılar vardır. Civa nörotübül yapımını sağlayan tubulin adlı yapıyı tahrip etmektedir[9].

Civa şu formlarda olabilir;

**Elemental (metalik) civa:** Hg (Hg<sup>0</sup>),

**İnorganik (merkurik) civa:** Hg (Hg<sup>2+</sup> Hg)



**Organik civa:** organik bileşikler olarak (etil civa, metil civa ve fenil civa)

Civanın karbon atomu veya karbon içeren bileşiklerle birleştiği formudur. Civanın en toksik formudur. Organik civanın en sık karşılaşılan formları; **metil civa ve etil civadır**. Elementel civa; mekkürik merküriye ( Hg<sup>2</sup>) oksidize olur. Bu bileşik te mikroorganizmalar tarafından MeHg ye metillenmekte ve sucul organizmalarda birikmektedir[6].

Bu civa formlarından, Thimerosal'de bulunan ve mikropları tahrip eden esas etken etilcivadır. Thimerosal EtHg den oluşmakta ve salisilik asitin tiol guruplarındaki sülfür atomuyla reaksiyona girmektedir. Dokulardaki alınımindan hemen sonra EtHg hızlı bir şekilde tiosalisilik bileşiğinden ayrılmakta ve gidip doku proteinlerindeki tiollerle bağlanmaktadır[6]. Yine son zamanlardaki çalışmalar metil merkürinin metil merküri sisteine dönüştüğü bildirilmiştir. Yine metil civanın immün sistem üzerine baskılayıcı bir etkisinin olduğu savunulmaktadır[6].

Organik civa formları yağda eriyebilir. Kan-beyin bariyerini ve plesantayı kolaylıkla geçebilirler. GİS (gastrointestinal sistem sindirim sistemi) kanalından en hızlı emilen civa formudur ve metalik civada olduğu gibi organik civa buharı deriden ve akciğerlerden emilebilir. Sadece metil civa deriden emilemez. GİS kanalından emilen metil **civa** hızla kana geçer ve **beyinde merkurik civaya (inorganik form)** dönüşür. Bu dönüşüm oldukça yavaştır. Etil civa içeren **Thimerosal** ise beyin tarafından alınır ve önce **etil civaya** sonra **merkurik civaya** dönüşür. Bu dönüşüm daha hızlıdır. En önemli **hedef organ beyindir**. Dışarıdan merkurik civa şeklinde alındığında en önemli hedef organ ise böbrektir[10].

hedef organlar ;

1. Civa buharı: Beyin ve böbrekler
2. Metil civa : Beyin
3. Thimerasol: Beyin
4. Merkurik civa(civa klorid):Böbrek [10]

Toksisite Dereceleri: HG<sup>0</sup><HG<sup>+2</sup><Metil Civa-Etil Civa

Bu bileşimin (Thimerosal) aşılarıdaki ve diğer ürünlerdeki miktarı; %0.0003-0.01 (30-100 µg/ml ) dır. Ve ortalama her dozda 12,5–25µg arasında civa bulunur[5, 11,12]. İnorganik civa membran ve DNA hasarlarına neden olmaktadır[13,14]. Hücre kültürlerinde mutajeniteye ve DNA kırıklarına neden olduğu bulunmuştur[15].

Etil civa pek çok organdaki inorganik civa miktarını arttırabilir. Etil civa hücre membranını hızlı bir şekilde geçer ve beyin gibi hayati organlarda inorganik civaya dönüşerek birikir[16].

7 Temmuz 1999 da AAP (Amerikan Pedriatri Akademisi=Amerikan Academy Of Pediatrics) ve USPHS (Amerikan Halk Sağlığı Servisi=Healthy Lifestyles Program of the Commissioned Corps of the United States Public Health Service) tarafından; civa içeren bir bileşik olan Thimerosa'lin aşılarından çıkarılması konusunda çağrı yapılmıştır[17]. Bu olaydan sonra FDA (Gıda Ve İlaç Ajansı =Food And Drug Administration) tarafından bir risk değerlendirmesi yapılmıştır.

Bu değerlendirme; riskin tanımlanması, doz-cevap değerlendirilmesi, maruziyetin değerlendirilmesi ve riskin karakterizasyonu konularını içermektedir. FDAYA ek olarak EPA (U.S. Enviromental Protection Agency=Çevre Koruma Ajansı), WHO (Dünya Sağlık Örgütü=World Health Organization ), ATSDR(Toksik Maddeler Ve Hasar Tescili Ajansı= Agency for Toxic Substances and Disease Registry) tarafından da çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar toparlandığında şu sonuçlar elde edilmiştir;

- Akut yüksek dozda; nörotoksisite ve nefrotoksisite
- Düşük dozda; azalan etkiler (metil civa etil civadan daha toksik)
- Kronik düşük dozda ; nörolojik anomaliler gözlemlenmiş ve çalışmalarda gecikmiş tip hipersensitivity (aşırı duyarlılık) ortaya konulmuştur[18].

Yanıtlar; immünizasyon (aşılama) tablosuna, aşının formülasyonuna ve çocuğun ağırlığına bağlıdır. Ayrıca bu etkiler ilk altı ay boyunca gitgide artmaktadır[18].

Thimerosal ile ilgili yapılan hayvan çalışmalarına göre;

Squirrel Monkey' lerine düşük dozda (1-6µg/kg/ gün ) Thimerosal verildiğinde; bunun inorganik civa dönüştüğü görülmüştür. Bu civa yüksek miktarda böbrekte ve nisbeten daha düşük miktarda beyinde saptanmıştır. Hem böbrekte ve hem de beyin de histopatolojik (dokusal) değişimler belirtilmiştir[8].

Tavşan ve sıçanlara 7 gün süreyle %1 lik solüsyonlar şeklinde Thimerosal verildiğinde; maksimum tolerans düzeyinin, sıçanlarda 45mg/kg, tavşanlarda ise 20 mg/kg saptanmış ayrıca bazı tavşan türlerinde Thimerosal'in etkileri böbreklerde ve intestinal kanalda lezyonlar şeklinde kendini göstermiştir[19].

4 köpeğe kilogramları başına 2mg lık Thimerosal %1 lik solüsyonlar halinde 7 gün verilip otopsileri incelendiğinde; minör mikroskobik doku değişimleri gözlemlenmiştir. Aynı solüsyon güvercinlere intraperitoneal olarak verildiğinde; şiddetli ağrılara ve strese neden olmuştur[19].

Karsinojenik çalışmalarda; Fischer ratlarında ; subkutan olarak 2 haftalık ratlara 1 yıl boyunca 30-1000µg/kg lık Thimerosal uygulamaları sonucunda kontrol gurubuna kıyasla %5-14 arasında ağırlık kaybı gözlenmiştir[20].

Magos ve ark.[16], yetişkin ratlara 5 günlük eş dozda etil ve metil civa uyguladıklarında ( 8-9,6mg/kg ); etil ve metil civanın nörotoksitesisi benzer olmakla birlikte beyinde etil civa hasarı daha fazla gözlenmiştir[16].

Götz ve ark[4] in vitro olarak Thimerosal'i; cytochalasin-B blok mikronukleus tekniğiyle ,insan lenfositlerinde çalışmışlardır. Çalışmalarını Glutatyon-S-Transferaz enziminden yola çıkarak yürütmüşlerdir. Bu enzim; Thimerosal'in ve Thimerosal'in metabolitlerinin detoksifikasyonunda (toksisitesinin giderilmesinde) görev almaktadır. 0,6µg/ml lik Thimerosal içeren düzenekte mikronukleus seviyesinde negatif kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı bir artış meydana gelmiştir[4].

Baskin ve ark.[21], tarafından Thimerosal'in toksisitesi in vitro olarak; insan serebral kortikal nöronlarında ve normal fibroblast hücrelerinde araştırılmıştır. Floresan tekniği ile 6-diamino-2-fenilindole dihidroklorid (DAPI) ile boyanan hücrelerde DNA hasarları belirlenmiş ve ölü hücreler sayılmıştır. Thimerosal'in 125nM den 250µM e kadar konsantrasyonlarında çalışılmış ve floresanla işaretlenen nukleuslar analiz edilmiştir. Thimerosal'in toksisitesi elle yapılan sayımlarda 2 µM den itibaren gözlemlenirken Mikro Plate Reader yöntemiyle ise 1 µM den itibaren tanımlanmıştır. Toksisitenin bu ilk işareti inkübasyondan iki saat sonraki gözlemlerde DAPI ya karşı membran permabilitesinin yükselmesiyle ortaya çıkmıştır. Altı saatlik inkübasyondan sonra ise DNA kırıkları, caspase-3-aktivasyonu ve morfolojik olarak apoptozis işaretlerinin gelişimiyle sonuçlanmıştır. Ve onlar sonuç olarak Thimerosal'in toksisitesinin hesaplanmasında floresan tekniğinin kullanılmasını çok avantajlı bulmuşlardır [21].

Gaiger ve ark. [22]' a göre çocuklar Thimerosal'e çocukluk çağı aşuları yoluyla (TCVs) maruz kaldıklarını belirterek , bu maruziyet ve sinir sistemi gelişim bozuklukları arasındaki bağlantıyı ekolojik bir araştırma çalışmasıyla açıklamışlardır. İki farklı çalışma yapılmıştır. birinci çalışmada ; 1997-2001 yılları arasında kullanılan timerosalsiz Difteri- Tetanoz- Acellular Pertuccis(DTaP) (difteri ve tetanoz toksinleri ve hücresel olmayan boğmaca aşuları) aşularıyla ,timerosal içeren DTaP aşularının maruziyet etkileri karşılaştırılmış ve Thimerosal'li aşılara maruz kalanlarda otizm oranının arttığını, konuşma bozukluğu, mental retardasyon, kişilik bozukluğu oranlarının arttığını rapor etmişlerdir; ikinci çalışmada ise 1992-1997 arasında doğan ve 1,2,3 ve 6. aylarında Thimerosal içeren aşılara maruz kalan çocuklarda sinir sistemi gelişim geriliğini araştırmışlardır. Buradada yine benzer sonuçlar bulmuşlardır[22].

Michelle ve ark.[23], in vitro ortamda; insan neuroblastoma (SK-N-SH) hücre dizilerinde mitokondri aracılığıyla Thimerosal bağımlı apoptozisi araştırmışlardır. 5 µM Thimerosal ile muamele edilen insan neuroblastoma hücrelerinin ikinci saatte büzüldükleri ve apoptozis belirtisi bazı değişimler gözlemlemişlerdir. Thimerosal muamelesinden sonra canlı hücreler MTT testi ile laktat dehidrogenaz aktivitesi

(LDH) bakılarak sayılmıştır. 24 saatlik Thimerosal muameleli hücrelerde hem apoptozis hemde oncosis ve necrosis gözlenmiştir. apoptotik yolağa sapılmasında etmen; mitokondrial kaskadın harekete geçmesidir. Hem organik hem de inorganik civa moleküllerinin depolandığı organel mitokondridir. Merkürü molekülünün artışıyla mitokondriden cytochrom-c akışı olur. Uygulamanın 8. saatinde Kaspaz-9 parçalanır. Kaspaz-3 aktivitesinin maksimuma ulaşmasını takiben 24. saat de poly(ADP-riboz) polimeraz (PARP) 85kDa luk fragmentten ayrılır. Bu işaretlerden sonra mitokondri aracılığı ile oluşan apoptozis başlamış olur[23].

Seunghwan ve ark. [24] ; Hela –S epitel hücrelerinde Thimerosal bağımlı sitotoksositeyi çalışmışlardır. Bu çalışma ile sitotoksitedeki aracı olayın ROS (reaktif oksijen türevleri) olduğu saptanmıştır. Thimerosal'daki artışa bağlı olarak hücrelerin yaşayabilirliği azalmış, hücre içi glutatyon seviyesi düşmüş, kaspaz-3 aktivasyonunun artışıyla apoptozis oranı artmış ve genomik DNA parçacıklarının artışıyla mikronukleus oranı artmıştır. Testte Thimerosal'le muameleden sonra ölü hücreler typan blue exclusion testiyle sayılmıştır[24].

Kim ve ark. [25]'a göre timerosalin toksisitesi genelde ROS oluşturmaktan kaynaklanmaktadır. Kültüre alınan memeli hücrelerinde; Thimerosal'in, ROS lardan özellikle hidrojen peroksiti arttırdığını belirtmişlerdir. Ancak hücredeki morfolojik değişimler ve hasar sadece hidrojen peroksit değil diğer reaktif oksijen türevlerinin ortaklaşa çalışmasıyla olmaktadır [25].

Silva ve ark. [26]; insan lenfosit hücrelerinde, civa ve metil civanın hücreler üzerindeki toksik etkilerini mikronukleus ve kromozom aberasyonu tekniğiyle çalışmışlar ve her iki bileşiğin de 0,1-1000µg/ml dozlarında negatif kontrollere kıyasla anlamlı değişiklikler saptamışlardır[26].

Havarinasab ve Hultman [6]' in derledikleri çalışmalarına göre; hem organik etil civa (EtHg) hemde organik metil civa (MtHg) molekülleri inorganik civa ya göre immün sistem üzerinde daha baskılayıcı bir etkiye sahiptir. İnorganik civa ise; civa duyarlı immün sistemle etkileşime girerek immün sistemi uyarır. Ayrıca bu molekül

antinukleolar antikor hedefli fibrilleri ve IQ (sistemik immün kompleksi) ile etkileşime girebilir. İşte bu duruma genel olarak; HgIA (Hg-bağımlı otoimmünite) sendromu denir.

Duyarlı genotipe sahip farelerle son zamanlarda yapılan çalışmalara göre; eş dozda Hg ve MeHg ile yapılan araştırmalarda; inorganik civa immün sistem bileşenleriyle daha hızlı etkileşime girmektedir. Organik civanın immün sistemi etkilemesi için öncelikle inorganik civaya dönüşmesi gerekmektedir[6].

2001 de IOM (Institute Of Medicine=Uluslararası Tıp Enstitüsü) toplantısında timerosalin doğrudan olarak kalp sinir sistemi bozuklukları üzerinde etkisinin bulunup bulunmadığını tartışmışlar ancak bir sonuca varamamışlardır. Bu olaydan sonra ilk kez Mark R. Geier ve David R.Geier (2003) tarafından epidemiyolojik çalışma yapılmıştır. 1992-2000 yılları arasında; Thimerosal içeren difteri-tetanoz-tüm hücre boğmaca aşıları (DTWCP) ve Thimerosal içeren DTaP ile Thimerosal içermeyen DTaP aşılara maruz kalan çocuklar karşılaştırılmıştır. Aşılarla alınan civa dozuna bağlı olarak kalp hasarları ve sinir sistemi gelişim gerilikleri ortaya çıkmıştır. Onlarla göre çocukluk çağında aşılarla alınan civanın her 75-100µg 1 gelişme geriliklerinde 2-6 kata kadar bir gerilemeye neden olmaktadır[27].

Wilson ve ark[28]; Thimerosal'i ve fenolü bir parazit olan Leishmania'nın kullanıldığı Montenegro Deri Testi ile test etmişler ve ikisinin benzer yanıtlar oluşturduklarını rapor etmişlerdir[28].

Toshiko ve ark.[3]; aşılarda koruyucu olarak kullanılan timerosalin iki haftalık ratların beyin nöronları üzerindeki etkileri flov sitometri (Flow Cytometer) yöntemi kullanılarak floresan boyalarla saptanmıştır. Thimerosal ve metil merkürü kullanılmıştır. Her iki maddeninde 0,3 den 10µM a kadar olan konsantrasyonları hücre içi kalsiyum Ca<sup>+2</sup> seviyesini anlamlı derecede arttırmıştır. 10µM Thimerosal Ca<sup>+2</sup> seviyesini 10µM metil merkürüye göre daha az arttırmıştır. Ancak aradaki bu fark anlamlı olacak kadar bariz değildir. Ca<sup>+2</sup> seviyesindeki bu artış iki şekilde

meydana gelmiş olabilir. Ya uygulanan ajanlar hücre zarının geçirgenliğini arttırmışlardır. Ya da hücre içindeki stok  $Ca^{+2}$  u serbest hale dönüştürmüşlerdir[3] .

Kelley ve ark.[29] Thimerosal'ı in-vitro ortamda SK-N-SH hücreleri ile 0-10  $\mu$ M arasında muamele ettiklerinde; doza bağlı olarak; hücre içi kalsiyum seviyesinde ve ROS da artış gözlenmiş ve mitokondri tetikli apoptozis yolağının harekete geçtiği tesbit edilmiştir. Ve bu olayda hücre içerisinde en çok etkilenen organelin mitokondri olduğu gözlemlenmiştir[29].

Michael E. Pichichero ve ark.[30] 'a göre İnsanlar balık yiyerek civaya azda olsa maruz kalıyorlar. Tuna balıklarının 171gr'ında 2-127  $\mu$ g civa bulunmaktadır.

Ueha-Ishibashi ve ark. [31] tarafından genç sıçanların timus bezi lenfositlerinde Thimerosal'in sitotoksik etkileri incelenmiştir. Floresan prob kullanılarak sitometrik yöntemle hücre içi kalsiyum konsantrasyonu ve membran potansiyeli ölçülmüş apoptotik hücreler ve ölü hücreler sayılmıştır. 3 $\mu$ M Thimerosal'le 60 dk inkübasyon yapıldığında membran geçirgenliğinde düzensizlikler ve hücre ölümleri negatif kontrollere göre anlamlı düzeyde artmıştır.

## 2.2.AŞILAR VE THİMEROSAL

Çocuk aşılarındaki Thimerosal miktarı WHO tarafından düzenlenir[2]. Bu miktarlar;

Hepatit-B; 25  $\mu$ g (12,5  $\mu$ g civa)

Haemophilus influenza-B; 50  $\mu$ g (25  $\mu$ g civa)

Difteri tetanoz boğmaca (tüm hücre ya da hücresele); 50  $\mu$ g (25  $\mu$ g civa)

Aşılarla birlikte alınan Thimerosal miktarı;

Doğumda; 12,5 $\mu$ g

2. ayda; 62,5  $\mu$ g

4.ayda; 50  $\mu$ g

6. ayda; 62,5 µg  
18. ayda; 50 µg,  
Toplamda; 237,5 µg dır.

Yine ek olarak bazı populasyonlarda yaşamın ilk 18 ayında toplam üç influenza (grip) aşısı yapılmaktadır. Böylece 18 aylık toplam Thimerosal miktarı 275 µg a çıkmaktadır[22].

1980'li yılların ortalarında sadece karma (difteri-tetanoz-boğmaca), çocuk felci ve kızamık aşuları uygulanıyordu ve bunlardan sadece karma aşı cıva içermektedir. İki yaşına kadar 4 kere aşılanan çocuk ortalama (4x25)= 100 µg thimerosal almaktaydı. 1990 yılların başında menenjit (HiB) ve sarılık (Hepatit B) aşuları da rutin aşular arasına katılmaktaydı. Böylece 2 yaşındaki bir çocuğun enjeksiyon yolu ile aldığı cıva miktarı 100 µg'dan 237.5 µg'a yükselmiş oldu. Çoklu dozlarla yapılan toplu aşılamalarda ise risk daha da büyümektedir. Çünkü aşı şişesi iyi çalkalanmadıysa şişenin sonunda kalan bölümü alanlardaki cıva miktarı daha da yükselmektedir [32].

Çizelge 2. 1. Aşıların içerdiği cıva miktarları [32].

| Yıl           | Aşı                 | Cıva/doz | Doz sayısı | Toplam cıva | Kümülatif cıva |
|---------------|---------------------|----------|------------|-------------|----------------|
| 1980 ortaları | Karma (DTP)         | 25 µg    | 4          | 100 µg      | 100 µg         |
| 1980 sonları  | Menenjit (HiB)      | 25 µg    | 4          | 100 µg      | 200 µg         |
| 1990 başları  | Sarılık (Hepatit B) | 12,5 µg  | 3          | 37,5 µg     | 237,5 µg       |

Thimerosal sadece karma aşı, hepatit (sarılık) aşısı, HiB (menenjit) aşısı ve grip aşılarında bulunabilmektedir. Bakanlığın sağlık ocaklarında yaptırdığı karma aşı, hepatit aşısı, menenjit aşısı Thimerosal içerirken, eczanelerde satılan bu aşıların çoğu artık Thimerosal içermemektedir. Grip aşısı ise nerede satılırsa satılsın halen Thimerosal içermektedir. Ağızdan verilen çocuk felci aşısı ve kızamık aşısı Thimerosal içermemektedir[32].



Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü tarafından yayınlanan habere göre "Türkiye'de halen DBT (difteri-boğmaca-tetano), Hepatit B, TT (tetano), Td (tetano, difteri), kızamık, OPV (çocuk felci), BCG (verem) aşılarında koruyucu olarak Thimerosal bulunmaktadır". Genel olarak aşılarda adjuvan olarak alüminyum hidroksit, koruyucu olarak Thimerosal ile antibiyotikler ve stabilizatör olarak da magnezyum klorid bulunmaktadır. Sağlık Bakanlığı'na tedarik edilen Kızamık, OPV, BCG ve kuduz aşılarında koruyucu olarak Thimerosal bulunmamaktadır[32]

Çizelge 2.2. 1999'da Amerika'da bir bireyin yaşamının ilk 6 ayında, çocukluk çağı aşılarındaki Thimerosal vasıtasıyla maruz kaldıkları civa miktarı[5].

| AŞI                 | MİNİMUM CİVA DOZU | MAKSİMUM CİVA DOZU   |
|---------------------|-------------------|----------------------|
| DTaP X 3            | 0µg               | 75 µg                |
| Hib X 3             | 0µg               | 75 µg                |
| Hepatitis B X 3     | 0µg               | 37.5 µg              |
| Hib-Hepatitis B X 2 | 0 µg              | Firmaya göre değişir |
| [Influenza]         | [12.5 µg]         | [12.5 µg]            |
| TOPLAM              | [12.5 µg]         | 187.5 µg [200 µ]     |

Çizelge 2.3. Bir bireyin yaşamının ilk 2 yılında, çocukluk çağı aşılarındaki Thimerosal yoluyla maruz kaldığı civa miktarları[5].

| AŞI                 | MİNİMUM CİVA DOZU | MAKSİMUM CİVA DOZU   |
|---------------------|-------------------|----------------------|
| DTaP X 4            | 0 µg              | 100 µg               |
| Hib X 4             | 0 µg              | 100 µg               |
| Hepatitis B X 3     | 0 µg              | 37.5 µg              |
| Hib-Hepatitis B X 3 | 0 µg              | Firmaya göre değişir |
| [Influenza] X 3     | [37,5 µg]         | [37,5 µg]            |
| TOPLAM              | [37,5 µg]         | 237.5 µg [275 µg ]   |

Thimerosal ile ilgili tartışmalar Amerikan başkanı Kenedy'nin yeğeni tarafından bazı aşıların içinde bulunan cıvanın (Thimerosal) otizme neden

olabileceği fikrinin savunulmasıyla başlamış ardından tıp dünyasında büyük bir tartışma başlamıştır. Cıva bileşiklerinin yağda erime özelliği fazladır. Beyin ve sinir sistemi hücrelerinin büyük bir bölümü yağdan oluştuğu için cıvadan en çok onlar zarar görürler. Cıva özellikle zar yapısındaki proteinlere bağlanarak hücre zarının işlevini bozar. Akıcılığı kaybolan zar sertleşerek hücrenin çabuk yaşlanmasına neden olur. Beyin hücrelerinde nörotübül denilen yapılar vardır. Cıva, nörotübül yapımını sağlayan tübülün yapısını bozmaktadır. 7 Temmuz 1999'da Amerika AAP ve PHS bileşik bir toplantı yaparak kesin bir kanıt olmamasına rağmen bir önlem olarak Thimerosal'in (cıva) aşılarından çıkartılmasına karar vermişlerdir[12,17]. O tarihten itibaren ABD'de cıva kademeli olarak aşılarından çıkartılmıştır [9].

Çeşitli kurumlarca hesaplanan günlük cıva alım limiti[5];

EPA ; 0,1 µg/kg vücut ağırlığı/gün

ATSDR; 0,3 µg/kg vücut ağırlığı/gün

FDA; 0,4 µg/kg vücut ağırlığı/gün

WHO; 3,3 µg/kg vücut ağırlığı/gün[5,18]

Michael ve ark.[30] DTaP, hepatid-B, İnfluenza-B tipi aşılarla maruz kalan, altı aylık ve daha küçük 40 çocuk ve aynı aşılarla Thimerosal'siz maruz kalan 16 çocuktan, kan, idrar ve dışkı örnekleri alıp cıva ölçümleri yapmışlardır. Ölçümler aşılardan sonraki 3–28 günler arasında yapılmıştır. Organik ve inorganik toplam cıva miktarı; Cold Vapour Atomic Absorbtion yöntemiyle ölçülmüştür[26].

Çocukların aşılarla maruz kaldıkları cıva miktarları;

2 aylıklarda; 45,6µg (37,5µg–62,5µg)

6 aylıklarda; 111,3µg (87,5µg–175µg)[30].

Kan ölçümlerinde tesbit edilen cıva miktarı;

2 aylıklarda; 3,75–20,55nM/L arasında değişirken,

6 aylıklarda; tüm değerler 7,5 nM/L nin üzerinde çıkmıştır.

İdrar değerleri kana göre daha düşük çıkarken dışkı değerleri daha yüksek çıkmıştır.

2 aylıklarda; 82ng/ g kuru dışkı ağırlığı

6 aylıklarda; 58ng/ g kuru dışkı ağırlığı[30].

Timerosal'in kandaki yarı ömrünün 7 gün olduğu tesbit edilmiştir.

Civanın toksisitesi;

Civanın formuna

Dozuna

Giriş yoluna

Maruziyet süresine bağlıdır[30].

### 2.3.ÇEŞİTLİ CİVA FORMLARININ ORGANİZMA ÜZERİNE ZARARLI ETKİLERİ

Civa özellikle; karaciğer, böbrek, immun sistem hücreleri, merkezi sinir sistemi, periferik sinir sistemi ve beyin üzerine toksik etkilidir. Civa organizmada 3 şekilde zararlı etki oluşturur[10].

1. Civa; enzimlerin sülfidril gruplarına bağlanabilir.
2. Proteinlerin tersiyer yapılarını değiştirebilir; bu durumda yeni oluşan proteinler organizma için immunojen hale gelir ve B lenfosit proliferasyonuna neden olur.
3. Organik civa formları lipofilik organlarda birikebilir (Örneğin; beyin). Miyelin kılıflarda biriken civa nörotoksik etkilere neden olur[10].

Organik ve metalik civa formları beyinde inorganik civaya çevrilerek depo edilir. Beyinde depo edilmiş inorganik civanın yarı ömrü yaklaşık 20 yıldır. Çeşitli dönemlerde depo edildiği yerlerden kana salınabilir. Civa kan beyin bariyerini, transport mekanizmalarını ve nöronların tübül protein yapılarını tahrip eder. Nörotoksik etkilidir. Merkezi sinir sisteminde  $Ca^{+2}$  bağımlı nörotransmitterlerin salınmasını inhibe eder. 1982 yılında Kuzey Carolina Duke Üniversitesi Farmakoloji bölümünde yapılan bir çalışmada aynı günde doğan sıçanlara 21 gün boyunca 1 mg/kg, 2,5 mg/kg ve 5mg/kg metil civa içme suyu ile verilmiş. Günde 5 mg/kg

dozda metil cıvaya maruz kalan 5 günlük sıçanlarda dopamin baskılanmasının %58, 2,5 mg/kg metilcıvaya maruz kalan 10 günlük ratlarda ise %15 azaldığı izlenmiştir. Ancak cıva alımı kesildiğinde dopamin baskılanması %50-70 oranında artmıştır. Nörotransmitterler ile ilgili biyokimyasal anormallikler merkezi sinir sistemi gelişimini baskılayan dozlardan daha düşük dozlarda izlenebildiği gösterilmiştir. Gelişim ile ilgili bozukluklar genellikle 5mg/kg 'ın üstündeki dozlarda gözlenmiştir. Cıva merkezi sinir sisteminde özellikle; visual korteks, cerebellum, dorsal kök ganglionu üzerine toksik etkilidir. Ve etkiler şu yollarla ortaya çıkmaktadır[10].

1. Nöronlarda protein sentezini inhibe eder.
2. Mitokondri fonksiyonlarını bozar.
3. İyon kanallarını etkiler.
4. Nörotransmitter salınmasını inhibe eder.
5. Nöronları hücre membranlarındaki yapısal proteinleri tahrip eder. [10]

#### 2.4. THİMEROSAL'İN METABOLİZMASI

Başta aşılarda olmak üzere pek çok biyolojik üründe antifungal ve antibakterial olarak kullanılan Thimerosal; kompleks sodyum tuzları vasıtasıyla; thiosalisilik asit (TSA) ve etil cıva (EtHg) tarafından oluşmaktadır. Cıva bileşiklerinin yağda erime özelliği fazladır. Beyin ve sinir sistemi hücrelerinin büyük bir bölümü yağdan oluştuğu için cıvadan en çok onlar zarar görürler.

Thimerosalin biyotransformasyonunun (metabolizmasının) aydınlatılmasında;

-Atomik Absorbsiyon Yöntemi[33]

-Kalorimetri Yöntemi[34]

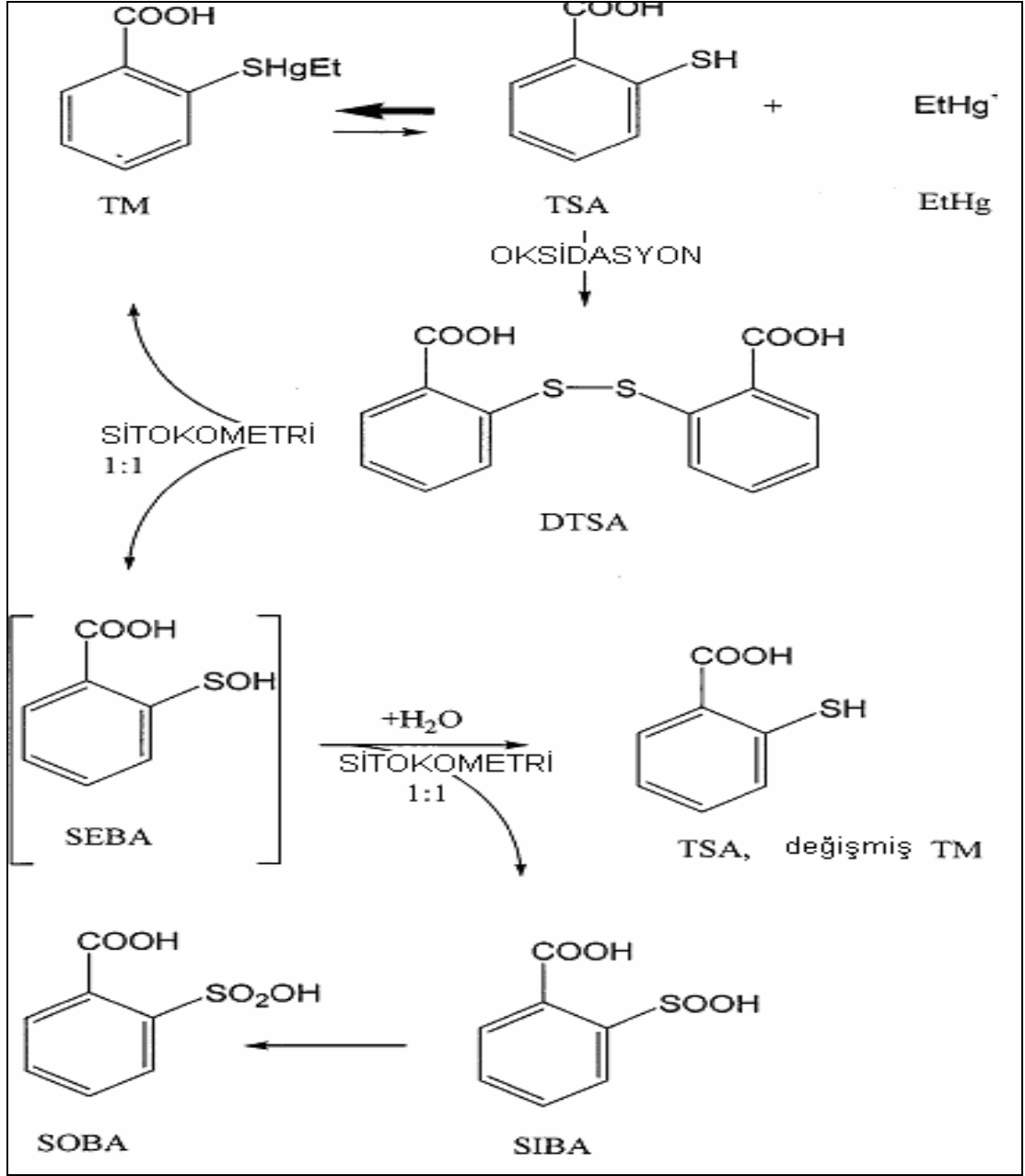
-Yüksek Performans Likid Kromatografisi (HPLC)

yöntemleri kullanılmaktadır[35,36...43].

Bunlardan atomik absorpsiyon yöntemi ve kalorimetri yöntemi toplam etil civa miktarının ölçümüne dayalı iş görmektedir. HPLC ise TM ( Thimerosal), TSA (tiosalisilik asit), DTSA (ditiosalisilik asit) in birincil dönüşüm ürünlerinin miktarını saptamaya yarayan bir testtir[44].

1,5 mol Thimerosal = 1 mol ditiosalisilik asit + 0,5 mol 2-sulfo benzoik asit

DTSA oluşurken TSA miktarı gitgide azalmaktadır. DTSA diğer bileşiklerle reaksiyona girebilen bir moleküldür, ama en reaktif olanı etil civa molekülüdür. Bunun kardeş molekülü olan metil civanın reaktivitesi ve çevresel toksisitesinin bulunduğu saptanmıştır. Etil civa da yine benzer karakterdedir ve kompleks oluşumlarda görev alabildiği gösterilmiştir. Şekil 2.2. Thimerosal'in metabolizmasını göstermektedir.[44].



Şekil; 2.2. Thimerosal'ın vücuttaki dönüşümü[46].

TM, Thimerosal

TSA, Tiosalisilik asit

EtHg, Etil civa iyonu

D TSA, Ditosalisilik asit

SEBA, 2-sulfenobenzoik asit

SIBA, 2-sulfinoibenzoik asit

SOBA, 2-sulfobenzoik asit

Carty ve ark. [45]; 1979 daki araştırmalarına göre ne etil nede metil civa; sistein gruplarıyla bağ yapmamaktadır. Buna rağmen ditiosalisilik asit ve etil civa kendi aralarında, karanlık ortam ve oda sıcaklığında ph 7 de çok hızlı bir Şekilde reaksiyona girmektedir[45].

## 2.5. THİMEROSAL'İN BEYNİ ETKİLEMESİNDE GLUTATYONUN KORUYUCU ROLÜ

Thimerosal'in %49,5 oranında etil civa içeren ve çocukluk ağı ile grip aşıalarında koruyucu olarak kullanılan bir madde olduğu bilinmektedir. Çocukluk ağı ise beyin gelişiminde önemli bir dönemdir. Bu maddenin beyin gelişimini engelleyen nörotoksik bir ajan olduğu gösterilmiştir çünkü civa molekülü thiol guruplarına (sulfhydril –SH ) , thiol bağımlı antioksidanlara, glutatyona (GSH) a karşı affinitesi yüksek bir moleküldür. Sisteinden türevlenen glutasyon; organik(etil-metil civa) ya da inorganik civa gibi ağır metalleri taşıyan molekülleri detoksifiye edebilecek aktif tiol grupları taşırlar. Yine ek olarak hücre içi savunma sistemini baskılamaktadır[47]

Neuroblastoma hücreleri ve glia hücreleri kültüre alındığında GSH seviyesinin glia hücrelerine oranla neuroblastoma hücrelerinde in vivo ya göre düştüğü, GSH seviyesinin ise arttığını saptamışlardır. Her iki hücre dizisinde de Thimerosal bağımlı sitotoksisite meydana gelmiştir. 100µM glutasyon etil esteri ya da N-asetil sistein (NAC) ile muamele edilen her iki tip hücrede de hücre içi GSH seviyesinin yükseldiği grlmştir. Yine bu hücre serileri glutasyon etil esterleriyle ya da NAC ile muamele edildiğinde 15µM lk Thimerosal'in etkisini önlemiştir[47].

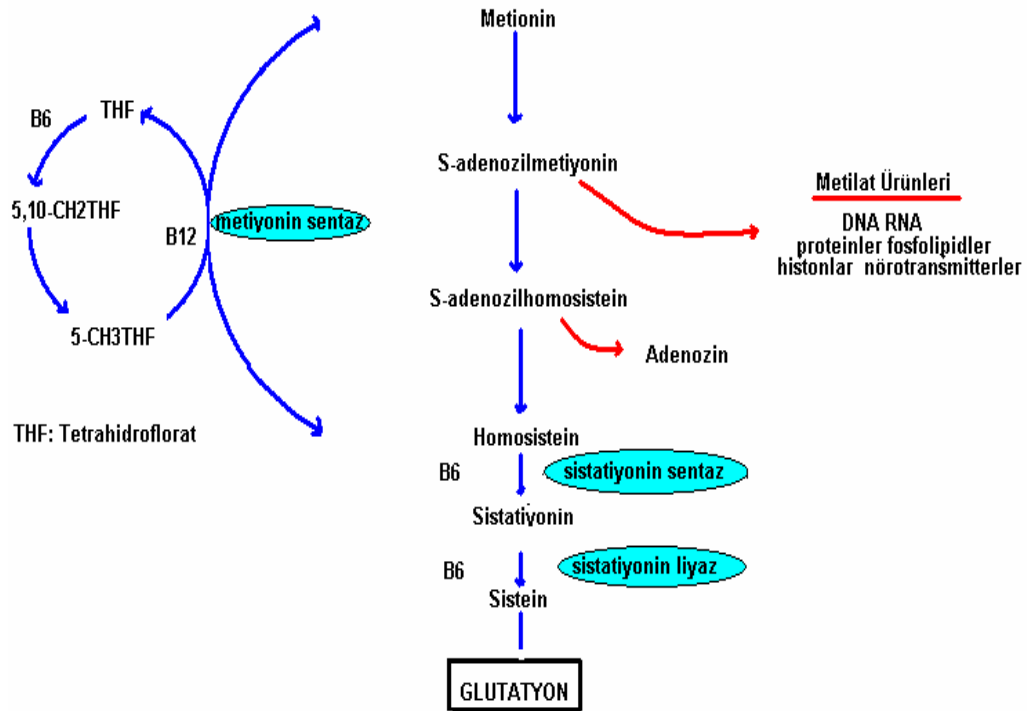
Thimerosal pek çok çocukluk ağı aşılarından çıkarılmasına rağmen halen grip aşılarıyla hamilelere ve gelişmekte olan toplumlardaki çocuklara verilmektedir. Çocukların ilk 18 aylarında; kilogramları başına 200µg/kg Thimerosal'e maruz kaldıkları bildirilmektedir[5].

Sanfelu [48]' e göre metil civanın astrositler ve nöronlar üzerindeki sitotoksisitesi; ROS türevlerinin gelişimine bağlanıyor. ROS oluşumu hücre içi

glutasyon seviyesini düşürmektedir. Organik civa molekülünün sistein, glutamat ve glisin amino asitlerindeki tiol guruplarına (-SH) karşı yüksek ilgisinin olduğu belirtilmiştir[48].

Normalde glutasyonun beyin hücrelerindeki seviyesi mM düzeydedir. Ancak bu seviyede bile güçlü bir antioksidandır. Bu molekülün serbest tiol gurupları ile Thimerosal eşleşecek olursa, glutasyonun antioksidan özelliği kaybolur. Hücre içine ROS girişleri artar. Bu ROS ların hücredeki kritik öneme sahip moleküllerle tepkimeye girerek sitotoksisiteye ve fonksiyonel inaktivasyona neden oldukları rapor edilmiştir.49].

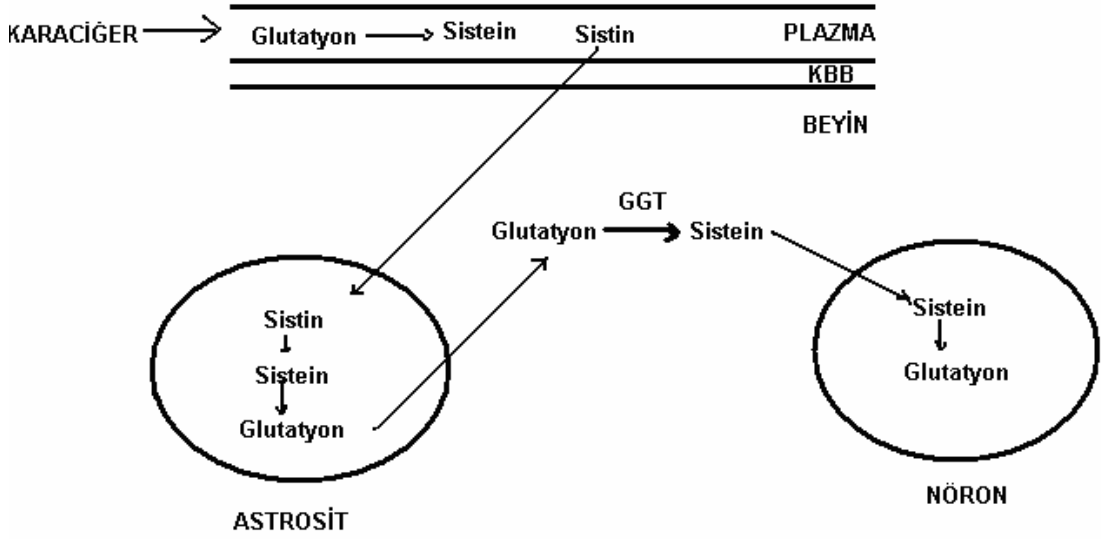
Bir antioksidan olarak glutasyon ve onu bağlayarak inaktive eden Thimerosal için beyin oldukça kritik bir organdır. Çünkü beyinde glutasyon sentezinde görev alan sistein sentetaz enzimi bulunmaz. Beyin sisteini karaciğerden alır. Glutasyonun sentezi şekildeki gibidir[47].



Şekil 2.3. Bir antioksidan olarak glutasyon sentezi[47]



Beyin hücrelerinde cyathionine lyase enzimi bulunmaz. Yani beyin hücreleri sistein sentezleyemez. Beyin hücreleri glutatyon sentezinde kullanacakları sisteini karaciğerden temin ederler. Beynin aksine karaciğer ise transsülfürasyon yoluyla metioninden sistein ve glutatyon sentezler[50,51].



Şekil 2.4. Bir antioksidan olarak glutatyon sentezinde organların rolü[47]

Beyinde glutatyon sentezi için gerekli olan sistein sınırlıdır. Beyin hücrelerinden astrositler ve nöronların; glutatyon sentezinde gerekli olan sistein molekülünün okside ve redükte formlarına karşı ilgileri farklıdır[52,53].

