

**T.C  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN KAN LENFOSİTLERİNDE SİTRİNİNİN  
MİKRONÜKLEUS SIKLIĞI VE MİTOTİK İNDEKS ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan  
Gülcan DUMLUPINAR COŞGUN**

**Tezi Yöneten  
Prof.Dr.Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ**

**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Şubat 2006  
KAYSERİ**



**T.C  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSAN KAN LENFOSİTLERİNDE SİTRİNİNİN  
MİKRONÜKLEUS SIKLIĞI VE MİTOTİK İNDEKS ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan  
Gülcan DUMLUPINAR COŞGUN**

**Tezi Yöneten  
Prof.Dr.Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ**

**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından SBY-04-33 nolu  
proje ile desteklenmiştir.**

**Şubat 2006  
KAYSERİ**

**Prof.Dr.Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ** danışmanlığında **Gülcan DUMLUPINAR COŞGUN** tarafından hazırlanan “**İnsan Kan Lenfositlerinde Sitrininin Mikronükleus Sıklığı ve Mitotik İndeks Üzerine Etkilerinin Araştırılması**” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Tıbbi Biyoloji** Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

03/02/2006

**JÜRİ :**

**İmza**

Üye : Prof.Dr.Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ

Üye : Prof.Dr.Halil DEMİRTAŞ

Üye : Prof.Dr. Bilal Cem LİMAN

**ONAY**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

**Enstitü Müdürü**  
Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU

### TEŞEKKÜR

“İnsan Kan Lenfositlerinde Sitrininin Mikronükleus Sıklığı ve Mitotik İndeks Üzerine Etkilerinin Araştırılması” isimli Yüksek Lisans tezimin hazırlanmasında ve akademik eğitimimde emek ve yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof.Dr.Hamiyet DÖNMEZ ALTUNTAŞ’a, çalışmalarım boyunca beni destekleyen ve yönlendiren hocalarım Prof.Dr.Halil DEMİRTAŞ’a ve Doç.Dr.Nurhan CÜCER’e, laboratuvar çalışmalarımda büyük yardımlarını gördüğüm arkadaşlarım Araş.Gör.Zuhal HAMURCU ve Araş.Gör.Nalan İMAMOĞLU’na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmanın yapılmasında, hastaların klinik muayenelerini yapan ve kan örneklerini alan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda Doktorasını yapan arkadaşım Dr.Atilla ŞAHİN’e ve zorluk çıkarmadan kan örnekleri veren kişilere teşekkür ederim.

Sürekli olarak maddi ve manevi yönden emeklerini esirgemeyen eşim Murat COŞGUN’a ve aileme saygı ve şükranlarımı sunarım.

## İNSAN KAN LENFOSİTLERİNDE SİTRİNİNİN MİKRONÜKLEUS SIKLIĞI VE MİTOTİK İNDEKS ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

### ÖZET

Mikotoksinler, insanlarda ve hayvanlarda hastalıklara ve ölüme sebep olabilen mikrofunguslar tarafından oluşturulan ikincil metabolitlerdir.

Bu çalışmada, insan periferel kan lenfositleri üzerinde mikotoksin sitrininin (CTN) genotoksik ve sitotoksik etkileri çalışılmıştır. Altı sağlıklı sigara içmeyen bireyden (3 erkek ve 3 kadın) periferel kan örnekleri alınmış ve kültüre edilmiştir. Lenfosit kültürleri son 48 saat 10 µM, 20 µM, 40 µM, 60 µM, 80 µM, 100 µM konsantrasyonlarda CTN, 0.1 µM konsantrasyonda mitomisin c (pozitif kontrol) ve absolu etanol ile muamele edilmiştir. Sitokinezi durdurmak için, kültürler 44. saatte 3 µg/ml son konsantrasyonda sitokalazin B (Cyt-B) eklenmiş ve 72. saatte kültürler sonlandırılmıştır.

CTN, insan lenfositlerinde doza bağlı olarak mikronukleus (MN) frekansında önemli bir artışa ve doza bağlı olarak mitotik indeks (MI) oranlarında önemli bir azalmaya sebep olmuştur. CTN'in, sitokinezi bloke edilmiş lenfositlerde 60 µM, 80 µM, 100 µM konsantrasyonlarda MN oluşumunu artırdığı bulunmuştur (p=0.014). Tüm CTN konsantrasyonları, binükleer hücrelerin oranlarında ve MI değerlerinde açık bir azalmaya yol açmıştır (p=0.014).

Bu sonuçlar, kültüre edilmiş insan lenfositlerinde yüksek konsantrasyonlardaki CTN'in genotoksik ve sitotoksik olduğuna işaret etmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Sitrinin; Lenfosit; Mikronükleus; Mitotik indeks

**INVESTIGATION OF EFFECTS OF THE CITRININ ON  
MICRONUCLEUS FREQUENCY AND MITOTIC INDEX IN THE  
HUMAN BLOOD LYMPHOCYTES**

**ABSTRACT**

Mycotoxins are secondary metabolites produced by micro fungi that are capable of causing disease and death in humans and other animals.

In the present study, the mycotoxin citrinin (CTN) were evaluated for their genotoxic and cytotoxic effects to human peripheral blood lymphocytes. Peripheral blood samples were obtained and cultured from six healthy non-smoking individuals (3 females and 3 males). Lymphocyte cultures were treated for the last 48 h with CTN at the following concentrations, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 60  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, and 0.1  $\mu$ M mitomycin c (positive control) and absolute ethanol. To block cytokinesis, at 44 h of incubation, cytochalasin-B (Cyt-B) was added to cultures to give a final concentration of 3  $\mu$ g/ml, and harvested cells at 72 h.

CTN caused a significant dose-dependent increase in micronucleus (MN) frequency and a significant dose-dependent decrease in mitotic index rates in human lymphocytes. At the 60  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 100  $\mu$ M concentrations, CTN was found to induce MN in cytokinesis-blocked lymphocytes ( $p=0.014$ ). The all CTN concentrations also led to a clear decrease in the percentage of binucleated cells and mitotic index values ( $p=0.014$ ).

These results indicate that CTN at the high concentrations is genotoxic and cytotoxic in cultured human lymphocytes.

**Key words:** Citrinin, Lymphocytes, Micronucleus, Mitotic index

**İÇİNDEKİLER**

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK .....	I
KABUL VE ONAY SAYFASI .....	II
TEŞEKKÜR .....	III
ÖZET .....	IV
ABSTRACT .....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ .....	VIII
KISALTMALAR .....	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. MİKOTOKSİNLER.....	3
2.1.1. Mantarların Gelişmesi ve Mikotoksin Sentezini Etkileyen Faktörler.....	7
2.1.2. Mikotoksinlerin Etki Şekilleri.....	8
2.2. SİTRİNİN.....	12
2.2.1. Sitrininin Fizikokimyasal Özellikleri.....	12
2.2.2. Biyosentetik Yol ve Üretimi Etkileyen Fizyolojik Faktörler Analizi.....	13
2.2.3. Sitrinin Toksisitesi ve Stabilitesi.....	13
2.2.4. Sitrinin Genotoksisitesi.....	14



	<u>Sayfa No</u>
2.3. İN VİTRO MİKRONÜKLEUS TEKNİĞİ.....	15
2.3.1. İnsan Lenfositlerindeki Standart Sitokinez-Blok Mikronükleus Analizi.....	18
2.3.2. Sitozin Arabinozid Mikronükleus Analizi Kullanarak Go/G1 Evresindeki İnsan Lenfositlerinde Çıkarılıp Yeniden Tamir Edilen DNA Lezyonlarının Ölçülmesi.....	18
2.3.3. Sitokinez-Bloklı ve Sitokinez-Bloksuz Hücrelerdeki Mikronükleus Analizi.....	20
2.3.4. Mikronükleus ve Non-disjunction' daki Kromozom Kaybını Ölçmek İçin Geliştirilen Moleküler Teknikler.....	21
2.3.5. In Vitro Genotoksositeyi Test Etmede Kullanılan Uygulama.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. GEREÇLER.....	23
3.2. YÖNTEM.....	25
4. BULGULAR.....	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	44
6. KAYNAKLAR .....	48
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

## TABLO, ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
<b>Tablo 2.1.</b> Mikotoksin çeşitleri, kaynakları, hedef hayvan, doku veya organlar.....	5
<b>Tablo 2.2.</b> Bazı mikotoksinlerin DNA, RNA ve protein sentezine etkileri.....	11
<b>Tablo 4.1.</b> Altı kişinin lenfositlerinde farklı sitrinin dozları, negatif kontrol, pozitif (MMC) kontrol ve etanol kontrollerdeki MN <sup>7</sup> lu binükleer hücrelerin sayıları.....	34
<b>Tablo 4.2.</b> Altı kişinin lenfositlerinde farklı sitrinin dozları, negatif kontrol, pozitif (MMC) kontrol ve etanol kontrollerdeki binükleer hücre/mononükleer hücre değerleri.....	36
<b>Tablo 4.3.</b> Farklı sitrinin dozları, negatif kontrol, pozitif (MMC) kontrol ve etanol kontrollerdeki binükleer hücrelerin sayısı, MN <sup>7</sup> lu binükleer hücrelerin sayıları, MN sayıları ve binükleer hücrelerin yüzdeleri.....	38
<b>Tablo 4.4.</b> Altı kişinin lenfositlerinde farklı sitrinin dozları, negatif kontrol, pozitif (MMC) kontrol ve etanol kontrollerdeki mitoz ve hücre sayıları.....	39
<b>Tablo 4.5.</b> Altı kişinin lenfositlerinde farklı sitrinin dozları, negatif kontrol, pozitif (MMC) kontrol ve etanol kontrollerdeki mitotik indeks değerleri.....	40
<b>Şekil 2.1.</b> Bazı mikotoksinlerin etki yerleri.....	9
<b>Şekil 2.2.</b> Sitrinin yapısı.....	13
<b>Şekil 2.3.</b> Mikronükleus oluşumu.....	16
<b>Şekil 2.4.</b> Bir bölünme döngüsü içinde eksizyon ile onarılabılır DNA lezyonunun ARA ile MN <sup>7</sup> lara dönüşümü.....	20

## IX

<b>Şekil 4.1.</b>	Altı kişinin lenfositlerinde farklı sitrinin dozlarındaki binükleer / mononükleer hücre değerleri.....	41
<b>Şekil 4.2.</b>	Altı kişinin lenfositlerinde farklı sitrinin dozlarındaki MN'lu binükleer hücrelerin sayıları.....	42
<b>Şekil 4.3.</b>	Altı kişinin lenfositlerinde farklı sitrinin dozlarındaki Mitotik indeks değerleri.....	43
<b>Resim 3.1.</b>	MN'lu binükleer (BN) hücre.....	32

## KISALTMALAR

<b>ARA</b>	: Arabinozid
<b>BN</b>	: Binükleer
<b>CBMN</b>	: Sitokinez Bloklı Mikronükleus
<b>CTN</b>	: Sitrinin
<b>Cyt-B</b>	: Sitokalazin B
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>ISH</b>	: İn Situ Hibridizasyon
<b>KKD</b>	: Kardeş Kromatid Değişimi
<b>M</b>	: Molar

<b>MI</b>	: Mitotik İndeks
<b>MMC</b>	: Mitomisin C
<b>MN</b>	: Mikronükleus
<b>MNBN</b>	: Mikronükleuslu Binükleer Hücre
<b>PHA</b>	: Fitohemaglutinin
<b>UV</b>	: Ultraviyole

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Türkiye'den ihraç edilen kırmızı biberlerde kanserojen bir mikotoksin olan aflatoksin bulunması nedeniyle geri gönderilmesi, son yıllarda ilgiyi mikotoksinler üzerine çekmiştir. Mikotoksinler, küf mantarlarının ürettiği, metabolitler olarak açığa çıkar ve küf mantarları üzerinde üredikleri birçok gıda maddesinde mikotoksinleri sentezler. Özellikle hububatlar, funguslarla hasattan önce tarlada ve hasat zamanı yağışlı mevsimlerde ve sıcaklığın uygun olduğu ortamlarda infekte olur, taşıma ve depolama sırasında bozulma artar. Bu durum düşük ürün rekoltesine, kalite kaybına, besin değerinde azalmaya ve toksik metabolitlerin üretimine yol açar.