Nöronlar plazmadan sisteinin okside formunu alır, glutatyon sentezi için hızlı bir şekilde redükte forma dönüştürürler. Astrositler ise okside formunu alır ve glutatyonu sentezlerler. Hücre dışı sistein ve hücre içinde sisteinden oluşturulan glutatyon beyin hücrelerinde civa içeren Thimerosal'ın toksisitesini engeller[54,55].

## 2.6. DÜZENSİZLİKLER

### 2.6.1. Genotoksik, Toksik, Mutajenik Etki



Şekil 2.5. Kimyasalların toksik etkilerinin sınıflandırılması [56]

Genotoksik Etki; Genotoksik Ajanlar hücre DNA'sı üzerinde mutasyon yapıcı, kanserojen veya insan ya da hayvanlarda düşüğe neden olabilen maddelerdir. Farmasotik ve kimyasal maddeler, kanser tedavisinde kullanılan sitotoksik (antineoplastik) ürünler ve radyoaktif materyali ihtiva eden atıklar ile bu tür ajanlarla tedavi gören hastaların idrar ve dışkı gibi vücut atıkları genotoksisiteye sebep olabilir[57].

Mutajenik Etki; İlaçların veya radyasyonun hücre çekirdeğinde DNA moleküllerinde oluşturduğu kalıcı yapı değişikliklerine mutasyon adı verilir. Mutasyon yapan etkenlere **mutajen**, mutasyon sonucu oluşan yapıya **mutant** denir. Mutasyon genellikle hücre için zararlı olur. Mutajenik ilaçların çoğu karsinojenik ve

teratojenik etkilere de sahiptir, üremeyi de bozarlar. Bu nedenle yeni ilaçların ve diğer kimyasal maddelerin mutajenik etki bakımından araştırılması gerekir. Örneğin alkilleyici kanser ilaçları, kömürün yanma ürünleri, yağın oksitlenme ürünleri mutajenik etki göstermektedir[58].

### 2.6.2. KKD(SCE)

Hücre mitoz bölünme geçireceği zaman; metafaz evresinde; kromozomlar hücrenin ekvator düzleminde dizilmekte ve kardeş kromatidler anafazda zıt kutuplara doğru ayrılmaktadırlar. Yani kardeş kromatidler arasında bir parça değişimi sözkonusu değildir. Ancak bazı kimyasallar özellikle DNA ya bağlanan ya da DNA replikasyonunu etkileyen kimyasallarla DNA'nın her iki zincirinde de kırıklar meydana gelir ve kırılan kromatidler karşılıklı olarak yer değiştirir. Bu olaya Kardeş kromatid değişimi KKD (sister chromatid Exchange (SCE)) denir. KKD (SCE) ile rekombinal tamir ve nokta mutasyonlarının, gen amplifikasyonlarının ve genotoksitesinin tamiri arasında bağlantı bulunmaktadır[59,60].

Tek bir kromozomun iki kromatidinde, DNA'nın homolog bölgelerindeki kırılma ve yeniden birleşme olaylarına KKD denir[61,62].

#### 2.6.2.1. KKD oluş modelleri;

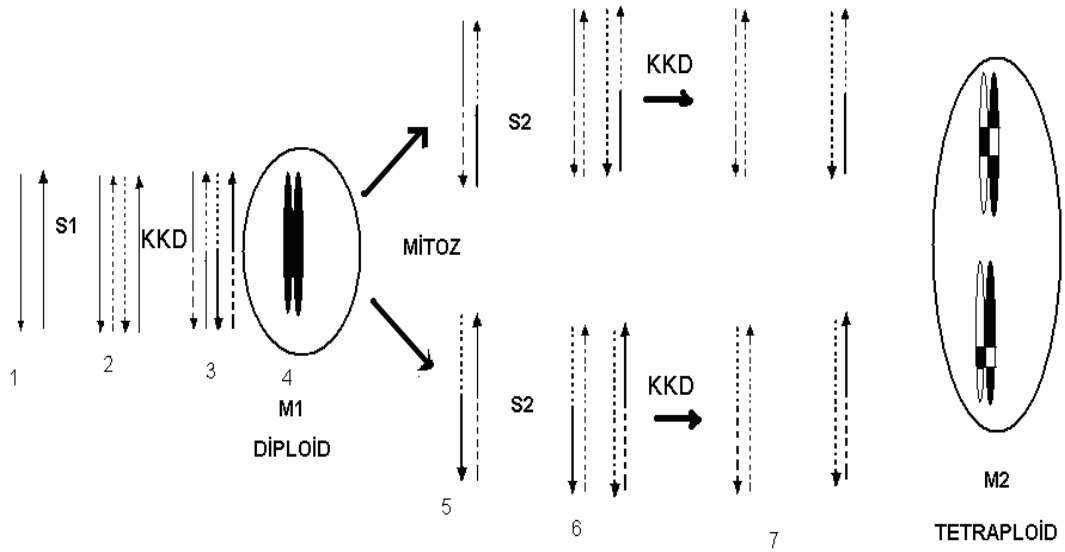
Bu konuda birçok model öne sürülmüştür. Bunlar KKD'yi şu şekilde açıklamaktadırlar[63].

#### ***Genel KKD mekanizması:***

- 1- Diploit hücre (2n) interfaz G1 kromozomu (kalıp DNA düz çizgi ile gösterilmektedir (Şekil 2.6.).
- 2- S1 evresinde DNA sentezi başlamaktadır. Ortamda bulunan BrdU yeni sentez edilen DNA molekülünde timinin yerine geçmektedir (Şekilde BrdU içeren DNA ----- şeklinde gösterilmektedir).
- 3- DNA'da kırılma ve nükleotidler arasında değişim meydana gelmektedir.

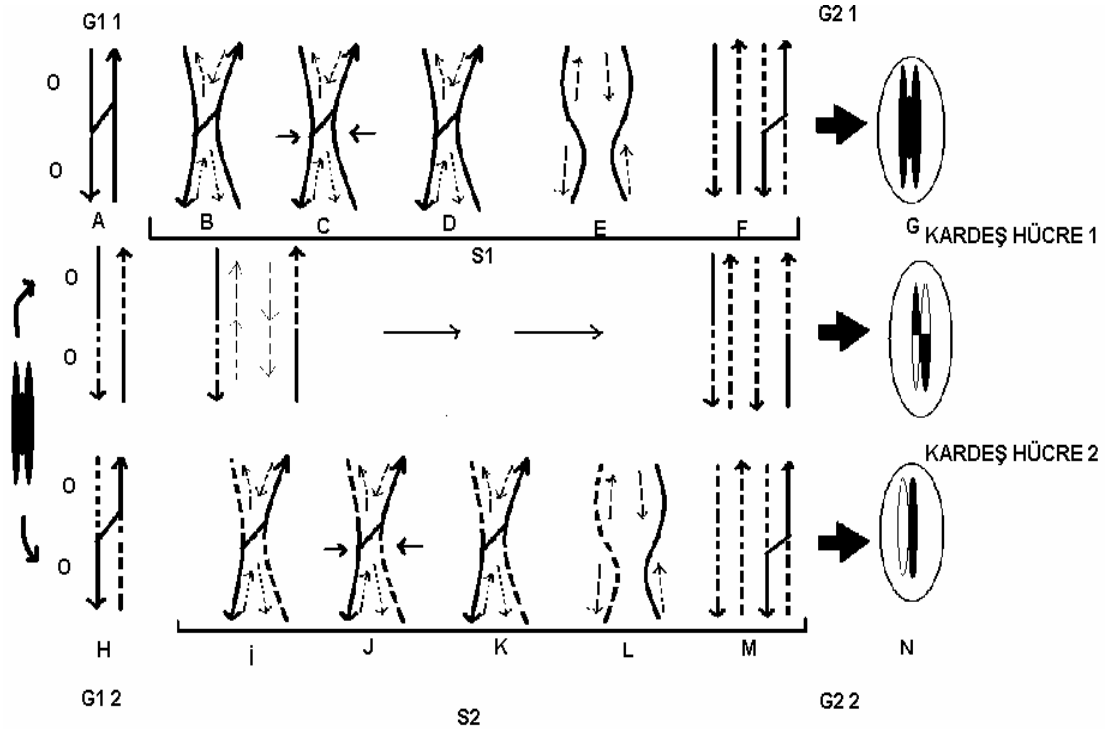
- 4- Birinci mitozda (M1) sadece yeni sentez edilen kromatidlerin sadece birinde BrdU olması nedeniyle FPG boyama tekniği ile koyu boyanmaktadır. M1 diploit hücrelere kolşisin ilave edilerek tetraploit hücreler (4n) elde edilmektedir.
- 5- Tetraploid hücre (4n) interfaz G2 kromozomu
- 6- Semikonservatif DNA sentezi başlamaktadır. Ortamda bulunan BrdU yeni sentez edilen DNA nın yapısına girmektedir. (S2 evresi)
- 7- DNA da kırılma meydana gelmekte ve kromatidler arasında KKD oluşmaktadır.

Tetraploid hücrelerde (4n), M2 mitoz sonunda kardeş kromatidlerin sadece birinde meydana gelen değişim 'tek KKD 'olarak değerlendirilmektedir. Tek KKD nin homolog kromozomların aynı lokusunda meydana geldiği ileri sürülmektedir. M2 mitoz sonunda, kardeş kromatidlerin, herikisinde meydana gelen değişim 'çift KKD olarak değerlendirilmektedir. Çift KKD homolog kromozomların aynı lokuslarında meydana gelmektedir.



Şekil 2.6 Genel KKD oluş mekanizması[60].

**Replikasyon Bypass Modeli:** KKD oluş mekanizmasını açıklayan bir diğer model replikasyon bypass modelidir. Bu model DNA ile çapraz bağlanma yapabilen kimyasal ajanların meydana getirdiği KKD nin oluş mekanizmasını açıklamaktadır[60].



Şekil 2.7. Replikasyon Bypass Modeli[60].

- A- Diploid hücre ( $2n$ ) interfaz G1 kromozomu (kalıp DNA düz çizgi şeklinde gösterilmektedir. Kimyasal ajan DNA ile çapraz bağlanma meydana getirmektedir (Şekil 2.7. )
- B- İki replikasyon orijini 'o' şeklinde gösterilmektedir. BrdU varlığında ilk S1 evresinde iki yönlü semikonservatif DNA sentezi başlamaktadır. (yeni sentez edilen yani BrdU içeren ---- şeklinde gösterilmektedir.
- C- Çapraz bağlantı olan bölgede DNA sentezi meydana gelmemektedir. Sentez okazaki fragmantleri şeklinde devam etmektedir.
- D- Kromatidlerde çapraz bağlantı bölgelerinden kırılma meydana gelmektedir.
- E- DNA da kırılma noktalarında kardeş kromatidler arasında, değişim meydana gelmektedir.
- F- Yeni sentez edilen DNA parçalarının araları tamamlanır ve çift zincirli DNA yapısı meydana gelir. Çapraz bağlanma uzaklaştırılamaması nedeniyle bir çift kromatidin yapısına girmektedir.

- G- Birinci mitozda, yeni sentez edilen kardeş kromatidlerin sadece birinde BrdU olması nedeniyle koyu boyanmaktadır (FPG boyamada).
- H- İkinci mitozda (M2) kardeş kromatidlerin her biri kardeş hücelere ayrılır. Kardeş kromatidlerin bir tanesi çapraz bağlanmayı içermektedir.
- İ- BrdU varlığında S2 evresinde iki yönlü semikonservativ DNA sentezi başlar.
- J- Birinci hücredeki kromatid, çapraz bağlantı içermediği için, replikasyon başlama noktasından DNA sentezi devam etmektedir. İkinci kardeş hücredeki kromatid çapraz bağ içermektedir. DNA iki yönlü okazaki fragmentleri şdevam etmektedir. Çapraz bağlanma bölgesinde DNA sentezi meydana gelmemektedir.
- K- İkinci kardeş hücrede çapraz bağlanma bölgelerinden kırılma meydana gelir.
- L- DNA kırılma noktalarında, kromatidler arasında değişim meydana gelmektedir.
- M- İkinci kardeş hücrede ve birinci kardeş hücrede yeni sentez edilen DNA parçalarının araları tamamlanır ve kromatid yapısı meydana gelir. İkinci kardeş hücrede, çapraz bağlanma uzaklaştırılmadığı için yeni oluşturulan kromatid yapısına girmektedir.
- N- İkinci mitozda FPG boyama yöntemi ile birinci kardeş hücrede tek DNA zincirinin BrdU içermesi koyu renk, her iki DNA zincirinin boya içermesi açık renk boyanmasına neden olmaktadır ve KKD gözlenebilmektedir. İkinci kardeş hücrede Replikasyon Bypass modeline göre; çapraz bağlanma içeren kardeş kromatidlerde sadece bir DNA zinciri bulunmaktadır ve koyu renk boyanmaktadır. Diğer kromatid yapısını oluşturan her iki DNA zinciri BrdU içermekte ve açık renk boyanmaktadır yani kromatid değişimi gözlenmemektedir. Bu modele göre sadece birinci kardeş hücrede KKD gözlenmektedir.

Replikasyon Bypass modeli, DNA ile çapraz bağlanma yapabilen kimyasal ajanların tek KKD oluş mekanizmasını açıklamaktadır. Çift KKD oluş mekanizması bu modelle açıklanamamaktadır[64] .

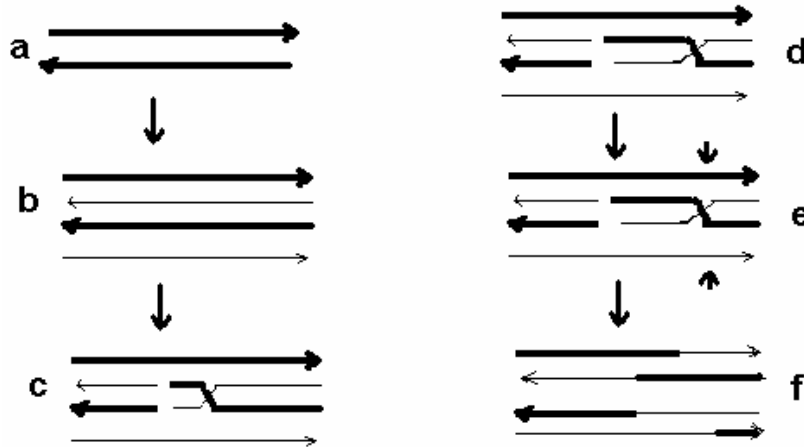
***Holiday modeli:*** Bu modele göre hücrenin BrdU varlığında bir mitoz geçirmesi yeterlidir. Şekli inceleyecek olursak;

- A- Birbirlerini tamamlayan atasal DNA zincirleri kalın çizgi (ağır) şeklinde gösterilmektedir (Şekil 2.8.).
- B- BrdU varlığında yeni DNA sentezi yapılır. BrdU içeren iplik ince çizgiyle gösterilmektedir.
- C- Her bir çift zincirli DNA yapısında kırılma meydana gelmektedir. Crossing-over olayı bu zincirler arasında meydana gelmekte ve zincirler arasında rekombinasyon ile heterodupleks yapı oluşmaktadır.
- D- Rekombinasyon olayı zincirler arasında tekrarlanır.
- E- Kırılmaların dış taraftaki ağır ve hafif zincirlerde meydana gelmesi , rekombinant DNA moleküllerinin oluşmasına neden olmakta ve iki DNA molekülü birbirinden ayrılmaktadır.
- F- Son olarak oluşan rekombinant DNA molekülleri

ağır-ağır-hafif  
hafif-ağır-ağır

hafif-hafif-ağır  
ağır-hafif-hafif

Şeklinde heterodupleks yapılar içermektedir. Bu DNA molekülünde ağır/ağır bölge koyu renk, hafif/hafif açık renk ile boyanmaktadır. Böylece KKD oluşumu meydana gelmektedir[65] .



Şekil 2.8. Holliday modeli[67].

Zakharov ve Egolina, FPG boyama yöntemi ile açık renkte boyanan kromatidlerin koyu renkte olanlardan daha uzun olduklarını saptamışlardır.

Kromatidlerdeki bu uzunluk farkı, protein ile BrdU içeren DNA arasındaki etkileşimin farklı olması nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Proteinler, kromozomların kondensasyonunda ve spiralizasyonunda etkili olmaktadır. Proteinler BrdU içeren DNA ya, BrdU içermeyen DNAdan daha sıkı bağlanmakta ve kromozomların kondensasyonu ile spiralizasyonunu zorlaştırmaktadır. Araştırmacılar BrdU nun kromozomlardaki asıl etkisinin paketleme sırasında olabileceğini açıklamışlardır. BrdU büyük kromozomal yapıyı oluşturan 25nm çapındaki liflerin paketlenmesi sırasında etkili olmaktadır[66] .

#### 2.6.2.2. KKD testi

KKD nin belirlenmesinde KKD (SCE) testi kullanılmakta ve en çok insan periferel lenfositlerinde çalışılmaktadır.

1957 de Taylor ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş mutajenite ve karsinojenite testidir[68].

KKD nin belirlenmesinde en az iki hücre siklusu (döngüsü) gerekmektedir. İnkübasyona alınan lenfositler Go evresindelerken fitohemaglutinin (phytohaemaglutinin) gibi spesifik olmayan bir antijenle bölünmeleri uyarılır. Böylece yeterince mitotik hücre elde edilmektedir. İnkübasyonun 72. saatine gelindiğinde lenfositler ikinci mitozun metafazındadırlar. Bu noktada ortama kolşisin eklenerek iğ ipliklerinin kırılması sağlanmaktadır. Böylece bizim elimizde ikinci mitozunda bulunan bir kromatidi eski bir kromatidi yeni olan kromozomları içeren metafaz plakları bulunmaktadır. Burada hangi kolun eski hangi kolun yeni olduğu BrDU adlı DNA ya özgü bir boyayla saptanmaktadır. İnkübasyondan önce ortama eklenen bu boya yeni oluşacak olan DNA ya bağlanmaktadır. Daha sonra preparatlar giemsa ile boyandığında eski DNA boyanmakta ancak yeni DNA kollarında BrDU olduğu için ikinci boyayı tutmamaktadır. Ve açık renkli görülmektedir. Sonuçta ikinci mitozda kromozomun bir kolu açık iken diğer kolu koyu renklidir. Ancak kimyasal maruziyeti sonucunda DNA'da herhangi bir kardeş kromatid değişimi



olmuşsa işte o zaman şekilde de görüldüğü gibi kollarda açıklı koyulu alanlar bulunur[69] .

KKD nin uygulandığı birçok çalışma arasındaki tutarlılık bu yöntemi her geçen gün daha geçerli kılmaktadır [59,60].

### 2.6.2.3. Kimyasal ajanlar ve KKD

Kimyasal ajanlar ve mutajanik maddeler KKD oluşturması bakımından üçe ayrılır.

**KKD ve kromozom anomalileri meydana getiren ajanlar:** nitroz bileşikleri, sitostatik antibiyotikler ve karsinojenlerdir. Alkilleyici ajanlar, belirli konsantrasyonlarda KKD yi artırırken kromozom kırığı meydana getirmemektedir. Hücrede KKD den daha fazla kromozom kırığı meydana getiren ajanlar; adriamisin, aminokunilon oksit, benzopirenantidiolepoksit, benzopiren 4-5 oksit, bromometilbenzantrasen, busulfan, potasyum kromat, dimetilnitrozamin, metilazoksümetanol-asetat, 4 nitrokinolin-1-oksit ve trenimondur[70].

Golloway ve Wolff, KKD ve kromozom kırığı meydana getiren ajanlarla yaptıkları çalışmada ; 915 kromozom kırığının %25 inde KKD gözlemişlerdir. Bu oranın düşük olması, kırılma ve KKD nin birbirlerinden tamamen bağımsız bir mekanizma ile oluştuğu şeklinde yorumlanmıştır[71].

**Kırık oluşturmayan ama KKD meydana getiren ajanlar:** Bu ajanlar; asetaldehit, dekarbomil mitomisin C, asetoksiasetilaminofloren(AAAF), hidroksi asetilaminofloren(HAAF), metilkolantren, anilin hidroklorid floresan brightener no:24, glutatyon, metoksipisoralen+UV, trimetilpsoralen+UV, kelling+UV dir. Bu grupta bulunan ajanlar, KKD oluşumunu arttırmaktadırlar. Hücrede kromozom kırıkları meydana getirme oranları ise azdır[72].

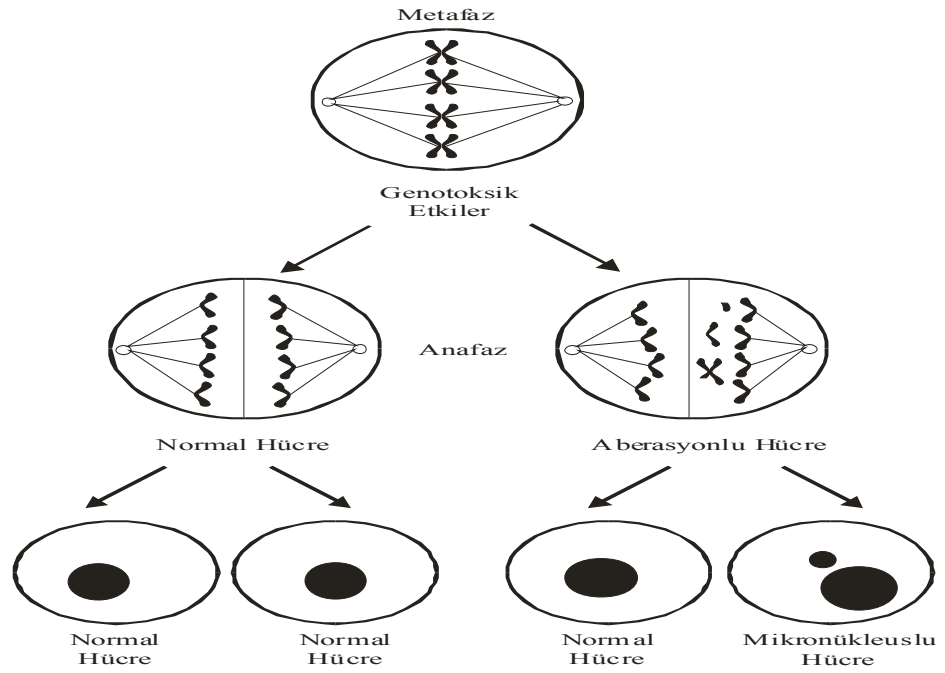
**Kırık oluşturan ve çok az değerinde KKD yi arttıran yada KKD yi hiç değiştirmeyen ajanlar:** Bu ajanlar; benzopiren sindiolepoksit, bleomisin, bredinin,

sitozin, arabinosit, fluoredoksiuridin, nekarsinostatin hidrosikunolin sulfat ve kuersetindir. Bu grupta bulunan ajanlar normal hücredeki kromozom kırık değerlerinden en az sekiz kat fazla kırık meydana getirirler[73] .