Tarım ürünlerinin çeşitliliği bakımından zengin bir ülke olan yurdumuzda, işlenmiş hububat, bakliyat ile kahvaltılık çerez gibi gıdalar, ülkemiz beslenmesinde çok önemli bir yer tutmakta ve yurt dışına giderek artan miktarlarda ihraç edilen işlenmiş hububat ve bakliyat ürünleri aynı zamanda ülkemiz ekonomisi bakımından da önem arz etmektedir. Bu nedenle besinlerin (üretimden tüketiciye sunuluncaya kadar) tüm besin zinciri boyunca geçirdiği aşamalarda, mikotoksinlerle kontaminasyonun önlenmesi, hijyen bakımından kontrol ve analizlerinin yapılması gerekmektedir. Ayrıca hayvan yemlerinde ve besinlerde

bulunan mikotoksinler, insan ve çiftlik hayvanlarında ciddi sağlık problemlerine yol açtığı bilinmektedir.

Mikotoksinler ile kontamine olmuş yiyecekleri tüketen insan ve hayvanlarda meydana gelen zehirlenmelere de "mikotoksikozis" denir. Sitrinin de aflatoksin gibi özellikle hububat çeşitlerini kontamine etmekte ve nefrotoksik, hepatotoksik ve embriyotoksik etkileri bulunmaktadır.

Önemli mikotoksinler arasında yer alan sitrininin mutajenik ve sitotoksik etkileri üzerine yapılan çalışmalar az sayıdadır. Çalışmamızda, sitrinin değişik dozlarda insan lenfosit kültürlerine in vitro şartlarda eklenerek, mikronukleus testi ve mitotik indeks oranları kullanılarak, sitrininin insan kan lenfositleri üzerindeki mutajenik ve sitotoksik etkileri araştırılacaktır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. MİKOTOKSİNLER**

Mikotoksinler mantarlar (küfler) tarafından meydana getirilen ve bunları içeren yem, yem hammaddeleri ve besinleri yiyen hayvan ve insanlarda zehirlenmelere ve ölümlere yol açabilen maddelerdir. Mikotoksin terimi mantar anlamına gelen myco ve zehir anlamındaki toxin kelimelerinin birleştirilmesinden türetilmiştir; insan ve hayvanlarda mikotoksinlerin sebep oldukları olaylar da mikotoksin zehirlenmeleri olarak bilinirler (1-4).

Mikotoksin oluşturan mantarlar dünya'nın her tarafında bulunurlar. Gerek sahada ve gerekse harmanlanma, depolanma, taşınma ve hazırlanma aşamalarında, özellikle ısı ve rutubet olmak üzere, şartlar mantarların gelişmesine uygun olduğu takdirde, yem ve besinler mantarların istilasına uğrayarak, mikotoksinlerle kirlenebilir. Bu sebeple, yemlerden kaynaklanan çeşitli olumsuzluk faktörleri arasında, mantar istilası ve mikotoksinlerden ileri gelen kirlenmelerle sık şekilde karşılaşılır. Bu kirlenmelerin doğurduğu olayların hayvanlarda pek farkına varılmadan seyretmesi de gerek hayvan sağlığı ve ekonomi işletmecilik yönünden ve gerekse de kalıntıları vasıtasıyla toplum sağlığı üzerinde doğurabilecekleri olumsuzluklar bakımından günümüzde en çok ilgi duyulan konuyu teşkil ederler (1-6).

Önceden besin veya yemlerde üreyen mantarlar onların sadece görünüşünde estetik bakımdan bir değişiklik yaptığı kabul edilir ve küflü kısımların atılması sonucu kalan az küflenmiş kısımların insanlar, ileri derecede küflenmiş kısımların da hayvanlar tarafından tüketilmesinin sağlıkları üzerinde önemli sakıncaya yol açmayacağı kabul edilirdi. Ama, 1960'lı yılların başında, İngiltere'de özellikle hindilerde karşılaşılan toplu zehirlenme olayları ve bu konuda sürdürülen çalışmalar bu görüşü değiştirmiştir; bugün yem ve besin maddelerinin mikotoksinlerle kirlenme durumunun sanıldığından aksine, çok ciddi boyutlarda olduğu ve insan ya da hayvan sağlığı için önemli bir tehlike arz ettiği kabul edilmektedir (7).

Mikotoksinler mantarlar öldükten sonra da yem ve besinlerde uzun bir süre kalırlar. Anılan maddelerde, görülebilir bir küflenme olmadığın da bile, mikotoksinler tehlikeli düzeyde bulunabilirler. Normal pişirme ve uygulamaları sırasında, özellikle aflatoksinler olmak üzere, mikotoksinlerin önemli bir kısmının parçalamadan kalması konunun önemini daha da artırır (7).

Günümüze kadar varlığı ortaya konulan mantar türlerinden 250- 300 kadarının mikotoksin oluşturdukları, 20- 35 dolayındaki mikotoksin grubunun da besin ve yemeklerde doğal kirletici halinde buldukları ve anılan yem ve besin maddelerini tüketme durumundaki, bilhassa kanatlılar olmak üzere, hayvanlarda sık sık zehirlenmelere yol açtıkları bilinmektedir. Ayrıca, mikotoksinlerle kirli yemleri yiyen hayvanlardan sağlanan besinlere geçen ve bu şekilde son tüketici durumundaki insanlara kadar ulaşabilen kalıntıları vasıtasıyla toplum sağlığı yönünden de çok geniş boyutlu tehlike oluştururlar. Güçlü ve hemen zehirleyici etkilerinden öteye, başta aflatoksinler olmak üzere, bazı mikotoksinler son derece güçlü karsinojenik ve bazılarının da östrojenik etkileri vardır. Önemli bazı mikotoksin çeşitleri, kaynakları, öncelikle etkiledikleri hayvan türleri ile etkilenen doku ve organlar Tablo 2.1'de verilmiştir (7).



**Tablo 2.1.** Mikotoksin çeşitleri, kaynakları, hedef hayvan, doku veya organlar

<b>Mantar çeşidi</b>	<b>Mikotoksinler</b>	<b>Besin veya ürün çeşidi</b>	<b>Hedef organ, doku ve oluşan etki</b>	<b>Öncelikle etkilenen hayvan</b>
A. flavus A. parasiticus A. puberulum	Aflatoksinler	Tahıllar, yemler, yağlı tohum küspeleri	Karaciğer; gelişme hızı ve verimde azalma; sarılık kanama, sürgün, karaciğer kanseri, bağışıklık sisteminin baskılanması	Tüm hayvan türleri ve insanlar
A. ochraceus P. viridicatum	Okratoksinler	Tahıllar, otlar	Karaciğer ve böbrek hastaları, iştah kaybı, sürgün, bağışıklık sisteminin baskılanması	Kanatlılar, insanlar
P. rubrum	Rubratoksinler	Tahıllar, baklagiller, yağlı tohumlar	Aflatoksinlere benzer	Tüm hayvan türleri
F. roseum ve diğer Fusarium türleri	Zearalenon (F-2 toksin)	Tahıllar	Östrojenik etki	Gevişenler, domuzlar
P. citrinum	Sitrinin	Tahıllar	Sinirsel belirtiler, sürgün, gelişme geriliği, karaciğer ve böbrek nekrozu, kalb ve iskelet kasında miyopati, karaciğer kanseri	Kanatlılar, domuzlar
A. versicolor A. nidulans	Aspertoksin Steriğmatosistin	Tahıllar, pirinç, yemler	Karaciğer kanseri	Tüm hayvan türleri
A. clavatus P. patulum	Patulin	Silaj, elma, yemler	Sinirsel belirtiler, beyin kanaması, deri kanseri	Sığırlar
Aochaceus P. puberulum	Penisilik asit	Tahıllar, mısır	Deri kanseri, kanamalar	Tüm hayvan türleri
Fusarium, Trikoğerme, Sefalosporium, vb	Trikoțesenler	Tahıllar, yemler	Dermatit, deride nekroz, kanamalar, anemi, granülozitopeni vb	Tüm hayvan türleri
P. citreoviridae	Streoviridin	Pirinç, tahıllar	MSS, kalb ve solunum felci, çırpınmalar	Tüm hayvan türleri
F. tricinctum	Butenolid	Mısır, ot, tahıllar	Bacaklarda gangren, kuyrukta nekroz	Sığırlar

Tablo 2.1.'nin devamı

<b>Mantar çeşidi</b>	<b>Mikotoksinler</b>	<b>Besin veya ürün çeşidi</b>	<b>Hedef organ, doku ve oluşan etki</b>	<b>Öncelikle etkilenen hayvan</b>
P. islandicum P. rugulosum	Luteoskirin Sikloklorotin Rugulosin	Pirinç	Karaciğer hasarı ve kanseri	Kanatlılar
S. bakari	Sporidesminler	Tahıllar, ot	Karaciğer hasarı, safra kanalı tıkanması, ışığa aşırı duyarlılık	Gevişenler
Penisilium türleri	Penitremler	Tahıllar	Kas titremeleri, felç, çirpınmalar	Tüm hayvan türleri
Acremonium loliae	Lotitremler	Çavdar, vb	Tremorlar, hareket düzensizlikleri, çirpınmalar, şok, spazm gibi	Gevişenler, at
Fuserium türleri	Fumonisinler	Mısır	Beyin ve akciğer yangısı	At,domuz,kanatlılar
Fusarium solanii	4-ipomeanol	Küflü tatlı, patates	Akciger ödemi, pnömoni, amfizem	Sığır
A. flavus A. oryzae	Kojik asit	Mısır	Çirpınmalar, ödem	Tüm hayvan türleri
A. niger A. oxalicum	Okzalik asit	Bitkiler	Mide irkiltisi, MSS ve böbrek hastalıkları, kanama, kan kalsiyumunda azalma	Tüm hayvan türleri
C. purpurae C. paspali	Ergot alkaloitleri	Tahıllar	Kuru gangren, aşırı uyarı, kanın pıhtılaşması	Tüm hayvan türleri
Stachybotrys atra	Satratoksinler	Tahıllar, otlar	Kemik iliği, deri, mukozalar	Tüm hayvan türleri
Aspergillus Zygosporium Nigrosabulum	Sitakalasanlar		Hücre zarları, pıhtılaşma, fagositoz vb	Tüm hayvan türleri
A. terreus	Territremler	Tahıllar, otlar	MSS, tremorler, nöro-musküler kavşaklar	Tüm hayvan türleri
S. sclerotiorum	Psoralenler	Kereviz vb	Deri yangısı	Tüm hayvan türleri

Doğal kirletici olarak besin ve yemlerde bulunabilen, insan ve hayvanların sağlığı yönünden önem taşıyan mikotoksinlerden bazıları şunlardır: Aflatoksinler, okratoksinler, zearalenon, sitrinin, patulin, kojik asit, sterigmatosistin, trikotesenler, PR toksin, slaframin, penisilik asit, sporidesmin, ergot alkaloidleri, streoviridin, alternariol, tenuazonik asit, rubratoksinler, sikloklorotin, luteoskirin, rugulosin, tremorin A, okzalik asit gibi (7).

Sıralanan bu mikotoksinler arasında hemen tüm hayvan türleri ve insanlarda zehirlenme yapabilmeleri, ayırım göstermeksizin hemen her çeşit besin ve yemde kirlenmeye yol açmaları, maymunlar da dahil pek çok hayvan türünde karsinojenik olmaları ve küflü yemleri yemeleri yiyen hayvanların et, süt, yumurta, gibi ürünlerinde kalıntılarının rastlanması sebebiyle, aflatoksinler halen insanlarda, epidemiyolojik olarak karsinojen olabilmeleri başta olmak üzere, yoğun biçimde araştırılan en önemli mikotoksin grubunu teşkil ederler (7).

Küflenmeyle besin maddeleri ve yemlerde, gözle görülebilir renk ve şekil değişiklikleri yanında, ortamda üreyen mantar topluluğuna bağlı olarak gelişen enzimatik ve kimyasal tepkimeler sonucu hızla bozulma başlar. Böylece, besin ve yemler su ve kuru madde kaybederler; başta nişastalı maddeler ve yağlar olmak üzere, besin unsurları parçalanır, besleyici enerji değeri azalır ve teknolojik özelliklerini kaybedebilirler (7).

### **2.1.1. Mantarların Gelişmesi ve Mikotoksin Sentezini Etkileyen Faktörler**

Yem ve besin maddelerindeki mantarların önemli bir kısmı onlarda saprofit yaşam sürdürür. Mantarlar bitki veya hayvan hücrelerinin yüzeyi ya da içinde yaşarlar ve onlara lifli-tozlu bir görünüş kazandırır; olay besin veya yemlerin küflenmesi olarak bilinir. Yem veya besin maddesindeki mantar sayısına göre de, o maddenin kalitesi hakkında az çok fikir yürütülebilir. Buna göre 1 g'ındaki toplam mantar sayısı 5.000'e kadar olan yem ve yem ham maddeleri son derece iyi; 5.000 - 50.000 arasında olanlar iyi; 50.000- 500.000 arasında olanlar orta; 500.000'in üzerinde olanlar ise zayıf kaliteli ve son derece tehlikeli olarak kabul edilir. Bunlardan iyi kalitede olanlar depolanmakla kolayca ileri derecede

küflenme ve mikotoksinle kirlenme tehlikesi taşırken, 1g yemdeki mantar sayısı 1.000.000'u aştığında küflenme gözle görülebilir hale gelir (7).

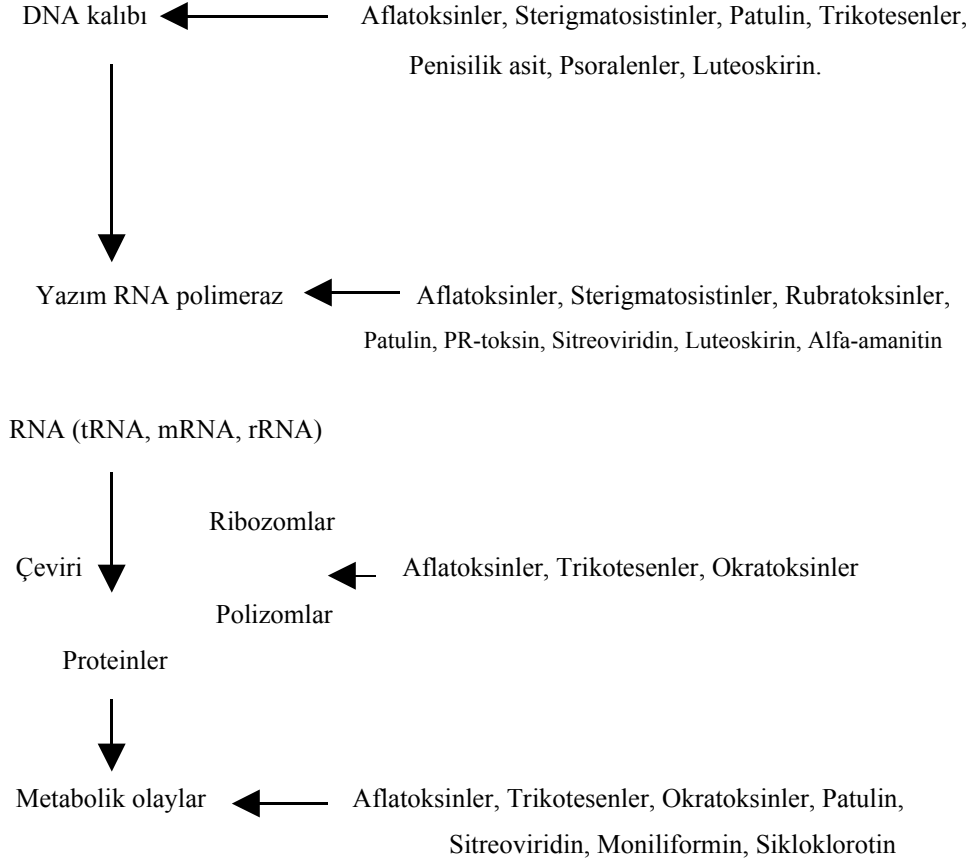
Bitkisel besinler ve dolayısıyla yemlerin küflenmesine yol açan mantarlar başlıca üç kaynaktan gelirler. İlki bitkinin büyüüp-gelişmesi sırasında kendisinde bitki paraziti olarak yaşayan ve yüksek nemli (yaş esasa göre %20 -25) ortamlarda üreyen Fusarium, Kladosporium, Helminthosporium, Klaviseps, Pullarya gibi mantar türleridir. İkincisi hasat sırasında kirlenici olarak bitki veya tahıllara yansıyan ve mantar florasına göre daha düşük sıcaklıkta (20 °C gibi) nispi rutubet şartlarındaki ( % 60 dolayında) ambar ortamına alınan Aspergillus ve Penicillium türleridir. Üçüncü grupta ise depo şartlarında iyi gelişen Fusarium, Sardarya, Populasporea, Trikotoderma, Stakibothriya gibi mantar türleri bulunur (7).

Küflenme hemen tümüyle mantar sporlarının yayılmasıyla ilgilidir; sporların yayılması ise hava (kuru veya kserofor sporlar) ve su (ıslak, rutubetli ve sıcak ortamda gelişen sporlar) ile olur. Sporlar çoğalmalarına uygun olmayan şart veya yerlerde yıllarca canlı kalabilirken, çoğalmalarını teşvik eden ortamlarda çok hızlı bir şekilde ( $1 \times 10^{12}$ ) üreyerek, besin maddelerinin küflenmelerine ve mikotoksinlerle kirlenmelerine yol açabilirler (7).

Mantarların gelişmesi ve mikotoksin sentezlemeleri ortam ile yem ve besin maddelerinin rutubet içeriği, ısı, havalandırma, tane besinlerde mekanik hasar, pH ve diğer birçok faktöre bağımlılık gösterir. Bunlar içinde en önemlileri ortamın ısı ve rutubet ile besin ve yemlerin nem içeriğidir (7).

### **2.1.2. Mikotoksinlerin Etki Şekilleri**

Mikotoksinler doğrudan veya metabolik değişiklikler sonucu oluşan metabolitleri aracılığında aşağıda (Şekil 2.1.) ana hatlarıyla belirtilen etki şekillerinden birisi veya bir kaçıyla etkilerini oluştururlar (7).



Şekil 2.1. Bazı mikotoksinlerin etki yerleri

**DNA kalıbı ile etkileşme:** Aflatoksinler, PR-toksin, luteoskirin, T- 2 toksin, patulin, penisilik asit ve psoralenler (furokumarinler) DNA'ya doğrudan veya metabolitleriyle bağlanarak kalıp etkinliğini bozarlar. AFB<sub>1</sub>'in oldukça etkin bir metaboliti olan AFB<sub>1</sub>-2,3-epoksit DNA'ya guaninin 7 numaralı azot atomu üzerinden bağlanır; aflatoksinlerin, belirtilen ana birleşme ürünlerinden (DNA-adduktları) başka, 10'dan fazla sayıda ama daha

az önemde diğerk birleşme ürünleri de oluşur. PR-toksin de DNA ve proteinlerle metilen köprüleri aracılığında bağlar yapabilir. Luteoskirin ve DNA tek iplik arasında etkileşme oluşur. Keza, T-2 toksin DNA hasarına, patulin, penisilik asit, aflatoksinler, okratoksin A, sitrinin ve PR- toksin DNA'da tek iplik kırılmasına yol açabilir (7).

Yukarıda sıralanan etkilerle, mikotoksinler ve DNA kalıbı arasındaki etkileşmeler sonucu DNA'da bilgi aktarım sırası değişir; bu durum bileşiklerin mutajenik ve karsinojenik etkilerinin doğmasına sebep olabilir (7).

**Kalıp çıkması, yazımı ve çevirisinin engellenmesi:** Bilindiği gibi, genetik bilgilerin aktarılmasında görülen olayların başlıcaları kalıp çıkması (DNA sentezi), yazım (RNA sentezi) ve çeviri (protein sentezi)'dir. Bu üç olay önemli yapı taşlarının (protein sentezinde tRNA, DNA veya RNA sentezinde nükleotid fosfatlar gibi) sentezine önder olur. Anılan maddelerden de başlama-uzama-sona erme aşamalarından oluşan protein sentezi ile ana ve büyük moleküller hazırlanır. Şekil 2.1.'de görüldüğü gibi, mikotoksinler protein ve nükleik asit sentezini çeşitli basamaklarda bozabilirler. Örneğin okratoksin A, fenilalaninle yarışarak protein sentezini (burada fenilalanin-tRNA sentatazın aracılığında fenilalanin-tRNA şekillenecektir) engellerken, aflatoksinler DNA kalıbına olan etkileri sonucu RNA sentezini bozarlar. Keza patulin ve PR-toksin gibi bazı mikotoksinler RNA polimerazın etkinliğini engellerler (7).

Protein yazımında (RNA sentezi) aflatoksin ve patulin başlangıç basamağını,  $\alpha$ -amanitin zincirinin uzamasını ve PR-toksin de her iki basamağı engeller. Trikotesenler, sağlam ribozomun görevini bozarak veya poliribozomların kırılmasına yol açarak, AUG-kodonunun 80S yapısının şekillenmesini ve sonuçta protein sentezini engeller. Trikotesenler, keza, 60S ribozomal alt birimde peptid zincirinin uzamasını sağlayan peptidil transferazı etkileyerek bu zincirin uzamasını da önlerler. Trikotesenler peptid zincirinin sonlanma sahasını da etkiler. Bazı mikotoksinlerin protein, DNA ve RNA sentezini engellemeleri durumu Tablo 2.2.'de özetlenmiştir (7).

**Tablo 2.2.** Bazı mikotoksinlerin DNA, RNA ve protein sentezine etkileri

<b>Mikotoksinler</b>	<b>DNA</b>	<b>RNA</b>	<b>Protein</b>
Aflatoksinler	+	+	+
Sitrinin	+	+	+
Okratoksin A	-	-	+
Trikotesenler	+	-	+
Patulin	-	+	+
Rubratoksinler	-	-	+
Luteoskirin	+	+	-
PR-toksin	-	+	+

**Hücre zarı geçirgenliğinin değiştirilmesi:** Sitrinin, rubratoksinler, moniliformin, sitokalsin B gibi mikotoksinler hücre zarının geçirgenliğini bozarlar. Örneğin sitokalsin B memeli hücrelerine şeker moleküllerinin, sitrininin de aminoasitlerin taşınmasını engeller. Mikotoksinlerden çoğu hücrelerde metabolizmayı etkilerler. Mikotoksinler şekerlerin metabolizmasını birçok noktada etkilerler (7).