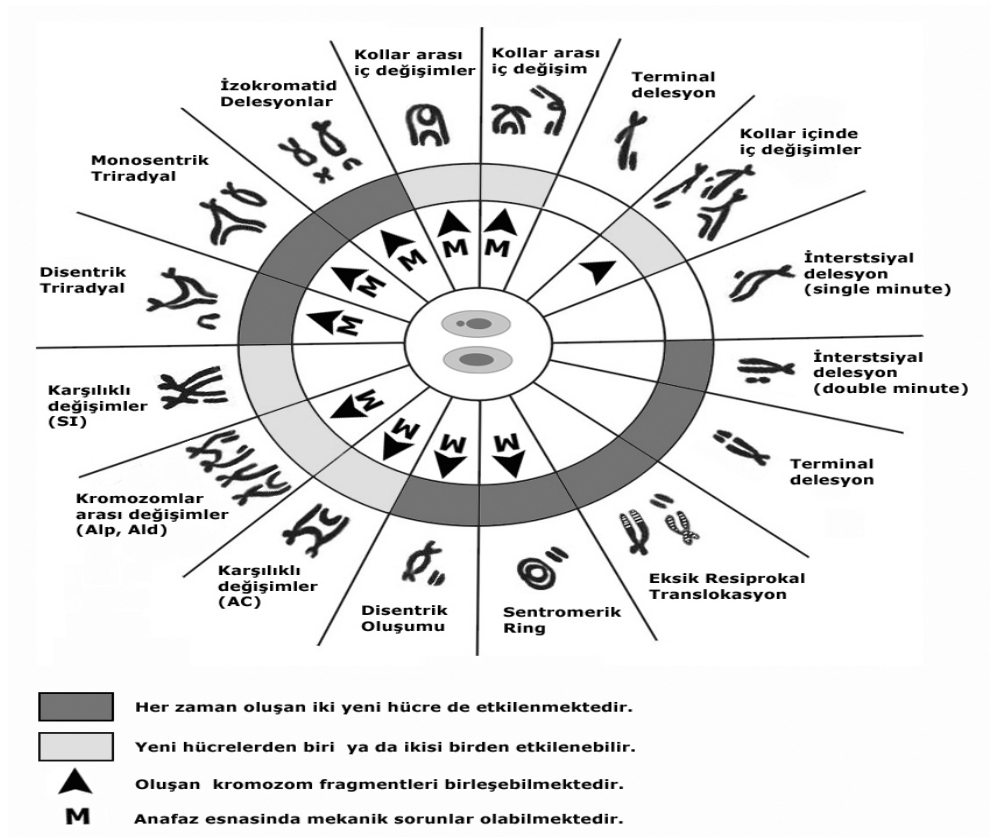
#### 2.6.2.Mikronukleus (MN)

Mikronukleus ana kromozomdan kopmuş olan parçacıklardan ya da anafaz esnasındaki hatalara bağlı olarak ana nukleusa dahil olamayan tam kromozomlardan oluşan ve sitoplazma içerisinde ana nukleusa ilaveten görülebilen küçük nukleustur[74]. Mikronukleus oluşumunu indükleyen her ajan klastojen olmayabilir. Mikronukleus oluşumuna iğ ipliklerinin inhibisyonu ve apoptozis gibi diğer etkenlerde yol açabilmektedir. Eğer oluşuma kromozomlardan kopan bir parça neden olmuşsa (asentrik bir kromozom parçası), bu klastojenik bir olayın sonucu iken eğer oluşuma neden olan olgu anafazda geri kalma ya da iğ ipliklerinin hasarından dolayı oluşmuşsa, bu duruma anojenik bir ajanın neden olduğu belirtilmektedir[75].

Şekil 2,9'da da görüldüğü üzere genotoksik etkiler sonucunda metafazda gözlenen kromozomal fragmentler ya da tam kromozomlar, hücre bölünmesi bitiminde oluşan kardeş hücrelerden birinde tekrar kromatin halde kondanse olarak ana nukleus yanında küçük bir nukleus olarak kendilerini göstermektedir. Mikronukleus oluşumuna yol açabilen kromozom anomalilerinin çeşitleri Şekil 2.10. da gösterilmiştir.



Şekil 2.9. Mikronükleusun sebepleri[74]



Şekil 2.10. Mikronükleusa neden olan kromozom anomalileri [74]

Görüldüğü üzere metafaz kromozomlarındaki kırılmalar sonucunda oluşan fragmentler ve deforme kromozomlar mitoz bölünme sonunda oluşan hücrelerde mikronukleus oluşumlarına yol açmaktadırlar[74].

Bölünebilme yeteneği olan her hücrede mikronukleus meydana gelebilmektedir. Bu olay herhangi bir kimyasala maruz kalmadan da oluşabilmektedir. Yani in vitrodaki bölünme safhasında olmayan bir nukleuslu bir hücreye bakıldığında varolan bir mikronukleusun kendiliğindenmi oluştuğunu yoksa uygulanan bir kimyasalın sonucu olduğu anlaşılmaz. Fakat bölünme esnasında karyokinez den sonra sitokinezden önce; kendiliğinden oluşan mikronukleuslar kaybolur, kimyasalın etkisiyle oluşanlar kalır. İki nukleuslu bir hücreye bakıldığında mikronukleus gözlenmişse bu verilen kimyasalın genotoksitesinin bir göstergesidir[76].

Mikronukleus testi için sadece lenfosit hücreleri değil aynı zamanda; ağız ve burun mukoza hücreleri, özefagus ve üriner sistem epitel hücreleri ve serviksten alınan hücre örnekleri ile de çalışılabilmektedir[67].

#### 2.6.2.1. Mikronukleus testi (cytochalasin-B mikronukleus testi)

Mikronukleusların belirlenmesinde yaygın olarak insan lenfositlerinde Cytochalasin-B mikronukleus testi kullanılmaktadır. Cytochalasin-B çekirdek bölünmesi gerçekleştikten sonra sitoplazma bölünmesini engelleyip, bölünmeyi o noktada durduran bir kimyasaldır. Yani bu yolla iki çekirdekli hücreler elde edilmektedir. İnkübe edilen lenfositlere Cytochalasin-B uygulanmakta ve daha sonra belli miktarda iki çekirdekli hücreler sayılmaktadır. Genel olarak her preparatta 1000 hücre sayılır. Sayımı yapılan 1000 hücre içerisinde mikronukleusluların oranı yukarıda belirtildiği gibi klastojenik veya anojenik etkiyi belirlemektedir.

Genel olarak her hücre kültüründe belli oranda mikronukleuslu hücre bulunmaktadır. Bu oran genel olarak negatif kontrol gruplarında ‰ 1-2 iken (çift

çekirdekli bin hücrede ortalama bir iki hücre) iken bu oran pozitif kontrollerde ‰ 15-20 i bulmaktadır.



Şekil 2.11. Mikronukleus testi[75]

Mikronukleuslar sayılırken dikkat edilmesi gereken bazı hususlar bulunmaktadır.

- Ana nukleuslar ayrı olabilir ama eşit büyüklükte olmalıdır,
- Ana nukleuslar birbirlerine değebilir yada kısmen üst üste binmiş olabilirler,
- Ana nukleuslar nuklear bağlarla bağlı olabilirler[75].

Bu hücreler sayılırken aşağıdaki hücreler sayılmazlar;

- Üç, dört yada daha fazla nukleusa sahip olanlar
- Ana nukleusları eşit boyda olmayanlar,
- Apoptozis durumundaki hücreler[75].

Mikronukleus testi ile;

- Kanser risk değerlendirmeleri yapılabilir,
- Kromozom + genom mutasyonları tanımlanabilir,
- MN nin oluşması için hücre bölünmesi gereklidir
- MN tüm bir kromozomu yada asentrik bir kromozom parçasını içerebilir
- Cytochalasin-B uygulanarak bir çekirdekli ve iki çekirdekli hücreler arasındaki farklılıklar saptanabilir[75].

Tek çekirdekli hücrelerde; ölçülen hasar kültürasyon işleminden önce birikmiştir.

İki çekirdekli hücrelerde; ölçülen hasar hem kültürasyon öncesini hemde kültürasyon esnasını kapsamaktadır.

Çizelge 2.4.: İn vitro MN testinin avantajları ve dezavantajları[75]

| <b>MN TESTİ</b>                                     | <b>AVANTAJLARI</b>  | <b>DEZAVANTAJLARI</b>  |
|---|---|--|
| Sitokalsin-B kullanıldığında yada kullanılmadığında | Hücreler doğru tanımlanır<br><br>Kromozom ve genom mutasyonları tek işlemde tanımlanabilir<br><br>Klastojenler ve anojenler arasındaki ayrımlar yapılabilir<br><br>Apoptozis ve nekrozu birlikte tanımlayabilir<br><br>Pek çok farklı hücre tipinde uygulanabilir<br><br>Hızlıdır<br><br>Ucuzdur<br><br>Yapımı kolaydır<br><br>Rutin uygulama için uygundur<br><br>İstatistiksel olarak kabul görür | Tüm yapısal kromozom değişimleri tanımlanamaz<br><br>MN min tanımlanması için hücrenin bölünmesi gerekir |

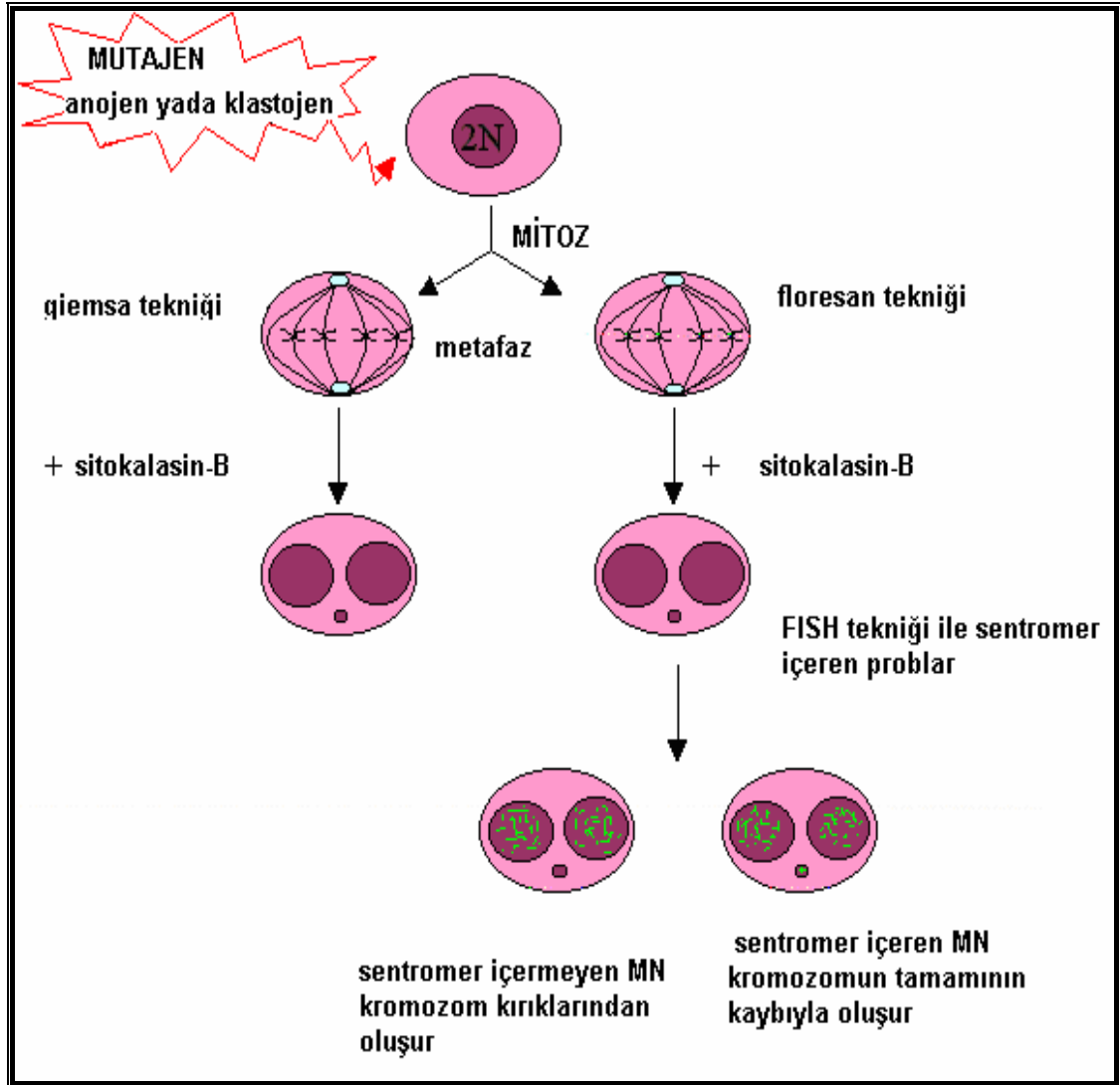
Çizelge 2.4(devam)

|                                   |   |  |
|-----------------------------------|---|--|
| Cytochalasin-B<br>Kullanıldığında | Hücre bölünmesi geçiren<br>ve geçirmeyen hücreler<br>ayırılır<br><br>Nükleoplazmik<br>köprüler sayesinde<br>çift sentromer taşıyan<br>kromozomlar tanımlanır<br><br>iki nukleuslu hücrelerin<br>yüzdesiyle hücre proliferasyonunu<br>hesaplayabiliriz | Kullanılan test<br>kimyasalı ile<br>sitokalsin-B<br>etkileşime girebilir (bu<br>etkiyi artırabilir yada<br>azaltabilir)<br><br>Kültür ortamındaki<br>diğer kimyasallarla<br>etkileşime girebilir<br><br>Sitokalsin-B farklı<br>hücre kültürlerinde ,<br>etkisini farklı farklı<br>gösterebilir |
|-----------------------------------|---|--|

Mikronukleus tekniği ile floresan in situ hibridizasyon (fluorescence in situ hybridisation (FISH)) tekniği birleştirildiğinde; mikronukleustaki kromozom parçasının sentromer taşıyıp taşımadığı anlaşılabilir. Bu da uygulanan kimyasalın anojenik mi yoksa klastojenikmi olduğu hakkında bilgi vermektedir. Bu teknikte sentromer bölgesine özgü bir floresan prob kullanılmaktadır[74,75].

İlk olarak memeli sistemler için geliştirilmiş olan mikronukleus testi, farklı etmenlerin genotoksik etkilerinin araştırılmasında oldukça yaygın olarak kullanılan bir test metodu haline gelmiştir [74,75].

- MN oranını etkileyen faktörler;
- Yaş
  - Cinsiyet
  - Sigara kullanımı[74,75]



Şekil 2.12. Mikronukleus tekniğinde giemsa ve floresan teknikleri ile FISH (fluorescence in situ hybridisation) metodu[75]

Cytokinezis Blok MN testi Fenech ve Morley tarafından geliştirilmiş olup geçerliliği kabul gören bir testtir[76,77]. Westphal, (2003) tarafından MN testi Thimerosal'in toksisitesinin belirlenmesinde de kullanılmıştır[4].



## 2.7. S-9 AKTİVASYON SİSTEMİ

Toksik olan kimyasallar, toksisiteleri bakımından ikiye ayrılmaktadır. Ya kendileri direk toksik etki gösterir ya da bu kimyasalın vücutta biyotransformasyonu denilen dönüşümü sonucunda oluşan metaboliti toksiktir. Kimyasalların dönüşümleri en çok karaciğerde sitokrom P-450 adı verilen bir enzim sistemi tarafından gerçekleştirilmektedir[78].

İn vitro çalışmalarda, çalışılan kimyasalın metabolitinin etkileri gözlenememekteydi. Bunu sağlamak için ilk olarak Ames (1973), Garner (1972) ve ark. Rat karaciğerini homojenize ettiler[78] ve Maron ve Ames (1983) de S-9 aktivasyon sistemini geliştirdiler[79]. Bu sayede çalışma ortamına eklenen S-9 aktivasyon sistemi, kimyasalı sanki in vivo ortammış gibi metabolize etmekte ve kimyasalın dönüşüm sonundaki ürünlerinin etkilerinin de araştırılmasına imkan vermektedir[78].

S-9 aktivasyon sistemi, sağlıklı rat (fare) karaciğerinden (Wistar strain) elde edilmekte ve çalışmasını kolaylaştırmak için şu çözeltiler eklenmektedir. S-9 aktivasyon sistemi; 1ml S9(sigma) ; 0,33ml 1M KCL ; 0,32ml 0,25M MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O ; 0,25ml 0,2M G-6-P ; 1ml 0,04M NADP ; 0,2 M 5ml fosfat buffer Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7.4 ; 2,10ml distile su karıştırılarak hazırlanır [80...84].

S-9 aktivasyon sistemi insan lenfosit kültürlerinde ortama 24. saat te eklenmekte ve test kimyasalıyla etkileşmesi için 3 saat inkübasyona bırakılmaktadır. Daha sonra besi ortamıyla hücreler iki kez yıkanmakta ve inkübasyon devam etmektedir. Bir çok çalışmada kullanılan S-9 aktivasyon sisteminin yarattığı sonuçların tutarlı olması bu sistemin kabul görürlüğünü her geçen gün arttırmaktadır[80...84].

Siddiq ve ark. [81] tarafından metroksiprogesteron asetat ın insan lenfositleri üzerine genotoksik etkisi araştırılırken, çalışma S-9 ihtiva eden ortamda

tekrarlandığında S-9 içeren grupta S-9 içermeyenlere oranla KKD oranında anlamlı bir artış bulunmuştur[81].

Piesova ve ark. [83] tarafından; benzenin insan lenfositleri üzerindeki sitostatik etkisi CBPI yöntemiyle araştırılmıştır. S-9 sistemi eklenmiş ve her dozun S-9 lusunda, S-9 suzuna göre CBPI oranında anlamlı bir düşüş saptanmıştır[83].

## 2.8. SİTOKİNEZ BLOK HÜCRE PROLİFERASYON İNDEKSİ (CBPI) VE MİTOTİK İNDEKS (MI)

Sitokinez blok hücre proliferasyon indeksi (CBPI); Hücrenin bölünme hızını ölçen bir metoddur. Yani stostatik etkiyi ölçer. Uygulanan kimyasalın toksisite derecesi ne kadar yüksek ise CBPI değeri o kadar düşük çıkar. Aralarında ters bir orantı vardır. CBPI değeri şu şekilde hesaplanmaktadır: M1 (1.mitozdaki hücreleri (Tek Çekirdekli), M2, 2.mitozdaki hücreleri (İki Çekirdekli) ve M3 ise 3.mitozdaki hücreleri (üç ya da dört Çekirdekli) temsil etmektedir. M1,M2 ve M3 teki toplam hücreler sayılmaktadır. Preparat başına 100 hücre incelenmekte ve şu formül kullanılarak hesaplanmaktadır.

$$CBPI = 1X(\%M1) + 2X(\%M2) + 3X(\%M3) / 100$$

Mitotik indeks (MI); hücrelerin mitoza girme hızıdır. Uygulanan kimyasalın toksisitesi arttıkça mitotik indeks değeri düşmektedir. Mitotik indeks 1000 hücre arasından mitoza girmiş olanların sayısıdır. Mitoza girmiş olanlar için metafaz plakları esas alınır[85].

### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1.GEREÇLER

##### 3.1.1.Tamponların Hazırlanması

**Söransan tamponu:** 11,88gr  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck) 1000ml distile suda çözülmüştür(stok). 9.08 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (Merck) 1000 ml distile suda çözülmüştür(stok). Behere önce bir miktar  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  solüsyonu konulup  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  üzerine ilave edilerek Ph= 6.8 e ayarlanmıştır.

**2XSSC Tamponu:** 1,7530gr NaCl (Merck0,3M), 100ml distile suda çözülmüştür. 0,8823gr Na-Sitrat (Merck; 0,03M), 100 ml distile suda çözülmüştür. İki çözelti biribiri ile karıştırılmıştır.

##### 3.1.2.Çözeltilerin Hazırlanması

**Besiyeri:** 100ml besiortamı (RPMI 1640 sigma)' na 25ml fetal calf serumu, 0,5 ml penisilin-streptomisin eklenerek hazırlanmıştır.

**Kolşisin çözeltisi:** 1mg kolşisin 10ml steril distile suda çözülmüş, bu çözeltiden 1ml alınarak üzerine tekrar 9ml steril su ilave edilerek kullanıma hazır kolşisin çözeltisi elde edilmiştir.