Aflatoksinler, okratoksin A, luteoskirin, rubratoksin B, sitrinin, trikotesenler, penitrem A gibi mikotoksinler yağların metabolizmasını da etkilerler; bunların çoğu karaciğerde yağın birikmesine sebep olurlar. Örneğin aflatoksinler karaciğerde yağ asitlerinin sentezi için gerek duyulan sitozolik NADPH düzeyini artırarak bu etkiye yol açarlar. Aflatoksinler ve luteoskirin triasilgliserolün taşınmasını engellerler; çok küçük dozlarda aflatoksinler, triasilgliseroller de dahil, fosfolipidler ve kolestrolün taşınmasını da önlerler (7).

**Hücre solunumunun etkilenmesi:** Bazı mikotoksinler de mitokondrilerde oksidatif fosforilasyon zincirini etkilerler. Aflatoksinler sitokrom-b ve sitokrom-c arasındaki olayları bozarken, luteoskirin trikarboksilik asit döğüsündeki bazı enzimlerin etkinliğini engeller (7).

Okratoksin, rubratoksin, moniliformin, sekalonik asit D gibi mikotoksinler elektron taşıma zincirini bozarlar. Beta- ve gamma- durumunda hidroksil grubu taşıyan hidroksi-antrakınonlar (emodin gibi) oksidatif-fosforilasyon kenetini kırarlar. Mikotoksinlerle yol açılan etki genellikle mitokondrilerde büyüme-şişmeyle sonuçlanır (7).

Diğer yandan, oksidatif fosforilasyon kenetini kıran mikotoksinler mitokondrilerde enerjiye-bağımlı kalsiyum taşınmasını bozarlar; böylece kalsiyumun sızmasına yol açarak, ATP ile mitokondriyal zarın enerjilenmesini engellerler ve ATP'ye-bağımlı zar geriliminin kaybolmasına sebep olurlar (7).

**Hormonal etki:** Zearalenon gibi bazı mikotoksinler canlıda, östrojene benzer şekilde, östrojene reseptörlerine bağlanarak etkilerini oluştururlar (7).

## 2.2. SİTRİNİN

Mikotoksin çeşitli mantar türleri tarafından oluşturulur. Ayrıca yapısal olarak farklı ikincil metabolitleri üretirler. Bu toksik bileşikler besinlere ve ekinlere bulaşabilir. Bulaşan bu materyaller insan ve hayvanlarda patojenik olabilir ve ciddi sağlık problemlerine örneğin karaciğer, böbrek ve sinir sisteminde hasara, bağışıklık sistemine ve karsinogeneze öncülük yapabilir (8). Çevrede mantarların yayılma doğasından dolayı mikotoksinlerin yiyeceklere bulaşması kaçınılmaz olmaktadır. Pek çok çalışma, pişmemiş besinlerde mikotoksinlerin oluştuğunu göstermiştir.

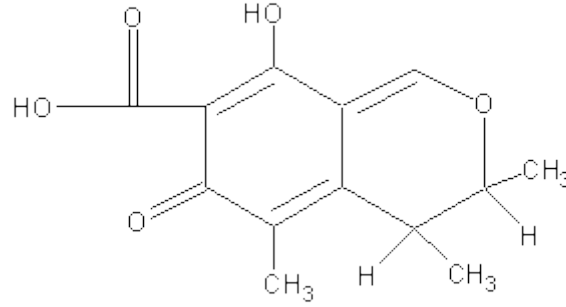
Sitrinin mikotoksini toksik ikincil bir metabolittir, ilk kez *Penicillium citrinum*'dan izole edilmiştir (9). Ayrıca *Penicillium*'un diğer türleri (*P. lividus*, *P. implicatum*, *P. citreoviride*, *P. jenseni*, *P. notatum*, *P. expansum*) (10), *Aspergillus* (*A. terreum*, *A. candidus*, *A. nives*, *A. carneus*) (11) ve *Monascus* (12-14) tarafından da üretilmektedir. Bu mantarların antibakteriyel etkilerinden dolayı sitrinin antibiyotik olarak araştırılmış (15), ancak benzer toksisite çalışmaları bu ikincil metabolitin hayvanlarda nefrotoksik (16) gibi davrandığını, böbreğin proksimal tübüllerine zarar verdiğini (17) ve insan endemik Balkan



nefropatisinde etken ajan olduğunu göstermiştir (18, 19). Sitrininin bulaşması farklı coğrafik lokalizasyonlarda biyolojik sıvılara olduğu kadar tarım ürünlerine, yiyeceklere bulaştığı rapor edilmiştir (20-28).

### 2.2.1. Sitrininin Fizikokimyasal Özellikleri

Sitrinin ( $C_{13}H_{14}O_5$ ), asidik, limon sarısı bir kristaldir (Şekil 2.2). Maksimum UV absorbansı metanolde 250 nm ve 333 nm'dedir. Erime derecesi 172 °C' dir. Suda az çözünebilir bununla birlikte seyreltik sodyum hidroksit, sodyum karbonat ve sodyum asetatla çözünür. Metanol, asetonitil, etanol ve diğer polar organik solventlerin çoğunda çözünür (29).



Şekil 2.2. Sitrinin ( $C_{13}H_{14}O_5$ ) yapısı

Bileşik oluşturma yeteneğine sahiptir. Asidik ve alkali solusyonlarda yada ısıtmayla bozulabilir. Sitrinin iki intramoleküler hidrojen bağı ile birlikte quinone methid oluşturur. Sitrinin, katı durumda dinamik bir dengede P-quinone ve o-quinone 2 tautomerik formu ile kusurlu bir yapıda kristalleşir. Metanol veya metanol/metilen klorid karışımlarında, sitrinin Michael-tip nükleofilik eklenme reaksiyonu geçirir. Bu reaksiyon dönüşümlüdür ve eğer sıcaklık metilen kloritte artarsa denge değişimi normal sitrinine doğrudur (30).

### 2.2.2. Biyosentetik Yol ve Üretimi Etkileyen Fizyolojik Faktörler

Polyketide yolu, filamentli çeşitli mikotoksinleri içeren ikincil metabolitlerin oluşmasında çok iyi bilinen bir yoldur. NMR tekniğiyle biyosentetik yol hakkındaki en son çalışma, sitrinin biyosentezinin filamentli bir mantar olan *Monascus ruber*' deki bir tekraketideden köken aldığını göstermiştir (31) ve Penisilin ve *Aspergillus* türlerinde gösterilen

pentaketideden farklıdır (32, 33). Buna ek olarak sitrinin oluşumu, oksijen gibi besin faktörleri (34, 35), karbon ve azot kaynakları (36), yağ asitleri (37), su aktivitesi gibi çevresel faktörler (23), sıcaklık (38), malların sirkülasyonu ve depolama tekniklerini içeren saklama tekniklerini (39, 40) içine alan çeşitli parametreler ile etkilenir.

### **2.2.3. Sitrinin Toksisitesi ve Stabilitesi**

Mikotoksinlerden biri olarak sitrinin antibiyotik, bakteriyostatik, antifungal ve antiprotozoal özelliklere sahiptir. Çeşitli türleri hepato-nefrotoksin olarak bilinmesine karşın (41-43), in vitro çalışmalar sitrininin renal mitokondriyal fonksiyon ve makromolekül biyosentezi (hücre ölümünde sonuçlanır) üzerinde pek çok etkiye neden olduğunu göstermiştir (44-46). Buna ek olarak sitrinin, et, meyve, tahıl (47) ve peynir (48-50) gibi besinlerde diğer nefrotoksin-ochratoksin A ile birlikte oluşur ve sinerjistik etki yapar (51). Sitrinin dolaylı ve doğrudan alımından kaçınmak için, besin işlenmesi sırasında detoksifikasyon metotlarını geliştirmek çok önemlidir. Şimdiye kadar sitrinin detoksifikasyonu üzerine bazı çalışmalar vardır. Temel çürüme ve detoksifikasyon üzerine yapılan bir araştırma, çok az miktardaki su varlığında, 130 °C’de ısıtılan sitrininin Hela hücrelerine karşı toksitesitesinin dikkate değer bir şekilde azaldığını göstermiştir (52). Buna karşın suda 140 °C veya 150 °C’de ısıtma oldukça toksik bileşiklerin oluşuna sebep olmuştur (53). Ayrıca sitrininin 100 °C ‘nin üstündeki sıcaklıkta yeni toksin sitrinin H<sub>1</sub>’i oluşturduğu bilinmektedir (54). 140 °C’deki suda ısıtılmış sitrinininden oluşan çürümüş ürünlerde yapılan ileri incelemeler, diğer bileşenin sitrinin H<sub>2</sub> [3-(3,5-dihidroksi-2-metilfenil)-2-formiloksi-butan] izolasyonuna yol açmıştır ve Sitrinin H<sub>2</sub>, sitrininden daha zayıf sitotoksisiteye sahiptir (55). Suda kaynadıktan sonra *Monascus*’da sitrinin konsantrasyonunun azaldığı bulunmuştur; 20 dakika ısıtıldığında sitrinin konsantrasyonu %50 oranında azalır (56). Bu gerçekler, sitrininin sulu solusyonlarda stabil olmadığını ve termolabil olduğunu göstermektedir.

### **2.2.4. Sitrinin Genotoksisitesi**

Sitrininin genotoksisitesi insanlarda tam anlaşılmadığından, halkın bu toksine düşük seviyelerde ve uzun süre maruz kalması önemli olmaktadır. Önceki çalışmalar, sitrininin çeşitli hücre ve hayvan modellerinde nefrotoksisiteye sebep olduğunu göstermiştir.

Mitokondri elektron transport sistemindeki karışıklık, bu toksinin olası etki şekli olarak tanımlanmıştır. Sitrinin mutagenisitesi ve genotoksisitesi üzerine hem negatif hem pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Sitrinin, V79-E hücrelerinde kromozomal aberasyonlara sebep olur, fakat kardeş kromatid değişimine (KKD; sister chromatide exchange) sebep olmaz ve *Salmonella typhimurium* çalışmalarında mutajenik değildir (57, 58). Diğer taraftan, sitrinin intakt *Escherichia coli* kromozom DNA'sında DNA tek- ve çift-iplik kırıklarına sebep olur (59). Ayrıca sitrinin, V79 hücrelerinde (60) anöploidogenik potansiyele sahip olduğu ve farelerin kemik iliği hücrelerinde (61) kromozomal anormalliklere sebep olduğu gösterilmiştir. Dahası, erkek F344 ratlarında diyetle sitrininin oral alınımı, beslenen ratların % 70'nde renal adenomların oluşumuna sebep olmuştur (62).

Ayrıca patulin ve sitrininin insan hücrelerinde genotoksik etkileri üzerine yapılan bir çalışmada, patulinin insan kan lenfositlerinde ve insan embriyonik böbrek (HEK293) hücrelerinde genotoksik olduğu gösterilirken, sitrininin önemli genotoksik ve klastojenik etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir (63). Ancak, Lorkowski ve arkadaşları mikotoksin sitrininin yüksek konsantrasyonlarda (100 µM) kültüre edilmiş hepatoma hücrelerinde RNA, protein ve DNA sentezini (64) ve Wasternack ve arkadaşları da sitrininin V79-E hücrelerinde konsantrasyon ve doza bağlı olarak RNA sentezini inhibe ettiğini bulmuşlardır (65).

### **2.3. İN VİTRO MİKRONÜKLEUS TEKNİĞİ**

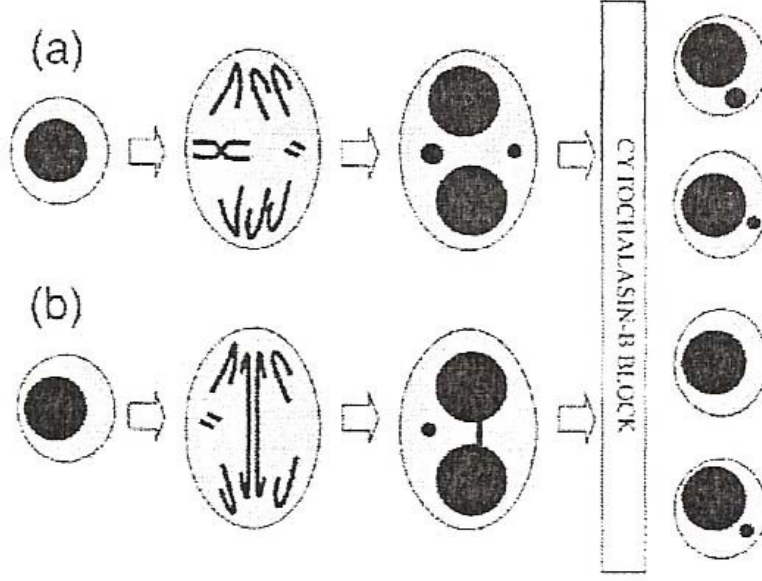
Radyasyona ve karsinojenik kimyasallara maruz kalındığı zaman kromozomlarda hasarların oluşması, fiziksel ve kimyasal ajanların ökaryotik hücrelerin genetik materyalinde büyük değişikliklere neden olduğunu gösterir (66).

Kromozom yapısının tam anlamıyla anlaşılmasına rağmen, kromozom anormallikleri DNA seviyesindeki hasarların belirtisidir, örneğin kromozom kırılmaları, DNA'daki çift iplik yapının tekrar tamir edilememesinden meydana gelebilir (67). Kromozom kaybı ve kromozomların hatalı ayrılışı (non-disjunction), kanserde ve yaşlanmada çok önemli olaylardır ve metafazdan önce iğ ipliklerinde, sentromerde yada kromozom yapısındaki bozukluklarla ortaya çıkabilir (68-70).

Klasik sitogenetik tekniklerde, metafaz evresindeki kromozomları gözleyerek ve anormallikleri sayarak kromozomlar incelenmektedir (71). Bu yaklaşım detaylı bir analiz yapılmasını sağlar ancak metafazdaki daha kompleks anormalliklerin birer birer sayılmasında yetersizlikleri vardır ve kromozom kusurlarını tesbit etmede daha basit yeni metotlar geliştirilmiştir.

Schmid (72) ve Heddle (73) birbirinden bağımsız olarak *in vivo* kromozom kusurunu analiz etmek için alternatif ve daha basit bir yaklaşım ileri sürmüşlerdir. Bu yaklaşım, kemik iliği gibi bölünen hücrelerde, hematologlar tarafından Howell-Jolly badileri olarak bilinen, mikronükleusların ölçümüdür. Kemik iliği ve periferal kanda bulunan eritrositlerde Mikronükleus testi, *in vivo* sitogenetik analizidir ve genetik toksikolojide kullanılmaktadır. Ancak *in vivo* veya *in vitro* olarak diğer hücre gruplarına uygulanabilir bir metot değildir ve *in vitro* çekirdekli hücrelerde MN'ları ölçmek için metotlar geliştirilmiştir.

MN'lar, mitoz sırasında kutuplara gidemeyen tüm kromozomlar ya da sentromeri olmayan kromozom kırıklarını içeren bölünen hücrelerde görülebilir. Telofazda, geri kalan kromozomlar ve parçaları etrafında nükleer bir zar oluşur ve bu yapı hücrenin ana çekirdeğinden daha küçük olduğundan "mikronükleus (MN)" olarak adlandırılır (Şekil 2.3). Bundan dolayı, MN'lar hem kromozom kırılması hem de kromozom kaybının uygun ve güvenilir ölçümünü sağlar. MN'lar çekirdek bölünmesi tamamlandıktan sonra oluştuğu için, MN'lar hücre döngüsünün binükleer (iki çekirdekli, BN) safhasında ideal olarak ölçülür (74, 75). Bazen binükleer hücrelerde nükleuslar arasında nükleoplazmik köprüler gözlenmektedir. Bunlar olasılıkla disentrik kromozomlar olabilir. İki sentromer hücrenin karşı kutbuna çekilmekte ve DNA oluşan köprü sonucunda nükleer zarla etrafi çevrelenmektedir (Şekil 2.3). Böylece binükleer hücrelerde nükleoplazmik köprüler mikronükleus hesaplanması yanısıra kromozom yeniden düzenlenmesinin tamamlayıcı ölçümüne olanak sağlar.



Şekil 2.3. Mikronükleus oluşumu

(a) Mikronükleuslar, anafaz'da geri kalan kromozomlar ve asentrik kromozom parçalarından orjin alır. (b) Sentromerleri ile hücrenin karşı kutuplarına çekilen disentrik kromozomlardan nükleoplazmik köprü oluşumu; ve asentrik kromozom parçasından eş zamanlı olarak mikronükleusun oluşumu. Sitokalazin-B (Cyt-B), binükleer evrede hücre bölünmesini bloke eder. Bu şema, sadece 2 çift kromozomlu bir hipotetik hücre örneğini göstermektedir.

Bu analiz, bölünmeyen yada bölünen hücre gruplarında etkili ve kantitatif olarak kullanılamayabilir, çünkü hücre bölünme kinetiği tam olarak anlaşılammıştır ve kontrol edilememektedir. Sonuç olarak bir hücre popülasyonunda bölünmeyen ve mitoz geçiren hücreleri ayırt etmek için bir metodun geliştirilmesi gerekmektedir. Üstelik bir ya da daha fazla nükleer bölünmeden sonra MN'ların akıbeti belirsiz olduğundan, bir nükleer bölünmeyi tamamlayan hücrelerin tanımlanması çok önemlidir.

Stathmokinetik, flow sitometrik ve DNA etiketleme esasına dayanan birkaç metot önerilmiştir. Ancak kolaylığından dolayı sitokinez-blok mikronükleus (CBMN) metodu tercih edilmiştir (74-76).

CBMN analizinde, bir nükleer bölünmeyi tamamlayan hücreler, sitokalazin-B (Cyt-B) kullanılarak sitokinez bloke edilir ve bu hücreler binükleer hücreler olarak tanımlanır (Şekil 2.3). Cyt-B, sitokinez esnasında kardeş nükleuslar arasındaki sitoplazmayı daraltan mikrofilament halkasının oluşması için gerekli olan aktin polimerazasyonun bir inhibitörüdür (77). Cyt-B'nin kullanılması, bölünen hücrelerin eş zamanlı derecesine ve oranına bakmaksızın bölünen hücre popülasyonunun binükleer evresinde bütün bölünen hücrelerin birikimine neden olur. MN'lar, sonra sadece binükleer hücrelerde skorlanır, böylece hücre bölünme kinetiğinde farklılıklar olan hücre popülasyonları arasında kromozom hasarlarının karşılaştırılmasında güvenilir bir metot olarak kullanılabilir. Başlangıçta bu metot kültüre edilen insan lenfositleri için geliştirilmiştir (74, 75). Ancak günümüzde solid tümör ve kemik iliği hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerine de adapte edilmiş bir metottur (78, 79). Ayrıca yeni gelişmeler olmaktadır. Bu gelişmeler aşağıda verilmiştir: (a) kromozom parçalarından ve kromozomlardan orjin alan MN'ların ayırt edilmesi (80-85), (b) bir hücre bölünmesi içinde kesip çıkartılarak tamir edilen (eksizyon-tamiri) bölgelerin MN'lara dönüşmesi (86), (c) binükleer hücrelerde non-disjunction olaylarını tanımlamak için moleküler problemlerin kullanılması (87-89), (d) CBMN analizi içinde nekrotik ve apoptotik hücrelerin katılması (90, 91).

Son olarak, yeni kimyasalların genotoksitesini test etmek için metafaz analizi yerine mikronükleus analizinin kullanılması önerilmektedir (92, 93).

### **2.3.1. İnsan Lenfositlerindeki Standart Sitokinez-Blok Mikronükleus Analizi**

Bu metodda, fitohemaglutinin (PHA) stimülasyonunu takiben bir nükleer bölünmeyi tamamlayan hücrelerdeki MN'lar sayılır. Cyt-B, ilk mitotik bölünmeden önce eklenmelidir ve Cyt-B ile sitokinez bloke edildikten sonra BN hücreler oluşmaktadır. Optimal kültür

koşulları, PHA stimülasyonundan sonra 72 saatte canlı hücrelerin oranı (nekrotik ve apoptotik hücreler hariç) olarak %35-60 veya daha fazla BN hücreler elde edilmektedir. Bu prosedürde kullanılan solusyonlar ve araçlar steril edilmelidir (94).

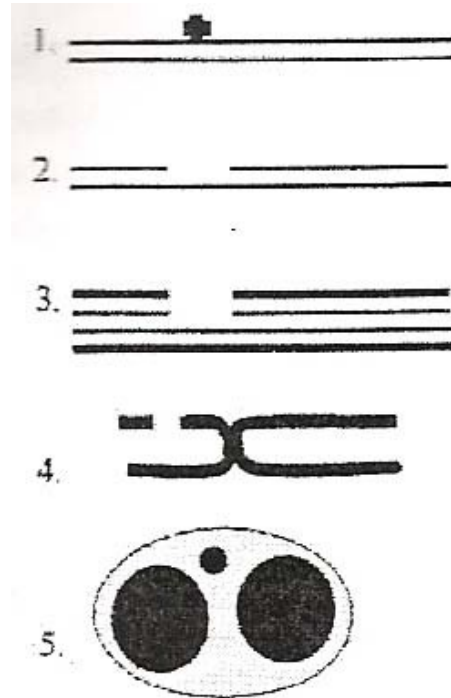
**İnsan lenfositleri için kan kültürü:** İnsan lenfositlerinde, CBMN analizi tam kan kültürü kullanarak da gerçekleştirilebilir. 0.4-0.5 ml tam kan, fetal kalf serum, L-glutamin, antibiyotik ve PHA ile desteklenmiş 4.5 ml kültür ortamına eklenir. Cyt-B, PHA stimülasyonundan sonra 44. saatte eklenir. Binükleer hücrelerinin biriktiği Cyt-B'nin optimal konsantrasyonu, tam kan kültüründe 6 µg/ml'dir (95). Binükleer lenfositler, Cyt-B eklendikten 28 saat sonra, kırmızı kan hücrelerini parçalamak için 0.075 M KCl ile muamele edilir ve lama aktarmadan ve boyanmadan önce metanol: asetik asit ile fiske edilir (smear hücrelerinde lamlar kuruduktan sonra fikse edilir). Alternatif olarak, Ficoll gradienti kullanılarak tam kan kültüründen binükleer lenfositleri izole etmek mümkündür. İzole edilen hücreler daha sonra sitosantrifugasyon ile lamlara transfer edilir. Sonra hücreler fikse edilir ve boyanır.