**Hipotonik çözeltisi:** 0,5592 gr KCL, 100ml distile suda çözülmüştür(0,075M KCL).

**Fiksatif;** 3:1 metanol:asetikasit

**5-Bromo-2'-Deoksiüridin(BrdU):** 6,5mg BrdU(Sigma); 12,5ml RPMI besi ortamında çözülmüş olarak hazırlanmıştır.

**%5 lik Giemsa Boya Çözeltisi:** 5ml Giemsa (Merck) 95ml sörenson çözeltisine karıştırılarak KKD testinin boyası; 95ml distile suya karıştırılarak ise MN testinin boyası elde edilmiştir.

**Fitohemaglutinin çözeltisi;** 1,2mg fitohemaglutin 5ml saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır.

**Sitokalsin-B (Cytochalsin-B) Solüsyonu:** 10ml steril distile su içerisinde 1,5mg cytochalsin-B çözdürülerek hazırlanmıştır.

**S-9 aktivasyon sistemi:** 1ml S9(sigma) ; 0,33ml 1M KCL ; 0,32ml 0,25M MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O ; 0,25ml 0,2M G-6-P ; 1ml 0,04M NADP ; 0,2 M 5ml fosphat buffer Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7.4 ; 2,10ml distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.

### 3.1.3.Kimyasalların hazırlanışı;

**Thimerosal solüsyonlarının hazırlanışı:** Thimerosal katı hakde SİGMA firmasından elde edilmiştir. Üç doz olarak hazırlanmıştır; 0,2 µg/ml 0,4 µg/ml ve 0,6 µg/ml. Bu dozlar ekim yapıldıktan sonra tüplerdeki son konsantrasyonlarını göstermektedir. Bunların stok çözeltileri ise şu şekilde hazırlanmıştır.

0,2 µg/ml lık doz için 0,01 gr Thimerosal 10ml steril distile suya eklenmiştir. İyice eridikten sonra 1ml alınmış ve üzerine 9ml saf su eklenmiştir. Bu çözeltilerden de yine 1ml alınmış ve üzerine 9ml distile su eklenmiştir. Böylece stok çözelti oluşturulmuştur. Ekim sırasında bu çözeltilerden 100 µl alınıp 5ml lik ortama eklendiğinde, tüpteki bu oran 0,2 µg/ml ye denk gelmektedir.

0,4 µg/ml lik doz için; 0,02gr Thimerosal tartılmış ve diğer işlemler aynı şekilde uygulanmıştır.

0,6 µg/ml lik doz için; 0,03gr Thimerosal tartılmış ve diğer işlemler aynı şekilde uygulanmıştır.

### ***Pozitif kontrollerin hazırlanması***

***Mitomisin C (MMC) nin hazırlanması:*** 0.1gr MMC 10ml distile suda çözülmüştür. Bundan 1ml alınıp üzerine 9ml distile su eklenmiştir. Aynı işlem tekrarlanmıştır. Böylece stok solüsyon elde edilmiştir. Ekim sırasında 5ml lik tüplere 100er µl konulduğunda tüplerdeki konsantrasyonu 2µg/ml MMC dir. Bu pozitif kontrol; S-9 suz kültürler için uygulanmıştır.

***Siklofosfamid (Cyclophosphamid) in hazırlanması ( S-9 eklenmiş kültürler için hazırlanan pozitif kontrol):*** 0,007gr madde 10 ml distile suda çözülmüştür. Bu çözeltiden 1ml alınıp üzerine 9ml distile steril su eklenerek stok çözelti oluşturulmuştur. 5ml lik kültür ortamına bu stoktan 100µl eklendiğinde tüpteki son konsantrasyonu 1,4µg/ml dir.

## **3.2.YÖNTEM**

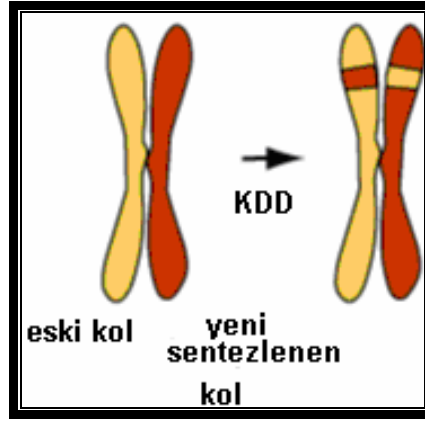
### **3.2.1.Periferik Kandan Lenfosit Hücre Kültürlerinin Hazırlanması**

- 1- Sigara alkol kullanmayan, 25 yaşında, sağlıklı 3 erkek bireyden heparinli kanlar alınmıştır.
- 2- Bu kanlar önceden hazırlanmış ve numaralandırılmış içlerinde 5 er ml besi ortamı bulunan tüplere konulmuştur. Numaralandırma şu şekilde yapılmıştır. Her bir birey için 0,2 µg/ml, 0,4 µg/ml, 0,6 µg/ml Thimerosal, pozitif ve negatif kontroller. Bunlar S9 lu ortam da KKD ve MN için ayrı gruplandırılmış ve S9 suz ortamda yine MN ve KKD için ayrı gruplandırılmıştır. Toplam 3 bireyden alınmış kanlarla 3 kez tekrarlanmış 30 tane S9 lu , 30 tane S9 suz toplam 60 tüp hazırlanmıştır.
- 3- Her tüpe 0,3-0,5ml kan eklenmiştir.
- 4- Her tüpe 0,15ml PHA damlatılmıştır
- 5- Tüm KKD tüplerine 100 µl BrdU çözeltisi eklenip tüpler ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile sarılmıştır.
- 6- S-9 suz tüpler için; Thimerosal çözeltileri kendi dozlarının yazdığı tüplere 100 µl eklenmiştir

- 7- Pozitif kontrol tüplerine; S-9 lu olanlara 100 µl CP, S-9 suz olanlarına 100 µl MMC solüsyonu eklenmiştir, negatif kontrol tüplerine 100 µl steril saf su eklenmiştir
- 8- Tüm tüplerin ağzı kapatılıp 45° lik açıyla inkübasyon için 37°C lik etüve bırakılmıştır
- 9- 24. saatin sonunda S-9 lu tüplere 100 µl Thimerosal ve 0,5ml S-9 aktivasyon sistemleri eklenmiştir . S-9 suz tüplere hiç bir işlem uygulanmamıştır.
- 10- Thimerosal ve S-9 eklenen bu tüpler tekrar etüve konulup 3 saat bekletilmiş ve iki kez RPMI besiyeriyle yıkanıp tekrar etüve konulmuştur
- 11- 44. saatte tüm MN tüplerine 300 µl sitokalsin-B eklenmiştir
- 12- 70. saatte tüm KKD tüplerine 0,05ml kolşisin eklenmiştir
- 13- Tüm tüpler 72. saatte etüvden çıkarılıp 2000rpm de 10dk santrifüj edilmiştir
- 14- Çökelti üzerine 10ml hipotonik solüsyonu eklenip hafifçe pipetle karıştırılmış ve MN tüpleri 3dk oda ısısında, KKD tüpleri 30dk 37°C lik etüvde bekletilmiştir.
- 15- Tüm tüpler 2000rpm de 10dk santrifüj edilmiştir
- 16- Çökelti üzerine 5ml fiksatif solüsyonu eklenmiş ve tekrar 2000rpm de 10dk santrifüj edilmiştir. İşlem 5 kez tekrarlanmıştır.
- 17- En son çökelti üzerine 1ml fiksatif eklenmiş ve lamlara yayılmıştır.
- 18- Oda ısısında kurumaya bırakılan MN preparatları kuruyunca distile suyla hazırlanan %5 lik giemsa boya solüsyonu ile boyanmış ve mikroskopta incelenmiştir.
- 19- KKD preparatları ise iki işlemden daha geçmişlerdir. Bu preparatlar önce üzerlerini film şeridi şeklinde kaplayan sörenson tampon çözeltisinde 30 dakika UV de (254nm lik UV lambası bulunan kabin içerisinde ve lambaya 25cm lik uzaklıkta), ardından 2XSSC çözeltisinde 45dk 60°C pastör fırınında bekletilmiş ve sörenson tampon solüsyonu ile hazırlanan %5 lik giemsa boya solüsyonuda 20 dakika süre ile boyanarak mikroskopta incelenmiştir.

### 3.2.2.KKD İçeren Kromozomların Değerlendirilmesi

Boyanmış preparatlarda ikinci mitozda bulunan metafaz plaklarından KKD oranı sayılarak elde edilmiştir. BrdU dan dolayı ikinci mitozun metafaz aşamasındaki hücrelerin kromozomlarında kromatidler farklı boyanacaktır. Koyu boyanan kromatidde açık, açık boyanan kromatidde koyu görülen bölgeler KKD değerlerini yansıtmaktadır. KKD için hazırlanan preparatlardan her birey için 50 adet metafaz plağı değerlendirilmiştir. Bütün lamalar numaralandırılmış ve 1000 lik büyütme altında immersiyon yağı ile incelenmiştir[60].



Şekil 3.1. KKD nin görünümü[60]

### 3.2.3. Sitokinez blok hücre proliferasyon indeksi(CBPI) Ve Mitotik İndeks (MI) Değerlendirmesi

Sitokinez blok hücre proliferasyon indeksi(CBPI) değerlendirmesinde;

M1, 1.mitozdaki hücreleri (Tek Çekirdekli), M2, 2.mitozdaki hücreleri (İki Çekirdekli) ve M3 ise 3.mitozdaki hücreleri (üç ya da dört Çekirdekli) temsil etmektedir. M1, M2 ve M3 teki toplam hücreler sayılmıştır. Birey başına 100 hücre incelenmiş ve  $CBPI = 1X(\%M1) + 2X(\%M2) + 3X(\%M3) / 100$  formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

Mitotik indeks değerlendirmesinde;

Mitotik indeks 1000 hücre arasından mitotik girmiş olanların sayısıdır. Mitotik girmiş olanlar için metafaz plakları referans alınır.

Tüm preparatlar MICROS MC300A mikroskopunda 40x10=400 büyütmede sayılmıştır[86,87].

### 3.3. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sonuçlar tek yönlü varyans analizinde değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizde tüm gruplarda tek tek ve her dozun S-9 aktivasyon sistemi içeren ve içermeyen tekrarlarında sonuçları negatif kontrolle kıyaslamak için SPSS windows 11 Post-Hoc analiz LSD ve S-N-K testi uygulanmıştır. S-9 aktivasyon sistemi içermeyen gruplar kendi S-9 içermeyen negatif kontrolleriyle kıyaslanmıştır. S-9 içeren gruplar kendi S-9 içeren negatif kontrolleriyle kıyaslanmıştır. Her dozun S-9 aktivasyon sistemi içeren ve içermeyen grupları birbirleri ile kıyaslanmıştır. Tüm analizler yapılırken 3 bireyden elde edilen verilerin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Tüm analizlerde; p değeri (güven aralığı) 0,05 ve 0,01 olarak alınmıştır.



## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. BULGULAR

Bu çalışmanın amacı son yıllarda yoğun olarak kullanılan ve aşılarında bulunan Hg içerikli Thimerosal'ın bağışıklık sisteminin temel hücreleri olan lenfositlerdeki genotoksik, mutajenik ve toksik etkilerini ve etkilerin birbiri ile ilişkilerini araştırmaktır. Thimerosal sadece aşılarında değil aynı zamanda lens solüsyonlarında, kozmetikte, diş dolgu maddelerinde de bulunmaktadır. Ancak bu çalışma aşıları ve aşılarıdaki miktarı referans alınarak yapılmıştır.

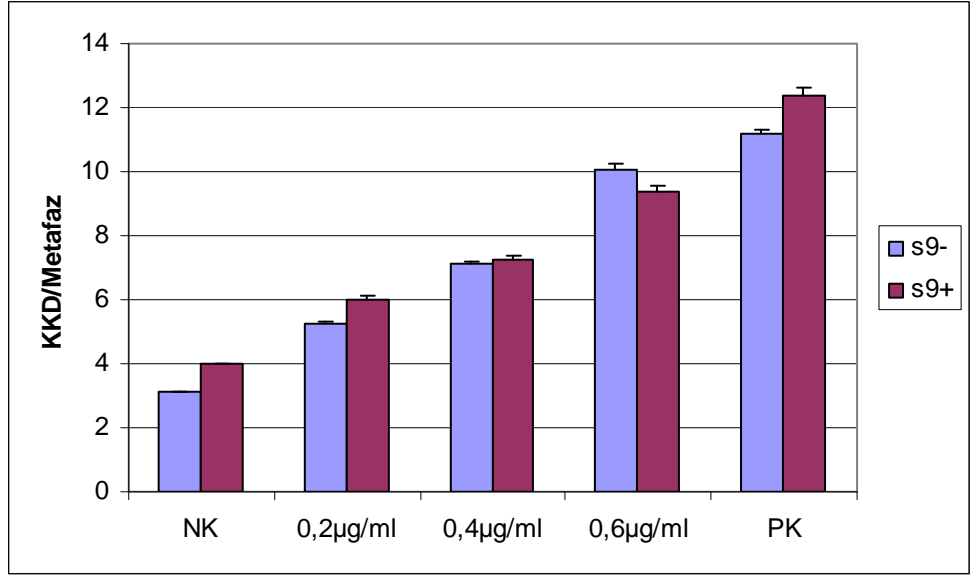
Bu çalışma için kullanılan kan örnekleri sigara kullanmayan sağlıklı üç erkek bireyden alınmıştır. Doz aralığı aşılarıdaki miktarı referans alınarak belirlenmiştir. Thimerosal, 100µl lik saf su çözeltisi şeklinde eklenmiş ve son konsantrasyonlar ; 0,2µg/ml 0,4 µg/ml 0,6 µg/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Negatif kontrol hücre kültürlerine, 100µl lik timerosalsız saf su, pozitif kontrol hücre kültürlerine ise 2µg/ml lik mitomisin-C yada S-9 kültürleri için siklofosfamid (1,4µg/ml) eklenmiştir. Kurutulan preparatlar; Pery ve Wolf [63] un Giemsa tekniğine göre boyanmıştır. KKD miktarları üç tekrarlı olan preparatlardan metafaz başına sayılmıştır. Kişi başına 50 metafaz hücresi sayılmıştır. Mitotik indeks (MI) bin hücre arasından mitozun metafaz evresine giren hücrelerin sayısıdır. Hücre proliferasyon kinetiği; hücrenin kaçınıcı mitozda olduğu baz alınarak  $CBPI = 1X(\%M1) + 2X(\%M2) + 3X(\%M3) / 100$  formülüne göre hesaplanmıştır. Mikronukleus (MN) ise kişi başına 1000 binukleuslu hücre arasından mikronukleus içeren binukleuslu hücreler hesaplanarak bulunmuştur.

Sonuçlar genel olarak kontrol gruplarıyla kıyaslandığında; KKD ve MN oranı artarken MI ve CBPI oranı düşmüştür.

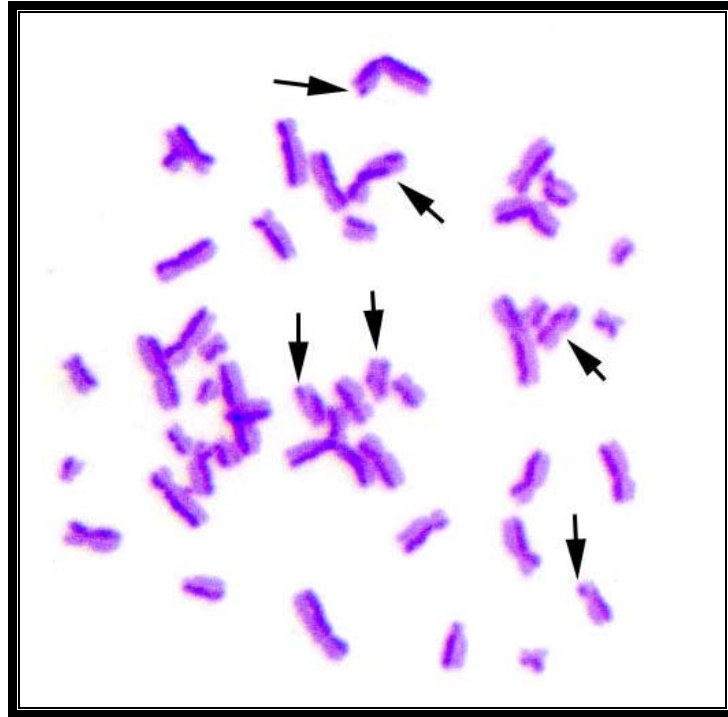
Çizelge 4.1. Timerosal'in belirli dozlarına maruz bırakılan gruplardaki KKD değerleri. NK:negatif kontrol, PK:pozitif kontrol, <sup>a</sup> ( $p \leq 0,01$ )

|                             | 1. Kişi | 2.Kişi | 3.Kişi | ORTALAMA±<br>STANDART SAPMA |
|-----------------------------|---------|--------|--------|-----------------------------|
|                             | KKD/M   | KKD/M  | KKD/M  | KKD/M                       |
| <b>Negatif Kontrol</b>      | 3,08    | 3,14   | 3,08   | 3,10± 0,035                 |
| <b>NK+ S9</b>               | 4,00    | 4,10   | 3,90   | 4,00±0,10                   |
| <b>0,2</b>                  | 5,20    | 5,20   | 5,40   | 5,26± 0,11 <sup>a</sup>     |
| <b>0,2+S9</b>               | 6,10    | 6,00   | 5,90   | 6,00± 0,10 <sup>a</sup>     |
| <b>0,4</b>                  | 7,10    | 6,90   | 7,30   | 7,10± 0,20 <sup>a</sup>     |
| <b>0,4+S9</b>               | 7,30    | 7,30   | 7,20   | 7,27 ±0,18 <sup>a</sup>     |
| <b>0,6</b>                  | 9,90    | 10,10  | 10,20  | 10,06 ±0,15 <sup>a</sup>    |
| <b>0,6+S9</b>               | 9,10    | 9,50   | 9,50   | 9,37± 0,23 <sup>a</sup>     |
| <b>Pozitif Kontrol(MMC)</b> | 11,16   | 11,16  | 11,18  | 11,17± 0,012 <sup>a</sup>   |
| <b>PK(CP)+S9</b>            | 12,10   | 12,60  | 12,50  | 12,40 ±0,26 <sup>a</sup>    |

Dozdaki artışa bağlı olarak KKD oranında artış söz konusudur. Bu artış şekil 4.1.de gösterilmiştir. 0,4 µg/ml lik dozun S-9 lu ve S-9 suz ortamdaki kültürlerinin değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ( $p \geq 0,05$ ). Tüm dozlar kendi aralarında karşılaştırıldığında ve aynı dozun S-9 suz kültürü ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde farklıdır ( $p \leq 0,01$ ). Thimerosal'in 0,6µg/ml lik dozunun S-9 lu ve S-9 suz ortamdaki değerleri karşılaştırıldığında  $p \leq 0,05$  oranında fark saptanmıştır. KKD noktaları şekil 4.2. de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Thimerosal'deki doz artışına bağlı olarak KKD oranındaki artış. NK; negatif kontrol PK; pozitif kontrol (S-9 içeren gruplar için 1,4µg/ml siklofosfamid, S-9 içermeyen gruplar için 2µg/ml mitomisin-C)

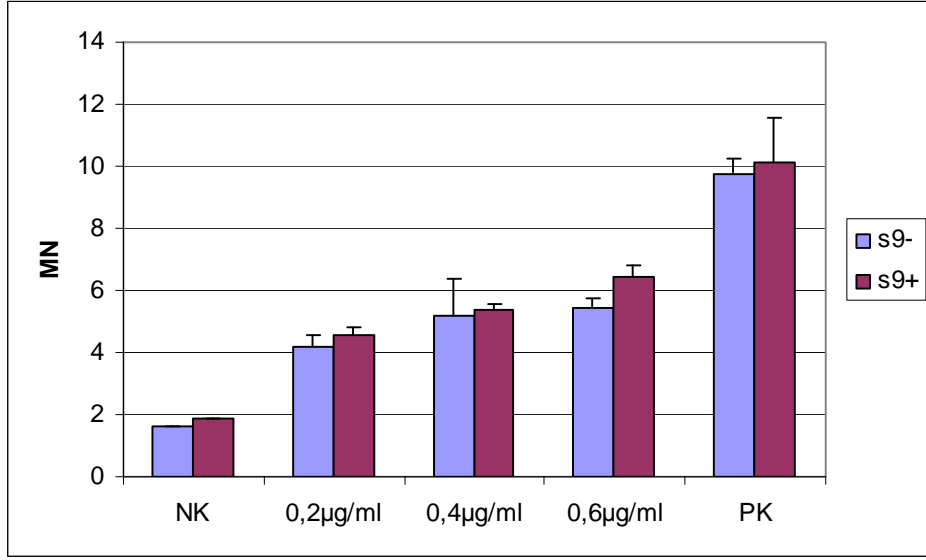


Şekil 4.2. Metafaz evresindeki bir hücrede KKD (Kardeş Kromatid Değişimi) bölgeleri