### **2.3.2. Sitozin Arabinozid Mikronükleus Analizi Kullanarak Go/G1 Evresindeki İnsan Lenfositlerinde Çıkartılıp Yeniden Tamir Edilen DNA Lezyonlarının Ölçülmesi**

Çeşitli genotoksinlere maruz kalmasını takiben insan Go lenfositlerindeki MN cevabının analiz edilmesinden sonra mikronükleus şekillenmesi yaygın bir kanıt oluşturabilir, ancak iplik kırılması veya iğ ipliği hasarından ziyade DNA üzerinde baz lezyonları ve adduktlarını indükleyen kimyasal ve ultraviyole radyasyonu için sitotoksite çok düşüktür (86). Bu hipoteze göre, bu durum ya lezyonların yeterli onarımından ya da tamir edilemeyen böyle bölgelerin DNA'da çift iplik kırığına dönüşmemesinden dolayıdır. Bununla birlikte, çıkartılıp yeniden tamir edilme sitozin arabinozid (ARA) ile inhibe edildiğinde, ARA lezyonlar tek iplik kırığına dönüşür, böylece DNA sentezi sonucunda çift iplik kırığı oluşur. Bu çift iplik kırığı DNA sentezini takiben asentrik parça oluşumuna yol açar ve bir bölünme döngüsünde MN gibi ifade edilir ( Şekil 2.4) (86, 95). Lenfosit kültürünün ilk 16 saati içinde (DNA sentezinden önce) ARA eklenmesi, UV veya MNU uygulamasından sonra MN'da doza bağlı artışa neden olduğu (10 kat veya daha fazla) gösterilmiştir. Bununla birlikte, X-ışınına maruz kaldığında ARA-indüksiyonu 1.8 kat arttı, çünkü DNA adduktları veya baz lezyonlarının oranı DNA iplik kırılmalarının indüksiyonu

ile bağlantılıdır. Bu metot, çıkarma-onarmayı indükleyen pestisitleri tanımlamak ve çıkarma-onarmayı indükleyen veya indüklemeyen genotoksik ajanlar arasında ayırım yapmak için kullanılmıştır (96). ARA protokolu, özellikle güçlü bir sitotoksik etkilerin zayıf MN indüksiyonu ile gözleendiği durumlarda, CBMN analizi önemlidir. ARA metodu kullanarak kesip çıkartılarak tamir edilen DNA lezyonlarının ölçülmesi sadece CBMN analizi kullanmak suretiyle mümkündür çünkü; (a) kesip çıkartılarak tamir edilen DNA lezyonlarının MN'ye dönüşmesi sadece çekirdek bölünmesi tamamlanmış hücrelerde meydana gelir, (b) ARA eklenmesi hücre bölünme kinetiğini değiştirebilir, Cyt-B olmaksızın MN analizlerindeki sonuçlar şaşırtıcı olabilir.

DNA polimerazın ARA ile inhibisyonu, replikatif DNA sentezi geçiren hücrelerde DNA iplik kırılmalarına neden olabilir. Üstelik G1 fazı sırasında ve S-fazından önce ARA'a maruziyeti ile beraber PHA ile uyarılmış G<sub>0</sub> lenfositlerinde bu metodu kullanmak mümkündür, çünkü kesip çıkartılarak tamir etme G<sub>1</sub> fazı esnasında aktive edilir. Pratikte, bunun anlamı hücreler, PHA stimülasyonundan sonra ilk 16-20 saatleri sırasında ARA varlığında hücrelerin kültüre edilmesidir. Daha sonra bu hücreler, ARA'ı ayırmak için yıkanır ve DNA polimeraz ARA inhibisyonunu geri döndürmek için deoksisitidin içeren kültür ortamında inkübe edilir. Sonra standart CBMN protokolü izlenir (86, 96).





**Şekil 2.4.** Bir bölünme döngüsü içinde eksizyon ile onarılabilir DNA lezyonunun ARA ile MN'lara dönüşümü

- 1 DNA üzerindeki addukt
- 2 Adduktun kesilmesi ve tek iplik kırığında ARA ile gap-filling inhibe edilir
- 3 Replikatif DNA sentezini takiben tek iplik kırığı çift iplik kırığına dönüşür
- 4 Çift iplik kırığı, kromatid kırık olarak ifade edilir
- 5 Geri kalan kromatid parçası MN olarak ifade olur.

### **2.3.3. Sitokinez-Bloklü ve Sitokinez-Bloksuz Hücrelerdeki Mikronükleus Analizi**

Binukleated hücreleri elde etmek için kullanılan Cyt-B'nin MN oluşumunda bazı karışıklıklara sebep olduğu ile ilgili bazı tartışmalar vardır (93). Normal hücrelerle yapılan çalışmalarda Cyt-B'nin MN'ları indüklediği veya sitokinezde hücreleri bloke etmek için kullanılan dozlardaki binukleer hücrelerde MN frekansı ile Cyt-B'nin doza bağlı etkisi olmadığı gösterilmiştir (75, 97-99). Son bir çalışmada sitokinez-bloke edilen binukleer hücrelerde iç ipliği zehirleri tarafından indüklenen MN oluşumunun beklenenden daha az olduğu öne sürülmüştür, çünkü kutuplar arası mesafenin kısalması geri kalan kromozom parçaları ya da tam kromozomların nükleusa geri katılma olasılığını artırabilir. Fakat bu CBMN analizinin etkinliğini azaltmaz (100).

Hücre bölünme kinetiğinin yetersiz kontrollerinden dolayı yanlış negatif sonuçlardan kaçınmak ve Cyt-B'nin olası etkisini en aza indirmek için Cyt-B kullanmadan in vitro MN analiziyle ilgili araştırmalara ilgi artmıştır. Normal hücrelerde CBMN analiziyle elde edilen hatalı bir pozitif sonucun kanıtı olmamasına karşın, zaten Cyt-B kullanılan insan lenfosit kültürlerindeki MN indüksiyonu ile ilgili MN analizi için yeterli kanıt vardır (75, 76, 101). Yine de; Cyt-B'li veya Cyt-B'siz karşılaştırmalı son MN çalışmaları, eğer iyi büyüyen hücreler kullanılırsa kültür ve çekirdek bölünme koşulları en iyi seviyede olursa, güçlü klastojenler test edildiği zaman Cyt-B'li ve Cyt-B'siz MN analizleri arasındaki sonuçları karşılaştırmanın mümkün olduğunu göstermiştir (102, 103). MN oluşumunun matematiksel modeli, (1) BN hücrelerdeki MN sayımı mikronükleus frekansının belirlenmesinde güvenilir bir yoldur ve (2) sitokinez-blok olmadan yapılan kültürlerdeki mononükleer hücrelerde MN sayımı, test edilen kimyasal çekirdek bölünmesini inhibe

ettiğinde veya kültür koşulları optimal sayıda hücre bölünmesine izin vermediğinde yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkarabilir (104). Sonuç olarak, Cyt-B'siz kültürlerdeki tek çekirdekli (mononükleer) hücrelerdeki mikronükleusların sayılmasıyla elde edilen mikronükleus frekansı sonuçları, yanlış negatif sonuçlardan dolayı CBMN analizi kullanılarak doğrulanmalıdır.

### **2.3.4. Mikronükleus ve Non-disjunction'daki Kromozom Kaybını Ölçmek İçin Geliştirilen Moleküler Teknikler**

CBMN analizinde, MN'ların tam kromozomlardan mı yoksa asentrik parçalardan mı köken aldığını ayırt etmek, sentromerik DNA propları yada kinetokor proteinlerine (aktif kromozomların sentromerik bölgesinde toplanan) bağlanan antibadiler kullanarak mümkündür. İnsan hücrelerinde veya diğer hücre tiplerinde kromozom büyüklükleri heterojen olduğundan ve küçük bir MN ya büyük bir kromozomun parçasını ya da küçük bir kromozomun tümünü içerebildiğinden, MN büyüklüğü bu ayırım için kullanılamaz. Kullanım açısından anti-kinetokor antibadi metodu en basit ve ucuz bir tekniktir (105), ancak bu yaklaşımla tek olan kromozomlar arasında ayırım yapılamaz ve inaktif sentromerler üzerinde kinetokorların olmamasından dolayı kromozom kaybı belirlenemeyebilir (106). Sentromerik bölgeleri tanımlamak için kullanılan in situ hibridizasyon (ISH) yöntemi çok pahalı ve zahmetlidir, ancak daha spesifiklik sağlar.

Örneğin, tek kromozomlar için sentromerik proplar kullanılabilir, bu problemler BN hücrelerde non-disjunctional (ayrılmama) olayların (yavru nükleuslarda homolog kromozomların eşit dağılmaması gibi) belirlenmesine olanak sağlar (82). Bu bölümde, sadece kinetokor antibadi metodu tanımlanacaktır.

### **2.3.5. In Vitro Genotoksitesiyi Test Etmede Kullanılan Uygulama**

İdeal koşullarda her bir kimyasalın potansiyel genotoksitesi hücre siklusunun çeşitli evrelerinde test edilmelidir. İnsan periferik kan lenfositleri alındığı zaman G<sub>0</sub> fazında olduğu için, bu evredeki hasarı analiz etmek için idealdir. Bununla birlikte hücrelerin S fazı, G<sub>2</sub> fazı ve M fazı sırasında genotoksik etkilere karşı daha duyarlı olduğu beklenmektedir ve bu doğrultuda çoğu hücrelerin bölündüğü kültür sırasında kimyasallarla

maruziyet olmalıdır. MN oluşumu bir nükleer bölünmenin tamamlanmasını gerektirdiğinden, maruziyet ve hücrelerin hasat zamanı arasındaki periyot buna izin vermelidir.

İnsan periferik kan lenfositleriyle Go'da Cyt-B ile muamele mümkün olduğunca daha erken BN hücrelerin birikmesi için gereklidir. Tipik olarak, standart protokole göre, 44. saatte Cyt-B eklenir ve çoğalan hücreler 72. saatte durdurulur. Bununla birlikte, 24. saatte Cyt-B eklenir ve çoğalan hücreler 96. saatte durdurularak analiz için geç bölünen hücrelerin sayısı da artırılabilir.

Eğer hücreler S, G<sub>2</sub> ve M fazlarında kimyasallara maruz bırakılacaksa, kültürün logaritmik büyüme fazı sırasında maruziyet olmalıdır. Cyt-B ile kısa süre muamele edildikten sonra, hücreler daha sonra incelenen hücrenin hücre döngü evresine bağlı olarak 6 ve 24 saat arasında hücreler toplanır. Çok erken toplanma zamanında esasen hücreler G<sub>2</sub> veya geç S fazında kimyasallara maruz kalırlar. Daha geç hücrelerin toplanma zamanında ise tüm hücre döngülerinde kimyasallara maruz kalmış hücreler binukleate evrede bloke edilmiş olur. Böylece, Cyt-B eklendikten sonra büyüyen hücrelerin toplanma zamanı incelenen hücre tipiyle değişebilir (107).

## **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

### **3.1. GEREÇLER**

#### **Demirbaş Malzemeler**

1. Etüv (Heto/ Cell Hause 200)
2. Su banyosu (Thermal)
3. Vorteks (Janke & Kunkel VF2)
4. Mikroskop (Nikon Labophot 2, Olympus model CHK)
5. Santrifüj ( ALC PK 110 ve Nüve NF 815)
6. Hassas terazi (Kern S 2000)
7. Derin dondurucu
8. Buzdolabı
9. Dengeleme terazisi
10. Otomatik pipet
11. Fotomikroskop (Olympus BH-2)

#### **Sarf Malzemeler**

1. Ham's F10 (Biological Industries, B101-090-1B)
2. L-Glutamin (Biological Industries, B103-020-1C)
3. Fetal calf serum (Biological Industries, B104-001-1B)

4. Fitohemagglutinin (Biological Industries, B1-12-006-1H)
5. Penisilin-Streptomisin (Sigma, 03-031-1C)
6. Sitokalazin-B (Sigma, C-6762)
7. Sitrinin (Sigma, C-1017)
8. Mitomisin C (Sigma, M-0503)
9. Kolşisin (Biological Industries, 12-003-1C)
10. Heparin (Nevparin, Mustafa Nevzat İlaç Sanayi)
11. Giemsa (Merck, 5400512)
12.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (merck, 9021622)
13.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{H}_2\text{O}$  (Merck, K1690176)
14. Glacial asetik asit (Merck, 247K18855556)
15. Metanol (Merck, 502K05275408)
16. Ksilol (Merck, 207K037553)
17. Entellan® (Merck, 640171987)
18. İmmersiyon yağı® (Merck, 09403569)
19. KCL (Merck, 340TA611835)
20. Alkol (%96'lık Tekel)
21. Distile su
22. Tüplük
23. Çeşitli cam malzemeler
24. Konik tabanlı 10ml'lik steril kültür tüpü
25. Enjektör
26. Çeşitli ebatlarda puarlar
27. Pastör pipeti
28. Lam (Geschliffen-Mattarant, objectrager 76x26 mm)
29. Lamel (Menzel-Glasser 24x32)
30. 100 asalık renkli fotoğraf filmi (Fuji Colour)

### 3.2. YÖNTEM

#### Çalışma Grubu

Çalışma için, 25-30 yaşları arasında her iki cinsiyetten sağlıklı 6 kişinin periferik kan örnekleri alınmıştır.

Bu kişiler, sigara ve alkol kullanmayan, az miktarda (1-3 fincan) çay içen, kahve içme alışkanlığı olmayan, son üç ayda herhangi bir ilaç kullanmayan, kalıtsal bir hastalığı olmayan ve ailede kanser öyküsü bulunmayan sağlıklı kişilerden seçilmiştir.

#### Mikronükleus Elde Etmek İçin Kullanılan Yöntem

Mikronükleus yöntemi, periferik kandan kromozom analizi yapmak için kullanılan yöntemin (kültür ortamının hazırlanması, örneklerin alınması, ekim yapılması) aynı olup sadece çıkarım ve preparat hazırlama işlemlerinde farklılıklar vardır. Ayrıca 44. saatte Sitokalazin-B (Cyt-B) eklenmiştir.

#### Mitoz Elde Etmek İçin Kullanılan Yöntem

Periferik kandan kromozom analizi yapmak için kullanılan yöntemin (kültür ortamının hazırlanması, örneklerin alınması, ekim yapılması) aynıdır.

#### 1. Kültür Ortamının (Besiyeri) Hazırlanması

Kullanılan malzemeler ve miktarları;

<b>Malzeme</b>	<b>Miktarı</b>
Ham's F10	100 cc
L-glutamin	5 cc
Fitohemaglutinin	2,5 cc
Fetal calf serum	33 cc
Penisilin-streptomisin	1 cc
Heparin	1 cc

Besiyeri, steril ortamda 100 cc'lik Ham's F10 içine yukarıdaki diğer malzemeler eklenip, elle yavaş bir şekilde bir kaç kez karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan medyum yine steril ortamda 5'er cc olmak üzere steril vidalı kapaklı konik tabanlı kültür tüplerine bölünüp, 10-15 dakika laboratuvarında bekletildikten sonra kan örneklerinin ekimi yapıldı yada -20 °C'de dondurularak saklandı.

## 2. Kan Örneklerinin Alınması

Sağlıklı 6 kişinin, 5 ml'lik steril ve 0.1- 0.2 cc heparin içeren enjektörler kullanılarak periferik kanları alındı. Daha sonra kan örneklerinin bekletilmeden kültür ortamlarına ekimi yapıldı.

## 3. Kültür Tekniği

Önceden 37 °C'ye getirilmiş olan 5 cc medyum içeren kültür tüplerine steril ortamda, alınan kan örneklerinin 3-4 damlası dışarı atıldıktan sonra 12 damla (0.4 ml) kan ilave edildi. Tüplerin üzerine hasta adı ve doz oranları yazıldı ve her bir kişi için 3 tüpe ekim yapıldı. Tüplerin ikisi hafifçe karıştırılarak 37 °C'lik etüvde 44. saatte Cyt-B eklenmek koşuluyla 72 saat ve tüplerden biri 70. saatte kolşisin eklenerek 72 saat kültüre edildi.

1mg Cyt-B (Sigma, 6762) 5 ml dimetil sülfoksitte çözdürülerek hazırlandı. Çıkarımın 44. saatinde kültür tüpleri etüvden çıkartılarak steril ortamda her bir tüpe 75 µl (final konsantrasyonu: 3µg/ml) Cyt-B ilave edilerek tekrar etüve konuldu.

Kültürlere mitoz elde etmek için 10 µg/ml'lik kolşisin (Biological Industries, 12-003-1C) solusyonundan 70. saatte 0.05 ml ( final konsantrasyonu: 0.1 µg/ml) eklendi ve tüpler tekrar etüve konuldu.

**Sitrininin Hazırlanması ve Eklenmesi:** 10 mg sitrinin (Sigma, C-1017 ) 2 ml etanol ile çözülerek stok solusyon hazırlandı. Stoktan 0.2 ml alınarak üzerine 0.8 ml etanol eklenerek stok solusyon sulandırıldı. Farklı konsantrasyonlarda, 10 µM için sulandırılan solusyondan 12.5 µl, 20 µM için sulandırılan solusyondan 25 µl, 40 µM için sulandırılan solusyondan 50 µl, 60 µM için stok solusyondan 15 µl, 80 µM için stok solusyondan 20 µl ve 100 µM için stok solusyondan 25 µl sitrinin kültürlerine eklendi.

**Pozitif Kontrolün Hazırlanması ve Eklenmesi:** Pozitif kontrol olarak mitomisin c (MMC; Sigma, M-0503 ) kullanıldı. 2 mg MMC 10 ml steril distile su ile çözülerek stok solusyon hazırlandı. Stok solusyondan 0.1 ml alınarak üzerine 0.9 ml steril distile su eklendi. Hazırlanan bu solusyon  $-20^{\circ}\text{C}$  de saklandı ve hazırlanan bu solusyondan final konsantrasyonu  $10^{-7}$  M olacak şekilde kültürlerle 8.36  $\mu\text{l}$  MMC eklendi.

#### 4. Çıkarım İşlemleri

**MN Analizi İçin :** Umegaki ve arkadaşlarının MN elde etmek için çalışmasında kullanılan Balasem ve Ali metoduna göre çıkarım işlemleri yapıldı (108, 109).

• 0.1 M hipotonik solüsyonu, 1.864g KCL tartılıp distile su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

1. 72 saat inkubasyondan sonra kültür tüpleri etüvden çıkartılarak 1000 rpm'de 9 dakika santrifüj yapıldı.
2. Dipte 0.6-0.7 ml kalıncaya kadar üstteki süpernatantlar atıldı.
3. Daha sonra hücrelere laboratuvar ısısında beklemiş olan 0.1M hipotonik solusyonundan 6 ml eklenerek 4 dakika laboratuvar ısısında bekletildi.
4. Hücreler hipotonik solüsyonunda bekletildikten sonra 9 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi.
5. Süpernatantları atılıp üzerine taze hazırlanmış soğuk fiksatiften 6 ml (3:1, metanol: glacial asetik asit) yavaşça damla damla ilave edilip bekletmeden 9 dakika 1000 rpm'de santrifüj yapıldı.
6. Süpernatantları tekrar atılıp üzerine aynı fiksatiften 6 ml ilave edilip, 9 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi.
7. Dipte 0.7 ml fiksatifli hücre bırakılarak süpernatantları tekrar atıldı ve bir gün buzdolabında ( $+4^{\circ}\text{C}$ ) bekletildi.



**Mitotik İndeks İçin**

• 0.075 M hipotonik solüsyonu, 1.398g KCL tartılıp distile su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

1. 72 saat inkubasyondan sonra kültür tüpleri etüvden çıkartılarak 1000 rpm'de 9 dakika santrifüj yapıldı.
2. Dipte 0.6-0.7 ml kalıncaya kadar üstteki süpernatantlar atıldı.
3. Daha sonra hücrelere 37 °C'ye getirilmiş olan 0.075 M hipotonik solusyonundan 6 ml eklenerek 20 dakika 37 °C'lik etüvde bekletildi.
4. Hücreler hipotonik solüsyonunda bekletildikten sonra 9 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi.
5. Süpernatantları atılıp üzerine taze hazırlanmış soğuk fiksatiften 6 ml (3:1, metanol: glacial asetik asit) yavaşça damla damla ilave edilip bir gün buzdolabında (+4 °C) bekletildi.
6. Bekleme işleminden sonra tüpler, 9 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatantları atıldı.
7. İkinci ve üçüncü fiksasyon işlemleri (5 ve 6. basamaklar) yapıldı.
8. Dipte 0.7 ml fiksatifli hücre bırakılarak süpernatantları tekrar atıldı ve bir gün buzdolabında (+4 °C) bekletildi.

**Preparat Hazırlama**

**MN Analizi İçin:** Lamlar temizlenerek içinde %70'lik metanol bulunan şaleye yerleştirilip soğuyuncaya kadar buzdolabı buzuğunda bekletildi. Daha sonra şaleden çıkarılan lamlar iyice kurulandı. Pastör pipeti ile fiksatifli hücre içeren kültür tüplerine pipetaj yapılarak hücre süspansiyonundan pastör pipeti yardımıyla lamlara yakın mesafeden (1- 2cm yukarıdan) 9- 10 damla damlatıldı. Lamlara kuvvetlice üflenerek hücrelerin lam üzerine iyice dağılması sağlandı ve kurumaya bırakıldı. Her kültür tüpü için ayrı pastör pipeti kullanılarak farklı preparatlar hazırlandı ve lamlar ayrı ayrı kodlandı.

**Mitotik İndeks İçin:** Lamlar temizlenerek içinde %70'lik metanol bulunan şaleye yerleştirilip soğuyuncaya kadar buzdolabı buzlukunda bekletildi. Daha sonra şaleden çıkarılan lamlar iyice kurulandı. Pastör pipeti ile fiksatifli hücre içeren kültür tüplerine pipetaj yapılarak hücre süspansiyonundan pastör pipeti yardımıyla lamlara uzaktan 7- 8 damla damlatıldı. Lamlara kuvvetlice üflenerek hücrelerin lam üzerine iyice dağılması sağlandı ve kurumaya bırakıldı. Her kültür tüpü için ayrı pastör pipeti kullanılarak farklı preparatlar hazırlandı ve lamlar ayrı ayrı kodlandı.

### **1. Preparatların Boyanması ve Saklanması**

Boyama için gerekli olan solusyonlar;

- 0.06 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  solusyonu: 6.124 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  tartılıp distile su ile 750 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.
- 0.06 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  solusyonu: 8.010 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tartılıp distile su ile 750 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

49 ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 51 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (sorenson tamponu) balon jojede karıştırılıp, 100 ml'lik solusyondan 5 cc dışarı atıldı. 5 cc giemsa boyası bu tampona eklenerek tekrar karıştırıldı.

Kurumuş olan preparatlar yeni hazırlanan %5'lik giemsa da 6 dakika boyandıktan hemen sonra 2 kez distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar ksilolden geçirildikten sonra kanada balsamı (entellan) damlatılarak lamelle kapatıldı.

### **Lamların İncelenmesi ve MN Sıklığının Değerlendirilmesi**

Lamlar en iyi 1000X'lik büyütmede incelenir. Lamlar ışık veya floresans mikroskopta bakılmalıdır. Lamlar analizden önce numaralandırılmalıdır. Her bir duplike kültürden alınan lamlar için bir skor elde edilmelidir. Her bir preparat aşağıdaki bilgileri içermelidir (107):

1. MN'ların sayısı, en azından 1000 BN hücrede sayılmalıdır ve 1000 BN hücre başına MN frekansı hesaplanmalıdır.
2. Sıfır, bir veya daha fazla MN içeren BN hücre dağılımı; tek bir BN hücrede MN sayısı normalde sağlıklı bireylerin lenfositlerinde 0 ila 3 arasında değişmektedir ancak genotoksine ve yaşa bağlı olarak 3'den fazla olabilir.