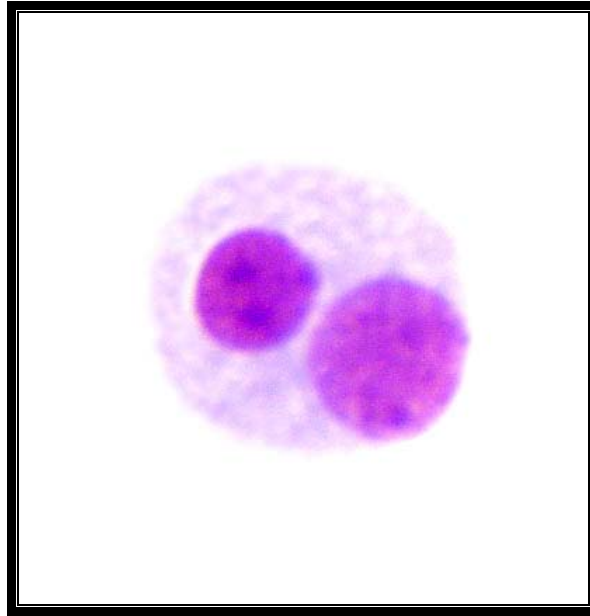
Çizelge 4.2. Timerosal'in belirli dozlarına maruz bırakılan gruplardaki MN değerleri NK;negatif kontrol, PK;pozitif kontrol, <sup>a</sup> ( $p \leq 0,01$ )

|                            | 1. Kişi | 2.Kişi | 3.Kişi | ORTALAMA±<br>STANDART SAPMA |
|----------------------------|---------|--------|--------|-----------------------------|
|                            | MN(‰)   | MN(‰)  | MN(‰)  | MN (‰)                      |
| <b>Negatif Kontrol</b>     | 1,30    | 2,00   | 1,60   | 1,63± 0,35                  |
| <b>NK+S9</b>               | 1,60    | 2,00   | 2,00   | 1,86± 0,230                 |
| <b>0,2</b>                 | 4,30    | 4,00   | 4,30   | 4,20 ±1,17 <sup>a</sup>     |
| <b>0,2+S9</b>              | 4,30    | 4,70   | 4,70   | 4,56±0,230 <sup>a</sup>     |
| <b>0,4</b>                 | 5,60    | 5,00   | 5,00   | 5,20 ±0,34 <sup>a</sup>     |
| <b>0,4+S9</b>              | 5,30    | 5,80   | 5,00   | 5,36±0,40 <sup>a</sup>      |
| <b>0,6</b>                 | 6,00    | 5,30   | 5,00   | 5,43 ± 0,51 <sup>a</sup>    |
| <b>0,6+S9</b>              | 5,66    | 6,00   | 7,66   | 6,44±1,47 <sup>a</sup>      |
| <b>PozitifKontrol(MMC)</b> | 10,30   | 10,70  | 8,30   | 9,76 ± 1,28 <sup>a</sup>    |
| <b>PK (CP)+ S9</b>         | 10,33   | 9,66   | 10,33  | 10,10±0,38 <sup>a</sup>     |

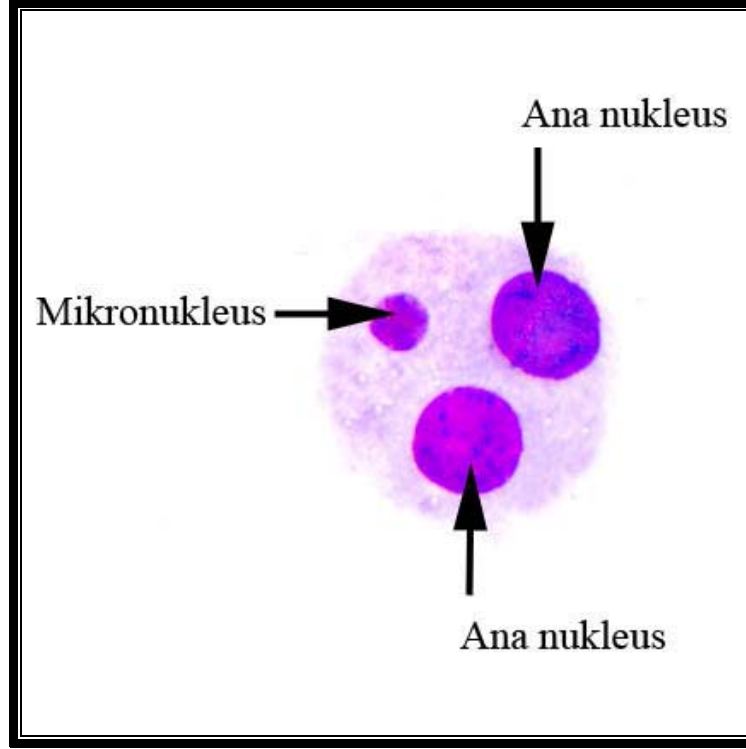
MN testi için Çizelge 4.2 ye ve Şekil 4.3'e bakıldığında doz artışına bağlı olarak MN değerlerinde de artış gözlenmiştir (Şekil 4.3). Her doz negatif kontrol değerleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ( $p < 0,01$ ). MN testi için her doz tek tek ele alınıp S-9 lu ortamdaki aynı doz ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark bulunmamaktadır ( $p \geq 0,05$ ). S-9 suz 0,4 µg/ml dozu 0,2 µg/ml ve 0,6 µg/ml dan farklı değildir. Bunlar dışında tüm değerler ile negatif kontrolleri arasında farklılık vardır ( $p \leq 0,01$ ). Binukleuslu hücre Şekil 4.4 de gösterilmektedir. Mikronukleuslu hücre Şekil 4.5. de gösterilmektedir.



Şekil 4.3. Timersal'deki doz artışına bağlı olarak MN oranındaki artış NK; negatif kontrol PK; pozitif kontrol (S-9 içeren gruplar için 1,4µg/ml siklofosfamid, S-9 içermeyen gruplar için 2µg/ml mitomisin-C)



Şekil 4.4. Çekirdek bölünmesinden sonra sitoplazma bölünmesi durdurulmuş olan binukleuslu hücre

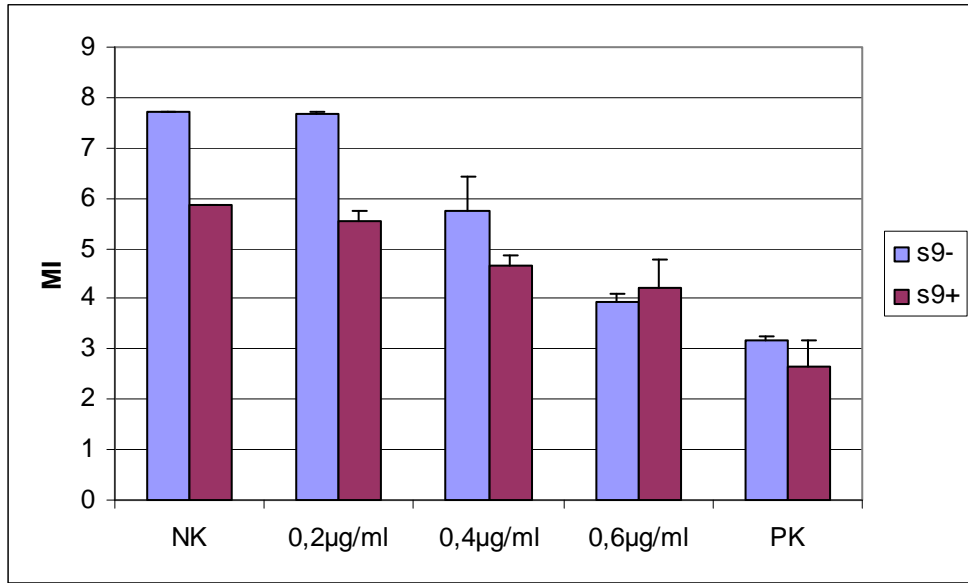


Şekil 4.5. Binukleuslu bir hücrede mikronukleus

Çizelge 4.3. Timerosal'in belirli dozlarına maruz bırakılan gruptaki MI değerleri  
NK= negatif kontrol, PK=pozitif kontrol, <sup>a</sup> (p≤0,01)

|                            | 1. Kişi | 2.Kişi | 3.Kişi | ORTALAMA±<br>STANDARTSAPMA |
|----------------------------|---------|--------|--------|----------------------------|
|                            | MI(‰)   | MI(‰)  | MI(‰)  | MI(‰)                      |
| <b>Negatif Kontrol</b>     | 7,65    | 7,75   | 7,75   | 7,71±0,05                  |
| <b>NK+S9</b>               | 6,00    | 5,66   | 6,00   | 5,88±0,19                  |
| <b>0,2</b>                 | 7,60    | 7,60   | 7,80   | 7,66±0,711                 |
| <b>0,2+S9</b>              | 5,66    | 5,66   | 5,33   | 5,55±0,19 <sup>a</sup>     |
| <b>0,4</b>                 | 5,90    | 5,70   | 5,60   | 5,73±0,15 <sup>a</sup>     |
| <b>0,4+S9</b>              | 5,00    | 5,00   | 4,00   | 4,66±0,57 <sup>a</sup>     |
| <b>0,6</b>                 | 3,95    | 4,00   | 3,90   | 3,95±0,05 <sup>a</sup>     |
| <b>0,6+S9</b>              | 4,33    | 3,66   | 4,66   | 4,21±0,50 <sup>a</sup>     |
| <b>PozitifKontrol(MMC)</b> | 3,16    | 3,11   | 3,32   | 3,19±0,10 <sup>a</sup>     |
| <b>PK(CP)+S9</b>           | 2,33    | 2,66   | 3,00   | 2,66±0,33 <sup>a</sup>     |

MI testinin sonuçlarına Çizelge 4.3.te bakacak olursak doz artışına bağlı olarak MI değerlerinde bir düşüş gözlenmiştir. 0,2 µg/ml lik Thimerosal dozu ile negatif kontrol arasında istatistiksel açıdan bir fark bulunamamıştır( $p<0,05$ ). 0,6 µg/ml lik dozunun S-9 lu ile S-9 suz ortamdaki değerleri arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiş ve ayrıca pozitif kontrolün S-9 lu ve S-9 suz ortamdaki değerleri arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir ( $p\geq 0,05$ ). 0,4 µg/ml dozun S-9 lu ve S-9 suz ortamdaki değerleri arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmiştir( $p\leq 0,05$ ). Diğer tüm değerler birbirleriyle ve S-9 lu ortamdaki tekrarları ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı bulunmuştur ( $p\leq 0,01$ ). Thimerosal'deki artışa bağlı olarak MI değerlerindeki düşüş şekil 4.6. da gösterilmiştir.



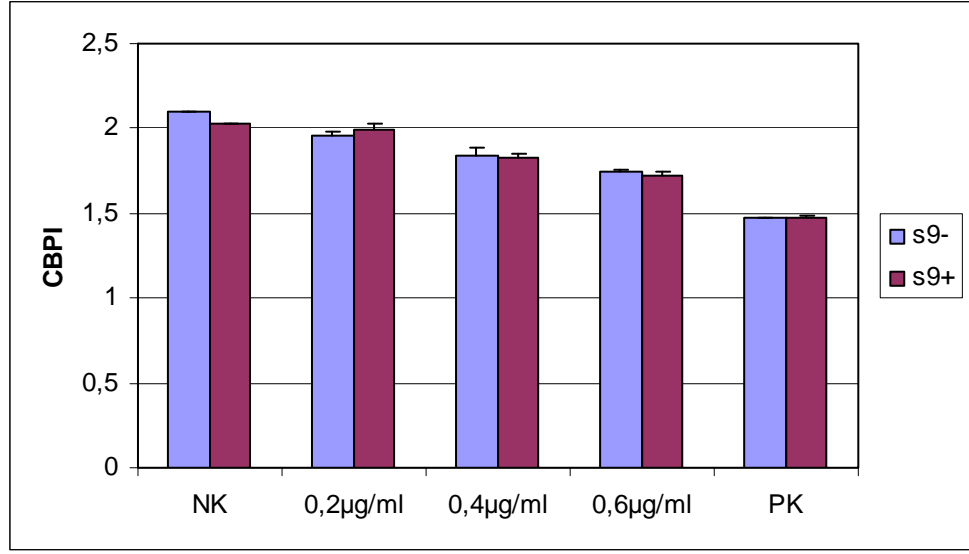
Şekil 4.6. Thimerosal'deki doz artışına bağlı olarak MI değerindeki düşüş. NK; negatif kontrol PK; pozitif kontrol (S-9 içeren gruplar için 1,4µg/ml siklofosfamid, S-9 içermeyen gruplar için 2µg/ml mitomisin-C)

Çizelge 4.4. Timerosal’ın belirli dozlarına maruz bırakılan guruplardaki CBPI değerleri. NK; negatif kontrol, PK;pozitif kontrol, <sup>a</sup> (p≤0,01)

|                            | 1. Kişi  | 2. Kişi  | 3. Kişi  | ORTALAMA±<br>STANDARTSAPMA |
|----------------------------|----------|----------|----------|----------------------------|
|                            | CBPI (%) | CBPI (%) | CBPI (%) | CBPI (%)                   |
| <b>Negatif Kontrol</b>     | 2,04     | 2,00     | 2,00     | 2,01±0,02                  |
| <b>NK+S9</b>               | 2,08     | 2,01     | 2,01     | 2,03±0,04                  |
| <b>0,2</b>                 | 2,00     | 2,00     | 1,90     | 1,96±0,05                  |
| <b>0,2+S9</b>              | 2,00     | 1,96     | 2,01     | 1,99±0,02 <sup>a</sup>     |
| <b>0,4</b>                 | 1,85     | 1,84     | 1,85     | 1,84±0,005 <sup>a</sup>    |
| <b>0,4+S9</b>              | 1,82     | 1,82     | 1,86     | 1,83±0,02 <sup>a</sup>     |
| <b>0,6</b>                 | 1,75     | 1,76     | 1,75     | 1,75±0,005 <sup>a</sup>    |
| <b>0,6+S9</b>              | 1,72     | 1,72     | 1,74     | 1,72±0,011 <sup>a</sup>    |
| <b>PozitifKontrol(MMC)</b> | 1,51     | 1,46     | 1,46     | 1,47±0,02 <sup>a</sup>     |
| <b>PK(CP)+S9</b>           | 1,46     | 1,51     | 1,46     | 1,47±0,028 <sup>a</sup>    |

CBPI değerlerine Çizelge 4.4. de bakıldığında tüm dozlar S-9 lu ortamdaki tekrarları ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiştir(p≥0,05). S-9 suz ortamdaki 0,2 µg/ml ve negatif kontrol arasında bir farklılık bulunmazken diğer tüm gruplar ile negatif kontrolleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık saptanmıştır(p≤0,01). Thimerosal’deki doz artışına bağlı olarak CBPI oranındaki düşüş Şekil 4.7. de gösterilmiştir.





Şekil 4.7. Thimerosal'deki doz artışına bağlı olarak CBPI oranındaki düşüş. NK= negatif kontrol PK=pozitif kontrol (S-9 içeren gruplar için 1,4µg/ml siklofosfamid, S-9 içermeyen gruplar için 2µg/ml mitomysin-C)

## 4.2. TARTIŞMA

Bu çalışmada aşı ve daha birçok biyolojik üründe koruyucu olarak kullanılan Thimerosalin in vitro ortamda insan lenfositleri üzerindeki genotoksik, toksik ve mutajenik etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışmada Thimerosal'in dozları, aşılardaki miktarı göz önüne alınarak hesaplanmıştır.

Thimerosal'in %49 u civa içermekte ve civanın tüm formlarının nörotoksik olduğu bilinmektedir. Özellikle beyin gelişiminin ilk dönemleri olan çocukluk çağı boyunca bu nörotoksisite daha da önem kazanmaktadır. James ve ark.[47] ' un belirttiğine göre Costa (2004) teki saptamasına göre civa bağımlı sitotoksisitenin temelinde, civa bileşiğinin kritik proteinlerdeki tiol (-SH) guruplarıyla bağ yapma eğiliminde olduğu bildirilmektedir. Kemiricilerle yapılan in vivo çalışmalar etil civanın hücre membranını geçebildiğini ve hücre içerisinde inorganik civaya dönüşebildiğini göstermiştir. Bu olay öncelikli olarak beyin ve böbrek gibi organlarda gerçekleşmektedir[47].

Thimerosal ile yapılan çalışmalar in vivo ve in vitro olarak iki grupta toplanacak olursa;

Thimerosal ile ilgili in vivo çalışmalar;

Mason ve ark. tarafından Thimerosal'in karsinojenik etkileri F1 dölü Scher ratlarında araştırılmıştır. İki haftalık ratlara 30-1000 µg/kg dozları arasında Thimerosal verilmiş ancak karsinogenezis ile bağlantılı tam bir veri elde edilememiştir[20]. Bu konuda yapılan diğer in vivo çalışmalarda ise;

Marrazzini ve ark.[88] tarafından erkek Swiss CD-1 farelerinde 10-20 mg/kg lık timerosal maruziyetlerinin oluşturacağı mikronukleus ve kromozom aberasyonları taranmış, mikronukleus ve kromozom aberasyonlarında artış belirlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlı bir bulgu elde edilememiştir. Adler ve ark.[89] ise dişi Swiss ratlarında aynı çalışmayı tekrarlamış ancak sonuçları istatistiksel açıdan

anamlı olmadığını rapor etmişlerdir. Thimerosalin çeşitli test sistemlerindeki anöploidi oluşturma potansiyelleri çelişkilidir. Marazini ve ark., [88] tarafından, CD-1 sıçanlarında yapılan mikronukleus ve kromozom aberasyonu testleri bu kimyasalın klastojenik etkisinin olduğunu göstermiştir.

Toshiko ve ark.[3] tarafından; aşılarda koruyucu olarak kullanılan timerosalin iki haftalık sıçanların beyin nöronları üzerindeki etkileri Flow Cytometer yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Thimerosal ve metil merkürinin(civanın) toksisite dereceleri karşılaştırılmıştır. Her iki maddenin de 0,3 den 10µM a kadar olan konsantrasyonları hücre içi kalsiyum Ca<sup>+2</sup> seviyesini anlamlı derecede arttırmıştır. 10µM timerosal Ca<sup>+2</sup> seviyesini 10µM metil merküriye göre daha az arttırmıştır . Ancak aradaki bu fark anlamlı olacak kadar bariz değildir. Ca<sup>+2</sup> seviyesindeki bu artışın Toshiko ve ark. iki şekilde meydana gelmiş olabileceğini savunmuşlardır. Ya uygulanan ajanlar (thimerosal ve metil merkürü) hücre zarının geçirgenliğini arttırmışlardır. Ya da hücre içindeki Ca<sup>+2</sup> u serbest hale dönüştürmüşlerdir. Bu sonuçlar in vitro ortamda sıçan beyin hücre kültürlerine Thimerosal uygulandığında alınan sonuçlarla paralellik göstermektedir[31]. Hem Thimerosal'in hem de metil civanın hücre içi Ca<sup>+2</sup> seviyesini ve oksidatif stresi artırdığı bildirilmiştir [3] .

Magos ve ark.[16], etil ve metil civanın toksik etkilerini, sıçanlara, 8-9,6mg/kg lık dozlarla, günlük etil ve metil civa uygulaması ile testetmişlerdir; etil ve metil civanın nörotoksitesi benzer olmakla birlikte beyinde etil civa hasarının daha fazla olduğu gözlenmiştir[16].

İn vitro ortamda yapılan çalışmalar;

Miller'e göre[7] Thimerosal'in in vitro sistemlerdeki genotoksik etkileri konusundaki raporlar çelişkilidir. Avrupa'da bulunan bir çalışma grubu olan GUM ( Germany Section Of The European Enviromental Mutagen Society ) tarafından kabul gören çalışmalarda Thimerosal'in etkileriyle ilgili iki çalışma dikkat çekmektedir.

Bunlardan birincisi; Migliore ve ark. tarafından [90] yapılmıştır. 0,01-0,16µg/ml arası dozlardaki Thimerosal'ın etkileri, sitokalsin-B (Cytokalsin-B) blok mikronukleus testi ile araştırılmıştır. İnsan lenfositlerinde, mikronukleus oluşturma frekansına bakılmış ve istatistiksel olarak negatif kontrole kıyasla anlamlı düzeyde olmasa da MN artışına neden olduğu saptanmıştır.

İkinci çalışma ise Seelbach ve ark. tarafından yapılmıştır [91] . Bu çalışmada V79 hücreleri kullanılmış ve MN frekansındaki artışlar incelenmiştir. Thimerosal'ın 1 µg/ml lik dozunun MN oranında negatif kontrole göre anlamlı bir artış oluşturduğu saptanmıştır.

Bu iki çalışma yaptığımız bu çalışma ile karşılaştırıldığında üç çalışma da birbirini destekler niteliktedir. Birinci çalışmada anlamlı olmasa da MN frekansında bir artış sözkonusudur. İkincisindeki MN artışı ise negatif kontrolle kıyaslandığında anlamlıdır. Bu çalışmada da da 0,2, 0,4 ve 0,6 µg/ml lik dozların hepsi, negatif kontrolle karşılaştırıldığında, MN oranında anlamlı bir artış sözkonusudur.

Hummelen ve Kirsch- Volders [92] de Thimerosal'ın insan lenfositleri üzerinde MN oluşturma potansiyelini araştırmış ve MN artışının, negatif kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olmadığını rapor etmişlerdir.

Bonatti ve ark. [93] thimerosalin de yer aldığı 10 kimyasal maddenin (kadmiyum klorid, kloral hidrat, kolşisin, diazepam, ekonazol, hidrokinon, primetamin, tiabendazol, thimerosal ve vinblastin) insan diploid fibroblastlarında genotoksik özelliklerini araştırmışlardır. Bu çalışmada immunofluoresan bir teknik olan CREST boyama tekniği kullanılmış ve Thimerosal'ın fibroblastlarda anojenik ya da klastojenik bir özelliğinin olmadığı belirlenmiştir.

Antoccia ve ark. [94], Thimerosal'i embriyonik Çin Hamster hücrelerinde çalışmış fakat genotoksisiteye neden olabilecek anlamlı bir veriye ulaşamamıştır.

Lynch ve Parry [95] Thimerosal'in Çin hamster Luc2 hücrelerinde sayısal ve yapısal kromozom değişikliklerine olan etkilerini inceledikleri çalışmada insan CREST antikinetekor antikorlarını kullanarak in vitro sitokalsin-B mikronukleus yöntemi kullanmışlardır. Bu yöntem kimyasallar tarafından indüklenen mikronukleusun niteliğini belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu araştırmacılar yaptıkları çalışmada 10 farklı kimyasalın (kolşisin, vinblastin, tiabendazol, kloralhidrat, thimerosal diazepam, pirimetamin, hidrokinon, kadmiyum klorid ve ekonazol nitrat) mikronukleus oluşumu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Kolşisin, vinblastin, tiabendazol, kloralhidrat kimyasallarının antikinetekor antikor pozitif olarak belirlendiği için kromozom kayıplarına neden olduklarını yani anojenik bir etkiye sahip olduklarını belirlemişlerdir. Bu çalışmada kullanılan Thimerosal'in ise antikinetekor antikor negatif olarak belirlendiği için kromozom parça kayıplarına neden olduğunu yani klastojenik bir etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışma ile antikinetekor antikor yöntemi kullanılarak sitokalsin-B mikronukleus tekniğinin anojenik ya da klastojenik ajanların belirlenmesinde kullanılan uygun bir metod olduğu vurgulanmıştır.

Zeiger ve ark. [96] tarafından Thimerosalin mutajenik etkisinin olup olmadığının araştırılması amacı ile bakteriel sistemde Ames testi ile araştırılmış ancak mutajenik etkisinin olmadığı rapor edilmiştir.

Withrow tarafından [97] Timidin kinaz testi kullanılarak fare lenfositleri (L5178L) Thimerosal ve ultraviyole irradyasyona maruz bırakılmış ve mutajenite gözlenmiştir. Thimerosal ultraviyole ışığını absorblamadığı için bu testin güvenilirliği çok net değildir, ancak Lovely ve ark. [98] görünür ışıpta yapılan E.Coli DNA polimeraz A testinde de benzer sonuçlar elde edildiğini belirtmiştir.

Thimerosal'in yakın zamanlarda yapılmış olan fibroblast ve beyin hücre dizilerindeki kısa süreli maruziyetler benzer sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Baskin ve ark. [21] yaptığı çalışmada Thimerosal'in toksisitesi, floresan tekniği ile sinir hücreleri ve fibroblastlarda çalışılmıştır. 125–250µM doz aralığındaki Thimerosal'i 2 µM den itibaren toksik olarak rapor etmişlerdir. Toksikite göstergeleri ise DNA

zincir kırıkları, membran hasarları, kaspaz-3- aktivasyonu ve hücre ölümleridir. Baskin ve ark. [21] elde ettikleri bu toksisite sonuçlarını hücre içerisindeki  $Ca^{+2}$  miktarının artışına bağlamışlardır.

Seunghwan ve ark.[24] in vitro ortamda; Hela –S epitel hücrelerinde timerosal bağımlı sitotoksiteyi çalışmışlardır. Timerosal epitel hücreleri için alerjen olarak kabul edilmektedir. Ancak etki mekanizmasının nasıl gerçekleştiği tam olarak bilinmemektedir. Seunghwan ve ark.[24] bu olayın nasıl meydana geldiği üzerinde yoğunlaşmışlardır. Timerosal'e maruz bıraktıkları hücre serilerinde; MN, apoptozis, glutasyon seviyesi ve hücre yaşayabilirliğini ölçmüşlerdir. Thimerosal'in 100 $\mu$ M dozundan itibaren hücre ölümleri, apoptozis ve MN oranı anlamlı seviyede artmıştır. Thimerosal'deki artışa bağlı olarak hücrelerin yaşayabilirliği azalmış, hücre içi glutasyon seviyesi düşmüş, kaspaz-3 aktivasyonunun artışıyla apoptozis (programlı hücre ölümü) oranı artmış ve genomik DNA parçacıklarının artışıyla mikronukleus oranı artmıştır. Testte Thimerosal'le muameleden sonra ölü hücreler Typan Blue Exclusion testiyle sayılmıştır.

Seunghwan ve ark.[24] ın yaptığı çalışma ile sitotoksitedeki etken maddelerin reaktif oksijen türevleri, glutasyon ve hücre içerisinde miktarı artan  $Ca^{+2}$  olduğu saptanmıştır. Bu araştırmacılara göre artan Thimerosal seviyesi ile; Thimerosal'in bir antioksidan olan glutatyona bağlandığı ve glutasyonun antioksidan özelliğini kaybettiği ve epitel hücreleri bazı reaktif oksijen türevlerinin zararlı etkilerine karşı daha hassas hale geldiğini belirtmişlerdir. Bu reaktif oksijen türevleri; hidrojen peroksit, singlet (serbest) oksijen hidroksi radikali ve lipid peroksitlerdir.

Seunghwan Lee ve ark.[24] apoptozis (programlı hücre ölümü) i şu mekanizma ile açıklamışlardır. Artan Thimerosal miktarı mitokondri membranındaki geçirgenliği değiştirmiştir. Bunun sonucunda mitokondrideki  $Ca^{+2}$  iyonları serbest hale gelmiştir. Böylece apoptoziste bir yolak olan kaspazların zincirleme olarak harekete geçtiklerini ve Thimerosal'in toksik etkisi sonucunda doz artışına bağlı apoptozisin gerçekleşmiş olduğunu vurgulamışlardır. MN oranındaki artışı, şu şekilde açıklamışlardır. Apoptozisin başlamasıyla DNA da hasar meydana gelmiş ve

kopan DNA parçacıkları MN oranını arttırmıştır [24]. Seunghwan Lee ve ark.[24] ın yaptığı çalışmada; Thimerosal'in doza bağlı olarak artışı ile MN oranının da artması bizim yaptığımız çalışmadaki sonuçlar ile tutarlılık gösterdiğini bulmuşlardır.

Ueha-Ishibashi ve ark. [31] tarafından genç sıçanların timus bezi lenfositlerinde Thimerosal'in sitotoksik etkileri incelenmiştir. Floresan prob kullanılarak sitometrik yöntemle hücre içi kalsiyum konsantrasyonu ve membran potansiyeli ölçülmüş apoptotik hücreler ve ölü hücreler sayılmıştır. 3µM Thimerosal'le 60 dk inkübasyon yapıldığında membran geçirgenliğinde düzensizlikler ve hücre ölümlerinin negatif kontrollere göre anlamlı düzeyde arttığı rapor edilmiştir[31].

Ueha-Ishibashi ve ark. [31] Thimerosal'in lenfositlerdeki sitotoksik etkilerinin hücre içerisinde artan  $Ca^{+2}$  konsantrasyonundan kaynaklandığını vurgulamışlardır. Özellikle Ueha-Ishibashi ve ark. yaptığı çalışma ve diğer lenfosit kültürleriyle hazırlanan benzer çalışmaların bulunduğu ortak payda şudur; Lenfositlerde bulunan  $Ca^{+2}$  bağlı  $K^{+}$  kanallarında artan  $Ca^{+2}$  seviyesi  $K^{+}$  kanallarını açmakta ve hiperpolarizasyona neden olmaktadır. Thimerosal'in sülfidril gruplarıyla etkileşimi  $Ca^{+2}$  kanallarının geçirgenliğini değiştirmektedir. Bu kanalların açılmasıyla zar potansiyeli değiştirmektedir. Bu değişim hücrenin yaşayabilirliğini değiştirmektedir[31].

Ueha-Ishibashi ve ark. yaptığı çalışmada Thimerosal'in 3–30 µM aralığında artan dozları kullanılmıştır. Deney  $Ca^{+2}$  seviyesinin 2 mM olduğu ve hiç  $Ca^{+2}$  bulunmayan kültür ortamında iki kez tekrarlandığında 2 mM  $Ca^{+2}$  bulunduran kültür ortamında  $Ca^{+2}$  bulunmayan ortama göre ölümler artmıştır. Bu sonuç sitotoksitenin nedeninin  $Ca^{+2}$  seviyesindeki artışla açıklanabileceğinin bir kanıtıdır[31].

Bu konularda yaptığımız bu tez çalışmasına en yakın olan çalışma; Götz ve ark.[4] ın yapmış oldukları çalışmadır. Götz ve ark.[4] 0,05-0,6µg/ml dozlar arasındaki Thimerosal'i insan lenfositlerine uygulamış ve Thimerosal'in genotoksik etkilerini mikronukleus testi ile incelemişlerdir. 0,05-0,5µg/ml arasında MN oranı

artmış ancak 0,6µg/ml lik dozdan itibaren Thimerosal anlamlı düzeyde toksik etki göstermiştir. [4].

Götz ve ark. [4] tarafından yapılan çalışmada, MN değerlerindeki negatif kontrole göre artış, 0,6µg/ml lik Thimerosal dozundan itibaren anlam bulurken bizim yaptığımız çalışmada tüm dozlardaki ( 0,2- 0,4 -0,6µg/ml) MN değerleri negatif kontrole göre, istatistiksel açıdan anlamlı denecek oranda artış göstermiştir. Bizim yapmış olduğumuz bu çalışma ve Götz ve ark. [4] tarafından yapılan çalışmada, MN değerlerinin her ikisinde de doz artışına bağlı olarak MN değerlerinin artış göstermesi tutarlılık göstermektedir. Ancak Götz ve ark. [4]' a göre; 0,2- 0,4 µg/ml lik Thimerosal dozları toksik değilken bize göre negatif kontrole kıyasla toksiktir.

Yapmış olduğumuz bu tez çalışmasında uygulanan bir diğer test metodu ise KKD testidir. Yapılan KKD testi ile ilgili olarak; Thimerosal'ın KKD üzerine etkilerini araştıran bir çalışma bulunamamıştır. Bu çalışma timerosalin ve yan ürünlerinin KKD üzerine etkilerini in vitro olarak ve S-9 metabolik aktivasyon sistemi kullanarak insan kan lenfositlerinde araştıran ilk çalışmadır. KKD testi daha önce bu çalışma ile yakınlık gösteren ilaç ve ilaç hammaddelerinin genotoksik etkilerinin araştırılmasında kullanılmıştır[64,65].

Thimerosalin KKD üzerine etkilerini; daha önce yapılmış bir çalışma olmadığından, burada Thimerosal'ın içermiş olduğu cıva (Hg) ile ilişkilendirmeye çalışılmıştır. Birçok araştırmacı tarafından cıvanın genotoksik etkileri hem kromozom aberasyonları ve hem de KKD oranları incelenerek rapor edilmiştir.

Akiyama ve ark.[99] diş tedavilerinde kullanılan amalgam maddesinin cıva içermesi nedeniyle araştırmaya değer görülmüştür. Amalgam maddesinin ekstratları elde edilmiştir. % 5.15 µM konsantrasyonda cıva içeren amalgam maddesinin etkilediği aberasyonlu hücre oranı %9,5 iken cıva konsantrasyonu % 11.76 ya kadar arttırıldığında aberasyonlu hücre oranı %58,5'e yükselmiştir. Akiyama ve ark. cıvanın genotoksik etkisinin olabileceğini rapor etmişlerdir[99].



Yapılan diğerk çalışmada çeşitli cıva bileşiklerinin insan lenfositlerinde KKD oranları üzerine etkileri incelenmiştir. Lee ve ark.[100] tarafından yapılan çalışmada cıva nitrat ( $Hg^{+2}$ ), metilcıva klorit ( $CH_3HgCl$ ) ve fenilcıva asetat (PMA) KKD oluşturma kapasiteleri bakımından karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada PMA'nın 1  $\mu M$  ile 30  $\mu M$  arasındaki değişen konsantrasyonlarda doza bağlı olarak KKD oranlarında artışa neden olduğunu belirlemişlerdir. Buna karşılık,  $CH_3HgCl$  sadece 20  $\mu M$  konsantrasyonda gözlenen KKD oranlarındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu çalışmada test edilen tüm cıva bileşiklerinin genotoksik olduklarını belirlemişlerdir. Araştırmacılar Hg bileşiklerinin hücre bölünmesi sırasında iğ ipliklerini oluşturan proteinlerin sülfidril gruplarıyla etkileşime girerek hücre bölünmesini baskıladığı da rapor etmişlerdir[100].

Bu çalışmada Thimerosal'in etkilerinin saptanması amacı ile KKD ve MN test yöntemleri kullanılmış ve ek olarak sitotoksik ve stostatik etkileri de MI ile CBPI değerleri hesaplanarak incelenmiştir.

Yapılan bu çalışmada Thimerosal'in doza bağlı olarak artışı KKD oluşumunu negatif kontrole kıyasla anlamlı seviyede arttırmıştır ( $p \leq 0,01$ ). KKD testi genotoksik ve mutajenik etkinin saptanmasında kullanılmıştır. Thimerosal, MN oranında artışa neden olduğu için genotoksiktir. KKD oranında da artışa neden olduğu için mutajenik etki göstermiştir sonucuna varabiliriz. Thimerosal'in insan lenfositleri üzerinde doz artışına bağlı olarak genotoksik ve mutajenik etki potansiyelinin olduğu bulunmuştur.

Yapılan bu çalışmada Thimerosal'in doza bağlı olarak artışı MN oluşumunu negatif kontrole kıyasla anlamlı seviyede arttırmıştır ( $p \leq 0,01$ ).

Yapılan bu çalışmada Thimerosal'in doza bağlı olarak artışı MI oranını negatif kontrole kıyasla anlamlı seviyede düşürmüştür ( $p \leq 0,01$ ). MI ; hücreler içerisinde mitozaya girenlerin oranını ölçtüğu için MI daki düşüş toksisitenin belirtecidir. Thimerosal'in insan lenfositleri üzerinde doz artışına bağlı olarak hücre

popülasyonlarında mitoz girme oranını azaltma potansiyelinin olduğu belirlenmiştir.

Yapılan bu çalışmada Thimerosal'in doza bağlı olarak artışı CBPI oranını negatif kontrole kıyasla anlamlı seviyede düşürmüştür ( $p \leq 0,01$ ). CBPI; hücrelerin bölünme hızlarını ölçmektedir. Yani stostatik etkiyi ölçmektedir. Thimerosal'in insan lenfositleri üzerinde doz artışına bağlı olarak hücrenin bölünme hızını azaltma potansiyelinin olduğu belirlenmiştir.

Yapılan tüm bu çalışmalar birde S-9 aktivasyon sistemi eklenmiş olan kültür ortamında tekrarlanmıştır. Çünkü bilindiği gibi Thimerosal civa içerikli bir bileşiktir ve Thimerosal'in hücredeki yaşamsal moleküllerle etkileşime giren kısmı civadır. Kültür ortamına S-9 aktivasyon sistemi eklenerek Thimerosal'in metabolize olması sağlanmıştır. Thimerosal'in etkisine bakılırken ortama S-9 aktivasyon sistemi eklenerek te metabolitlerinin etkisi de test edilmiştir.

S-9 aktivasyon sistemi eklendikten sonra; KKD, MI testlerinde, tüm dozlar S-9 içeren ortamdaki aynı dozlar ile karşılaştırıldığında KKD seviyesinde artış MI seviyesinde ise düşüş gözlenmiştir. KKD ve MI testlerinde her bir dozun S-9 lu ve S-9 suz ortamdaki değerleri karşılaştırıldığında; S-9 luların KKD değerleri S-9 suzlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükseliş göstermiştir ( $p \leq 0,01$ ). S-9 luların MI değerleri S-9 suzlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüş göstermiştir ( $p \leq 0,01$ ). Sonuç olarak; Thimerosal'in insan lenfositleri üzerinde doza bağlı olarak KKD oluşturma potansiyeli ve MI değeri S-9 un varlığından etkilenmiştir.

S-9 un varlığı MN ve CBPI değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmamıştır. Yani Thimerosal'in insan lenfositleri üzerinde doza bağlı olarak MN oluşturma miktarları ve CBPI sayısı S-9 un varlığından anlamlı seviyede etkilenmemiştir ( $p \geq 0,05$ ).

İn vitro ortama S-9 aktivasyon sistemi eklenerek kimyasal ürünün metabolizma ürünlerinin etkisi araştırılmaktadır. S-9 lu ortamda ve S-9 suz ortamda

tekrarlanan KKD, MI, CBPI testlerinin sonuçları Yasir ve ark. [81] ve Piesova ve ark. [83] tarafından yapılan çalışmaların sonucu ile tutarlılık göstermektedir.

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmalar neticesinde genel olarak Thimerosal'daki doza bağlı olarak; KKD oranını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırmıştır ( $p \leq 0,01$ ). Bu artış sadece doza bağlı olarak gerçekleşmemiş aynı zamanda kültür ortamında S-9 un varlığına bağlı olarak ta anlamlı bulunmuştur ( $p \leq 0,01$ ). Bu çalışmada  $0,4 \mu\text{g/ml}$  lik dozun S-9 eklenmiş kültürler ile S-9 eklenmemiş kültürler arasındaki fark anlamlı değildir ( $p \geq 0,05$ ). Yapılan bu testteki KKD oranlarının doza bağlı olarak artışı; Thimerosal maddesinin doza bağlı olarak mutajenite ve genotoksisite eğiliminin arttığı sonucu ile açıklanabilmektedir.

Yapılan ikinci test olan MN testinde ise doza bağlı olarak MN oranında bir artış gözlenmiştir. Bu artış KKD testini destekler niteliktedir. Yani timerosalin doza bağlı olarak genotoksisite değerlerindeki artış bu testte de bir kez daha anlam bulmuştur. Ancak bu testte herbir doz; S-9 lu ortamdaki tekrarı ile karşılaştırıldığında artış olduğu belirlenmiştir, fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir ( $p \geq 0,05$ ).

Yapılan üçüncü test; MI değerlerinin sayımıdır. MI değerlerinin düşüşü bir toksisite göstergesidir. Ve genel olarak dozdaki artış mitotik indeksi düşürmüştür. Yani doz arttıkça toksisite de artmaktadır. Ve S-9 un varlığı da bu toksisiteyi daha da güçlendirmiştir.

CBPI; hücrenin bölünme hızlarını ölçen bir yöntemdir. Yani stostatik etki göstergesidir. Bu testte de doz artışına bağlı olarak hücre bölünme hızı düşüş göstermiştir. Dozlar tek tek ele alındığında S-9 un varlığı bölünme hızındaki düşüşü desteklemiş ancak istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde bir fark oluşturmamıştır ( $p \geq 0,05$ ).

Sonuç olarak Thimerosal maddesinin insan lenfositlerinde toksik, genotoksik ve mutajenik etki gösterebilme potansiyeline sahip olduğu bulunmuştur.

- Kullanılan test sistemlerinin (KKD, MI, MN, CBPI) birbirlerini destekler nitelikte olmaları bu test sistemlerinin bu çalışma için uygun olduğunu göstermiştir.
- Bu çalışma Thimerosal'in aşılardaki miktarı referans alınarak yapılmıştır. Ve bize göre tek dozluk aşılarda (Thimerosal içermeyen) daha güvenlidir.
- Diş tedavisinde kullanılan civa içeren amalgam dolgu maddesinin kullanılmaması önerilmektedir.
- Civa ve diğer ağır metaller içeren balık ve deniz ürünlerinin yenmemesi gerekmektedir. (hamsi ve sardalya gibi küçük balıklar daha az ağır metal içerir).
- Gebelik sırasında Thimerosal (civa) içeren aşılardan (grip, menenjit, tetanoz) rasgele yaptırılmaması, ihtiyaç halinde menenjit ve tetanoz aşılarının Thimerosal içermeyenlerinin tercih edilmesi önerilmektedir. Grip aşılarının tümü Thimerosal içermektedir.
- Sadece kendisinin değil aynı zamanda metabolitlerinde toksik olduğu bilinen Thimerosal'in çocukluk çağı aşılardan çıkarılması önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- [1] STED, Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi, Ekim 2000, Maltepe/Ankara  
Erişim; <http://www.ttb.org.tr/STED/sted1000/index.html> [11 02 2006]
- [2] GNU Free Documentation License (05 02 2006),  
Erişim; <http://en.wikipedia.org/wiki/Thimerosal> [11 02 2006]
- [3] Toshiko,U.I., Oyama,Y., Hiromi,N., Chisata,U., Yasutaka,N., Tomoko,T., Kyoko,I., Koji,M. ve Hakaru,S., “Effect Of Thimerosal , A Preservative İn Vaccines, On İntracellular Ca<sup>+2</sup> Concentration Of Rat Cerebellar Neurons”, Toxicology, **195**: 77-84, (2004).
- [4] Götz,W,A., Asgari,S., Schulz,T.G., Bünger,J., Müller,M. ve Hallier,E, “Thimerosal İnduces Micronuclei İn The Cytochalacyn B Block Micronucleus Test With Human Lymphocytes”, Arch Toxicol, **77**: 50-55, (2003).
- [5] Ball,L.K., Ball,R., ve Pratt,R.D. “An Assesment Of Thimerosal Use İn Childhood Vaccines” , Pediatrics, **107**: 1147-1154, (2001).
- [6] Havarinasab,S. ve Hultman,P., “Organic Mercury Compounds And Autoimmunity”, Autoimmunity Reviews, **4**: 270-275, (2005).
- [7] Miller,B., Potter-Locher,F., Seelbach,A., Stoper,H., Utesch,D. ve Madle,S., “Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the in vitro micronucleus test”, Gesellschaft für Umwelt-Mutations-Forschung. Mutat Res, **410**:81–116, (1998).
- [8] Blair,A., Clark,B., Clarke,A. ve Wood,P., “Tissue Concentrations Of Mercury After Chronic Dosing Of Squirrel Monkeys With Thimerosal”, Toxicology ,**3**: 171–176, (1975).

- [9] Kınacı,C. ve Aydın, A., (27-05-2006), “Aşı içindeki cıva çıkartılınca otistik çocukların sayısı azaldı”  
Erişim; [www. Rehabilitasyon.com](http://www.Rehabilitasyon.com). [15.01.2007]
- [10] Erol,D.,(2003), ” Cıva Ve Çeşitli Cıva Formlarının Organizma Üzerine Etkileri’  
Erişim; [www.klinikbiyokimya.com](http://www.klinikbiyokimya.com), [15.01.2007]
- [11] Clements,C.J., Ball LK, Ball,R., ve Pratt D.,’ Thiomersal in vaccines’’, Lancet; **355**: 1279–80 (2000).
- [12] 2 American Academy of Pediatrics, Committee on Infectious Diseases, and Committee on Environmental Health, “ Thimerosal in vaccines—An interim report to clinicians’’, Pediatrics, **104**: 570–74, (1999).
- [13] Ferrat,L., Romeo,M., Gnassia-Barelli,M., ve Pergent-Martini,C. ,’Effects of mercury on antioxidant mechanisms in the marine phanerogam Posidonia oceanica’’, Dis. Aquat. Organ, **50**: 157–160, (2002).
- [14] Ben-Ozer, E., Rosenspire, A., McCabe, M., Worth, R., Kindzelskii, A., Warra, N., ve Petty, H., “Mercuric chloride damages cellular DNA by a non-apoptotic mechanism’’, Mutat. Res., **470**: 19–27, (2000).
- [15] Schurz,F., Sabater-Vilar,M., ve Fink-Gremmels,J. , “Mutagenicity of mercury chloride and mechanisms of cellular defense: The role of metalbinding proteins’’, Mutagenesis, **15**: 525–530, (2000).
- [16] Magos,L., Brown,A.W., Sparrow,S., Bailey,E., Snowden,R.T., ve Skipp, W. R., “ The comparative toxicology of ethyl- and methylmercury’’, Arch. Toxicol., **57**: 260–267, (1985).
- [17] Notice to Readers Thimerosal in vaccines: a joint statement of the American Academy of Pediatrics and the Public Health Service, ‘21 USC 397 Section 413’ , MMWR Morb Mortal Wkly Rep, **48**:563-565, (1999).

- [18] www.haber7, (16 Aralık 2006 ), “Firma Bush'un kanatları altında çıktı” Erişim; [www.haber7.com.tr](http://www.haber7.com.tr). [15.01.2007]
- [19] Powell, H.M. ve Jamieson,W.A., “ Merthiolate as a germicide”, Am J Hyg, **13**:296-310, (1931).
- [20] Mason,M.M., Cate,C.C. ve Baker,J., “ Toxicology and carcinogenesis of various chemicals used in the preparation of vaccines”, Clin Toxicol; **4**:185-204, (1971).
- [21] Baskin,David,S., HopNgo, ve Vladimir,V., “ Didenko Thimerosal Induces DNA Breaks, Caspase-3 Activation, Membrane Damage, and Cell Death in Cultured Human Neurons and Fibroblasts”, Toxicological Sciences, **74**: 361–368 (2003).
- [22] Geier,David,A., , Geier.MarkR. ve, “ A two-phased population epidemiological study of the safety of thimerosal-containing vaccines: a follow-up analysis”, Med Sci Monit, **11(4)**: 160-170, (2005).
- [23] Michelle,L., Humphrey,A., Marsha,P., Cole,B., James,C., Pendergrass,C. ve Kinsley,K., “Kiningham Mitochondrial Mediated Thimerosal-Induced Apoptosis in a Human Neuroblastoma Cell Line (SK-N-SH)”, NeuroToxicology,**26**:407–416, (2005).
- [24] Seunghwan,L., Md. Firoz Mianb, Hu-Jang Lee a, Chung-boo Kanga, Jong-Shu Kima, Sung Ho Ryub, Pann-Ghill Suhb, ve Euikyung Kima, ”‘Thimerosal induces oxidative stress in HeLa S epithelial cells”, Environmental Toxicology and Pharmacology, (14 mart 2006).
- [25] Kim,E., Kim,J.H., Kim,H.S., Ryu,S.H., ve Suh,P.G., “ Thimerosal stimulates focal adhesion kinase and cytoskeletal changes by redox modulation”, Biochim. Biophys. Acta, **1593**: 9–15, (2002).



- [26] Silva-Pereira<sup>1</sup>,L.C., Cardoso, P.C.S., Leite, D.S., Bahai, M.O., Bastos ,W.R., Smith ,M.A.C. ve Burbano,R.R., “ Cytotoxicity and genotoxicity of low doses of mercury chloride and methylmercury chloride on human lymphocytes in vitro” , Brazilian Journal Of Medical And Biological Research, **38**: 901-907, (2005).
- [27] M.R. Geier, M.D., Ph.D. ve D.A.Geier, “Thimerosal in Childhood Vaccines, Neurodevelopment Disorders, and Heart Disease in the United States”, Journal of American Physicians and Surgeons Volume, **8**: (2003).
- [28] Wilson,M., George,L., Lins,C. ve Tania, M. P.D., “ Immuno-biochemical evaluations of phenol and thimerosal as antigen preservatives in Montenegro skin test” , Acta Tropica, **98**: 87–93, (2006).
- [29] Kiningham,K. ve Pendergrass,C., “ In Vitro Treatment of a Neuroblastoma Line With Low Concentrations of Thimerosal Results In Apoptosis And Altered Nuclear Binding” Erişim;  
<http://www.altcorp.com/DentalInformation/thimneurotoxa.htm>, [15.01.2007]
- [30] Pichichero,M.E., Cernichiari,E., Lopreiato,J. ve Treanor,J., “ Mercury Concentrations And Metabolism In Infants Receiving Vaccines Containing Thiomersal: A Descriptive Study” , Lancet, **360**: 1737–41, (2002).
- [31] Ueha-Ishibashi,T., Oyama,Y., Nakao,H., Umebayashi,C., Hirama,S., Sakai,Y., Ishida,S. ve Okano,Y., “ Flow-cytometric analysis on cytotoxic effect of thimerosal, a preservative in vaccines, on lymphocytes dissociated from rat thymic glands” , Toxicology in Vitro, **19**: 191–198, (2005).
- [32] Thimerosal’lı aşılarda otizm riski, ( 08:55 31 Ağustos 2005 Çarşamba)Erişim; <http://www.ntvmsnbc.com/news/337646.asp> [18 aralık 2006]

- [33] Meakin,B.J. ve Khammas, Z.M., “ An observation on the determination of thiomersol at preservative concentration by flameless atomic absorption spectroscopy”, *J. Pharm.Pharmacol*, **31**: 653–654, (1979).
- [34] Richardson,N.E., Davies,D.J.G., Meakin,B.J. ve Norton,D.A., “Loss of antibacterial preservatives from contact lens solutions during storage”, *J. Pharm. Pharmacol*, **29**: 717–722, (1977).
- [35] Lam,S.W., Meyer,R.C. ve Takahashi,L.T., “ Determination of thimerosal in ophthalmic solutions by radial compression separation HPLC.”, *J. Parent. Sci. Technol*, **35**: 262–265 (1981).
- [36] Reader,M.J. ve Lines,C.B., “Decomposition of thimerosal in aqueous solution and its determination by high-performance liquid chromatography”, *J. Pharm. Sci*, **72**: 1406– 1409, (1983).
- [37] Holak,W., “Analysis of mercury-containing drugs by high performance liquid chromatography with atomic absorption Detection”, *J. Liq. Chromatogr*, **8**: 563–569, (1985).
- [38] Parkin,J.E., “Assay of thiomersal (thimerosal) with adaptation to the quantitation of total ethylmercury available in degraded samples”, *J. Chromatogr*, **587**: 329–332, (1991).
- [39] Parkin, J.E., “High-performance liquid chromatographic assay of thiomersal (thimerosal) as the ethylmercury dithiocarbamate complex”, *J. Chromatogr*, **542**: 137–143, (1991).
- [40] Fleitman,J.S., Partridge,I.W. ve Deu,D.A., “Thimerosal analysis in ketorolac tromethamine ophthalmic solution. Comparing HPLC and colorimetric techniques”, *Drug Dev. Ind. Pharm*, **17**: 519–530, (1991).

- [41] Procopio,J.R., Da Silva,M., Asensio,M., Sevilla,M.T. ve Hernandez,L., “HPLC analysis of thimerosal and its degradation products in ophthalmic solutions with electrochemical detection”, *Talanta*, **39**: 1619–1623, (1992).
- [42] Pilar.da.Silva,M., Procopio,J.R. ve Hernandez,L., “Liquid chromatographic study of the photochemical decomposition of sodium ethylmercurithiosalicylate”, *Anal. Chim. Acta*, **283**: 326–333, (1993).
- [43] Pilar da Silva, Procopio,J.R. ve Hernandez,L., “Evaluation of the capability of different chromatographic systems for the monitoring of thimerosal and its degradation products by high-performance liquid chromatography with amperometric detection”, *J. Chromatogr*, **653**: 267–273, (1993).
- [44] Rabenstein,D.L., “The aqueous solution chemistry of methylmercury and its complexes” *Acc. Chem. Res.*, **11**: 100–107, (1978).
- [45] Carty,A.J. ve Malone,S.F., “The chemistry of mercury in biological systems.”, In: Nyagus (Ed.), *The Biogeochemistry of Mercury in the Environment*. Elsevier, Amsterdam, (1979).
- [46] Tan,M. ve Parkin, J.E., “Route of decomposition of thiomersal (thimerosal)”, *International Journal of Pharmaceutics*, **208** : 23–34, (2000).
- [47] Jamesa,S.J., Slikker,W, Stepan,M., Elizabeth,N., Marta,P. ve Stefanie,S., “Thimerosal Neurotoxicity is Associated with Glutathione Depletion: Protection with Glutathione Precursors”, *Neurotoxicology*, (28 July 2004).
- [48] Sanfeliu,C., Sebastia,J., Cristofol,R. ve Rodriguez-Farre,E., “Neurotoxicity of organomercurial compounds”, *Neurotox Res* **5(4)**:283–305, (2003).
- [49] Meister,A., “Glutathione metabolism”, *Methods Enzymol*, **251**: 3–7, (1995).

- [50] Awata,S., Nakayama,K., Suzuki,I., Sugahara,K. ve Kodama,H., “ Changes in cystathionine gamma-lyase in various regions of rat brain during development.”, *Biochem Mol Biol Int*, **35(6)**:1331–8, (1995).
- [51] Lu,S.C., “ Regulation of hepatic glutathione synthesis.”, *Semin Liver Dis*, **18(4)**: 331–43, (1998).
- [52] Dringen,R. ve Hirrlinger,J., “Glutathione pathways in the brain.”, *Biol Chem*, **384(4)**:505–16, (2003).
- [53] Kranich,O., Hamprecht,B. ve Dringen,R., “ Different preferences in the utilization of amino acids for glutathione synthesis in cultured neurons and astroglial cells derived from rat brain.”, *Neurosci Lett*, **219(3)**:211–4, (1996).
- [54] Kranich,O., Dringen,R., Sandberg,M. ve Hamprecht,B., “ Utilization of cysteine and cysteine precursors for the synthesis of glutathione in astroglial cultures: preference for cystine.”, *Glia*, **22(1)**: 11–8, (1998).
- [55] Wang,X.F. ve Cynader,M.S., “Astrocytes provide cysteine to neurons by releasing glutathione.”, *J Neurochem* , **74(4)**:1434–42, (2000).
- [56] İlaçların Zararlı Etkileri, Önlem ve Tedavileri  
Erişim; <http://www.aof.edu.tr/kitap/EHSM/1212/unite03> [18 aralık 2006]
- [57] Yönetmelik Çevre ve Orman Bakanlığında: Tıbbi Atıkların Kontrolü  
Yönetmeliği RESMÎ GAZETE: 22.05.2005 / 25883
- [58] İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı, “ İlaçların Toksik Etkileri”, (17 Ocak 2006)  
Erişim; <http://www.ctf.edu.tr/farma/yanetki.pdf> [18 aralık 2006]

- [59] Bayel,İ., “Terbinafin’in İnsan Lenfosit Kültürlerindeki Etkilerinin Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) Yöntemi İle İn Vitro Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi , Tıp Fakültesi, Mersin, (2006).
- [60] Çelik,A., “Petrol İstasyonu Çalışanlarında Kromozom Düzensizliklerinin Ve Kardeş Kromatid Değişiminin İncelenmesi”, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin, (Haziran 2001).
- [61] Kato,H., “Possible role of DNA synthesis in information of sister chromatid exchanges”, Nature, **252**: 739-741, (1974).
- [62] Tsui,Y.C., Creasy,M.R. ve Hulten,M.A., “The Effect Of The Male Contraseptive Agent Gossypol On Human Lymphocytes In Vitro:Traditional Chromosome Breakage Micronüklei Sce And Cell Kinetics”, Journal Of Medical Genetics , **20**: 81-85, (1988).
- [63] Perry,P. ve Wolf,S., “New Giemsa Metod For Differential Staining Of Sister Chromatids” , Nature, **261**:156-158, (1974).
- [64] Shafer,D.A., “Replication bypass model of sister chromatid exchange and implications for bloom’s sendrome and fanconi’s anemia” , Hum Genet, **39**:177-190, (1977).
- [65] Latt,S.A., Sehrek,R.R., Loveday,K.S., Dougherty,C.P. ve Schuler,C.F., “Sister Chromatid Exchange”, Hum genet, **10**:267-331, (1980).
- [66] Wolf,S., “Sister chromatid Exchange”, Ann. Rev. Genet , **11**:183-201, (1977).
- [67] Sister Chromatide Exchange,UCRL-WEB-219230

Erişim; [www.llnl.gov/bio/groups/dna\\_repair/sce.html](http://www.llnl.gov/bio/groups/dna_repair/sce.html); [18 aralık 2006]

- [68] Taylor,J.H., Woods,P.S. ve Hughes,M.L., “The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine.”, Proc Natl Acad Sci, **261**:156-158, (1957).
- [69] Genotoxicity : Sister Chromatid Exchange Test Erişim;  
[http://images.google.com.tr/images?hl=tr&q=sister+chromatid+exchange&gbv=2\\_cdfc00.rug.ac.be/HealthRisk/genotoxicitytests...](http://images.google.com.tr/images?hl=tr&q=sister+chromatid+exchange&gbv=2_cdfc00.rug.ac.be/HealthRisk/genotoxicitytests...)  
[www.utexas.edu](http://www.utexas.edu) [18 aralık 2006]
- [70] Perry,P. ve Evans,H.J., “Cytological Detection Of Mutagen Carcinogens Exposure By Sister Chromatid Exchange.”, Nature, **258**:121-125, (1975).
- [71] Galloway,S.M. ve Woff,S., “The relation between chemically induced sister chromatid Exchange and chromatid breaks.”, Mut.Res. , **61**:297-307, (1979).
- [72] Gebhart,E., “Sister Chromatid Exchange(SCE) and structural chromosome aberation in mutagenity testing” , Hum. Genet, **58**:235-254, (1981).
- [73] Kihlma,BA., Sturelid,S., Palitti,F. ve Bechetti,A., “ Effects of caffeine an inhibitör of post replication repair in mamalian cells on the frequency chromosomal aberation and sister chromatid Exchange induced by mutagenic agents” , sMutat. Res., **46**:130-131, (1977).
- [74] Çavaş,T., “Endüstriel Atıkların Genotoksik Etkilerinin Mikronukleus Testi Ve Agnor Analiz Teknikleri Kullanılarak İn-Situ Ve Laboratuar Koşulları Altında Araştırılması” , Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı, (Ocak 2004).
- [75] Fenech,M, Chang,W.P., Kirsch-Volders.M., Holland,N., Bonassi,S. ve Zeiger,E., ’Human Micronucleus project. "HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay

using isolated human lymphocyte cultures', *Mutat Res.*, **534(1-2)**:65-75, (2003).

Erişim; <http://we.vub.ac.be/~cege/volders/ENG/tests/MN.htm> [18 aralık 2006]

- [76] Tomanin,R., Ballarin,C., Nardini,B., Mastragello,G. ve Sarto,F. "Influence of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes by cytokinesis block method", *Mutagenesis*, **6(2)**:123-126, (1991) .
- [77] Fenech,M. ve Morley,A.A., "Measurement Of Micronuclei İn Lymphocytes", *Mutant.Res.*, **148**:99-105, (1985).
- [78] Ames,B.N., Durston,W.E., Yamasaki,E. ve Lee,F.D., "Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection", *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **70**:2081–2285, (1973).
- [79] Maron, D.M. ve Ames, B.N., "Revised methods for the Salmonella mutagenicity test", *Mutat. Res.*, **113**: 173–215, (1983).
- [80] Yasir,H. S., ve Mohammad, A., "Induction of Chromosomal Aberrations and Sister Chromatid Exchanges by Cyproterone Acetate in Human Lymphocytes", *Int J Hum Genet*, **4(3)**: 187-191 (2004).
- [81] Siddique,Y.H., Ara,G., Beg,T. ve Afzal,M., "Genotoxic potential of medroxyprogesterone acetate in cultured human peripheral blood lymphocytes", *Science Direct Life Sciences* (2006).
- [82] Zeljezic,D. ve Garaj-Vrhovac,V., "Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation", *Science Direct, Toxicology*, **200**:39–47, (2004).

- [83] Piesova, E. ve Sivikova,K., “The Induction Of Micronuclei In Bovine Lymphocytes By Exposure To Benzene and S-9 Mix”, *Ann Agric Environ Med*, **10**: 261–263, (2003).
- [84] Jorge,I., González,B., Amadeu,C. ve Ricard,G., “Genotoxic evaluation of the furylethylene derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-nitroethene in cultured human lymphocytes”, *Mutat. Res.*, **519**: 179–185, (2002) .
- [85] Çelik,A. ve Ateş,N.A., “The Frequency Of Sister Chromatid Exchanges In Cultured Human Peripheral Blood Lymphocyte Treated With Metronidazole In Vitro”, *Drug And Chemical Toxicolgy*, **1**:85-94, (2006)
- [86] Surralles,j., Xanema,N., Creus,A., Catalan,J., Norppa,H. ve Marcos,R., “Introduction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole blood and isolated lymphocyte cultures”, *Mutat. Res.*, **341**: 169-184, (1995).
- [87] Ribas,G., Surralles,J., 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).
- [88] Marrazzini,A., Betti.C., Bernacchi,F., Barrai,I. ve Barale,R., “Micronucleus test and metaphase analyses in mice exposed to known and suspected spindle poisons”, *Mutagenesis*, **9**:505–515, (1994).
- [89] Adler, I.D., Kliesch,U., van Hummelen ,P. ve Kirsch-Volders, M., “Mouse micronucleus tests with known and suspect spindle poisons: results from two laboratories” *Mutagenesis*, **6**:47–53,(1991).
- [90] Migliore,L. ve Nieri,M., “ Evaluation of twelve potential aneuploidogenic chemicals by the in vitro human lymphocyte micronucleus assay”, *Toxicol In Vitro*, **5**:325–336,(1991)



- [91] Seelbach,A., Fissler,B. ve Madle,S., “Further evaluation of a modified micronucleus assay with V79 cells for detection ofaneugenic effects” Mutat Res, **303**:163–169, (1993).
- [92] Van Hummelen,P. ve Kirsch-Volders,M., “Analysis of eight known or suspected aneugens by the in vitro human lymphocyte micronucleus test”, Mutagenesis, **7**:447–455, (1992).
- [93] Bonatti.S., Cavalieri,Z., Viaggi,S. ve Abbondandolo,A., “The analysis of 10 potential spindle poisons for their ability to induce CREST-positive micronuclei in human diploid fibroblasts”, Mutagenesis, **7**:111–114, (1992).
- [94] Antoccia,A., Degrassi,F., Battistoni,A., Ciliutti,P. ve Tanzarella,C., “In vitro micronucleus test with kinetochore staining: evaluation of test performance”, Mutagenesis, **6**:319–324, (1991).
- [95] Lynch,A.M. ve Parry,J.M., “The cytochalasin B micronucleus/ kinetochore assay in vitro: studies with 10 suspected aneugens”, Mutat Res, **287**:71–86, (1993)
- [96] Zeiger,E., Anderson,B., Haworth,S., Lawlor,T., Mortelmans,K. ve Speck,W., “Salmonella mutagenicity tests: III. Results from the testing of 255 chemicals”, Environ Mutagen, **9**:1–109, (1987).
- [97] Withrow,T.J., Brown,N.T., Hitchins,V.M. ve Strickland,A.G., “Cytotoxicity and mutagenicity of ophthalmic solution preservatives and UVA radiation in L5178Y cells”, Photochem Photobiol , **50**:385–389, (1989).
- [98] Lovely,T.J., Levin,D.E. ve Klekowski,E., “Light-induced genetic toxicity of thimerosal and benzalkonium chloride in commercial contact lens solutions”, Mutat Res, **101**:11–18, (1992)

- [99] Akiyama,M., Oshima,H. ve Nakamura,M., “Genotoxicity of mercury used in chromosome aberration tests”, *Toxicology in Vitro*, **15**: 463–467, (2001).
- [100] Lee,C.H., Lin,R.H., Liu,S.H. ve Shiau,S.Y.L., “Distinct Genotoxicity Of Phenylmercury Acetate In Human Lymphocytes As Compared With Other Mercury Compounds” , *Mutat. Res.* **392**:269-276, (1997).

## **ÖZGEÇMİŞ**

1981 yılında Malatya da doğdu. İlk ve orta öğretimini bitirdikten sonra 1999 yılında Malatya İnönü Üniversitesi'nde Biyoloji eğitimine başladı. 2003 yılında eğitimini tamamladıktan sonra 2004 yılında Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında, yüksek lisans eğitimine başladı. Halen burada yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.