3. Mikronükleuslu BN hücrelerinin frekansı, en azından 1000 BN hücrede bulunmalıdır.
4. 1000 BN hücresinde nükleoplazmik köprü frekansı hesaplanmalıdır.
5. 500 hücre başına tek çekirdekli (mononükleer), iki çekirdekli, üç çekirdekli ve dört çekirdekli hücrelerin oranı hesaplanmalıdır. Bu bilgiye dayanarak çekirdek bölünme indeksi oluşturulabilir.
6. Canlı ya da apoptoz veya nekrozdan dolayı ölen hücrelerin sayısı, aynı preparat üzerinde 500 hücre başına tek-, iki- ve çok-çekirdekli hücreler sayılırken skorlanabilir.

Hücreyi tanımlayamadığımızda atlayıp geçebiliriz.

#### **Sitokinezi Bloke Edilmiş Binükleer Hücreleri Tanımlama Kriterleri**

MN frekansı değerlendirilecek olan sitokinezi bloke edilmiş hücreler aşağıdaki kriterleri içermek zorundadır (107).

1. Hücreler binükleer (iki çekirdekli) olmalıdır.
2. Binükleer hücredeki iki çekirdeğin boyutu yaklaşık olarak aynı olmalı ve yoğun boyanmalıdır.
3. Binükleer hücredeki iki çekirdek nükleoplazmik bir köprü ile bağlanabilir. Bu nükleoplazmik köprü çekirdek çapının  $\frac{1}{4}$ 'ünden büyük olmamalıdır.
4. Binükleer hücredeki iki çekirdek birbirine temas edebilir, ancak ideal olarak birbirinin üzerine çıkmamış olmalıdır. İki çekirdeği üst üste çıkmış olan bir hücre eğer her bir çekirdeğin çekirdek sınırları ayırt edilebiliyorsa sayılmalıdır.
5. Binükleer hücrenin sitoplazmik sınırı yada zar yapısı bozulmamış olmalı ve komşu hücrelerin sitoplazmik sınırından açıkça ayırt edilebilmelidir.

#### **Mikronükleus Sayma Kriterleri**

MN'lar morfolojik olarak çekirdek ile aynı ancak çekirdekten daha küçüktür. MN özellikleri aşağıda belirtilmiştir (107):

- a) İnsan lenfositlerindeki MN'ların çapı, genellikle ana çekirdeğin ortalama çapının  $\frac{1}{16}$  ve  $\frac{1}{3}$ 'ü arasında değişmektedir.

- b) MN'lar kırılğan olmamalıdır ve böylece boyanan partiküller gibi artefaktlardan kolayca ayırt edilebilir.
- c) MN'lar ana çekirdekle birleşmiş veya bağlantılı olmamalıdır.
- d) MN'lar ana çekirdeğe temas edilebilir ancak üstüne binmiş olmamalıdır ve mikronükleer sınır çekirdek sınırından ayırt edilebilir olmalıdır.
- e) MN'lar genellikle ana çekirdekle aynı yoğunlukta boyanmalıdır, ana çekirdek bazen daha yoğun (koyu) boyanabilir.
- f) Hücrelerin 6 tane MN'dan daha fazlasını içermemesi gerekir.

### **Mikronükleus Sayımı**

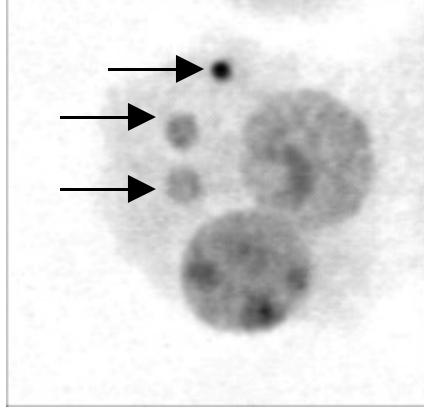
Sayılan çekirdeklerin tekrar sayılmaması için ışık mikroskopunda 400X büyütmede sitoplazması dağılmayıp sınırları belli olan çekirdekler belirlendi ve sadece bunlar sayıldı. Altı sağlıklı kişide her bir sitrinin dozu (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 60  $\mu$ M, 80  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M), negatif kontrolü, pozitif (MMC) kontrolü ve çözücü (etanol) kontrolü için duplike kültürlerden hazırlanan preparatlarda 1000 BN hücre sayıldı ve mikronükleuslar kaydedildi. Ayrıca her bir kişide yukarıda verilen sitrinin dozları ve kontroller için, 1000 tek çekirdekli hücre sayılarak iki çekirdekli hücreler kaydedildi ve iki çekirdekli/tek çekirdekli (binukleer/mononukleer) hücre oranı hesaplandı.

Altı sağlıklı kişinin denenen sitrinin dozlarındaki MN değerleri istatistiksel olarak non-parametrik testlerden Friedman testi ile değerlendirildi. Ayrıca sitrinin dozları ve MN ilişkisi korelasyon analizi ile değerlendirildi.

### **Mitotik İndeks Sayımı**

Işık mikroskopunda 400X büyütmede, altı sağlıklı kişide her bir sitrinin dozu (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 60  $\mu$ M, 80  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M), negatif kontrolü, pozitif (MMC) kontrolü ve çözücü (etanol) kontrolü için kültürlerden hazırlanan preparatlarda 3000 aktive (stimule) olmuş lenfositler sayıldı ve mitozlar kaydedildi.

Altı sağlıklı kişinin denenen sitrinin dozlarındaki mitotik indeks değerleri istatistiksel olarak non-parametrik testlerden Friedman testi ile değerlendirildi. Ayrıca sitrinin dozları ve mitotik indeks ilişkisi korelasyon analizi ile değerlendirildi.



**Resim 3.1.** MN'lu bintükleer (BN) hücre

## 4. BULGULAR

Altı sağlıklı kişiden her bir sitrinin dozu (10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M, 60  $\mu$ M, 80  $\mu$ M ve 100  $\mu$ M), negatif kontrol, pozitif (MMC) kontrol ve etanol kontrol için alınan kan rneleri materyal metotta belirtilen yöntemlere göre hazırlanan kültür ortamlarına ekilmiş ve yapılan preparatlarda MN frekansları ve MI oranları değerlendirilmiştir. Her bir kişi için bulunan MN ve MI değerlerinin negatif kontrol ve etanol kontrol değerleri ile karşılaştırılması, Friedman testi uygulanarak yapılmıştır. Ayrıca MN frekansları ve MI oranlarının doza bağlı ilişkisi korelasyon analizi ile değerlendirilmiştir.

Altı kişinin lenfositlerindeki farklı sitrinin dozları, negatif kontrol, pozitif (MMC) kontrol ve etanol kontrollerdeki MN'lu binükleer hücrelerin sayıları yüzde olarak Tablo 4.1.'de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** Altı kişinin lenfositlerinde farklı sitrinin dozları, negatif kontrol, pozitif (MMC) kontrol ve etanol kontrollerdeki MN'lu binükleer hücrelerin sayıları (değerler % olarak verilmiştir).

Denek(n)	Negatif kontrol	Etanol kontrol	Pozitif kontrol	10 µM sitrinin	20 µM sitrinin	40 µM sitrinin	60 µM sitrinin	80 µM sitrinin	100 µM sitrinin
1	1.67	1.36	5.28	1.57	2.90	3.81	4.08	4.67	5.05
2	2.16	2.41	8.99	2.08	2.68	3.20	4.47	4.58	5.78
3	1.73	1.91	4.00	2.62	2.71	2.97	3.28	3.73	4.11
4	1.21	1.34	3.92	2.32	2.31	3.55	3.71	3.94	5.42
5	1.52	1.77	4.28	1.54	1.74	2.06	3.67	3.62	3.87
6	2.73	2.28	4.75	2.26	2.18	2.58	3.25	3.48	4.15
Ortalama %±SS	1.84±0.54	1.85±0.45	5.20±1.92	2.07±0.43	2.42±0.43	3.03±0.64	3.74±0.47	4.00±0.51	4.73±0.79
P*		0.414	0.014	1.000	0.102	0.102	0.014	0.014	0.014
P**			0.014	1.000	0.414	0.014	0.014	0.014	0.014

MN: Mikronukleus, SS: Standart sapma (SD)

\*Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında (Friedman test)

\*\*Etanol kontrol ile karşılaştırıldığında (Friedman test)

Ortalama  $\% \pm SS$  değerleri: negatif kontrolde  $1.84 \pm 0.54$ , etanol kontrolde  $1.85 \pm 0.45$ , pozitif kontrolde  $5.20 \pm 1.92$ , 10  $\mu M$  sitrininde  $2.07 \pm 0.43$ , 20  $\mu M$  sitrininde  $2.42 \pm 0.43$ , 40  $\mu M$  sitrininde  $3.03 \pm 0.64$ , 60  $\mu M$  sitrininde  $3.74 \pm 0.47$ , 80  $\mu M$  sitrininde  $4.00 \pm 0.51$ , ve 100  $\mu M$  sitrininde  $4.73 \pm 0.79$  olarak bulunmuştur. Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında (Friedman test) pozitif kontrol, 60  $\mu M$ , 80  $\mu M$ , 100  $\mu M$  sitrinin değerleri istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0.014$ ), etanol kontrol, 10  $\mu M$ , 20  $\mu M$ , 40  $\mu M$  sitrinin değerleri istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $p>0.05$ ). Etanol kontrol ile karşılaştırıldığında (Friedman test) pozitif kontrol, 40  $\mu M$ , 60  $\mu M$ , 80  $\mu M$ , 100  $\mu M$  sitrinin değerleri istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0.014$ ), 10  $\mu M$ , 20  $\mu M$ , sitrinin değerleri istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $p>0.05$ ).

Altı kişinin lenfositlerinde farklı sitrinin dozları, negatif kontrol, pozitif (MMC) kontrol ve etanol kontrollerdeki binükleer hücre/mononükleer hücre değerleri yüzde olarak Tablo 4.2. verilmiştir.

Ortalama  $\% \pm SS$  değerleri: negatif kontrolde  $37.37 \pm 4.77$ , etanol kontrolde  $31.82 \pm 4.62$ , pozitif kontrolde  $17.63 \pm 2.11$ , 10  $\mu M$  sitrininde  $28.03 \pm 4.39$ , 20  $\mu M$  sitrininde  $22.08 \pm 2.05$ , 40  $\mu M$  sitrininde  $17.10 \pm 2.05$ , 60  $\mu M$  sitrininde  $16.30 \pm 1.87$ , 80  $\mu M$  sitrininde  $13.83 \pm 3.58$ , ve 100  $\mu M$  sitrininde  $10.30 \pm 3.05$  olarak bulunmuştur. Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında (Friedman test) etanol kontrol, pozitif kontrol, 10  $\mu M$ , 20  $\mu M$ , 40  $\mu M$ , 60  $\mu M$ , 80  $\mu M$ , 100  $\mu M$  değerleri istatistiksel olarak hepsi anlamlı bulunmuştur ( $p=0.014$ ). Etanol kontrol ile karşılaştırıldığında (Friedman test) pozitif kontrol, 40  $\mu M$ , 60  $\mu M$ , 80  $\mu M$ , 100  $\mu M$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0.014$ ), 10  $\mu M$ , 20  $\mu M$ , değerleri istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $p>0.05$ ).



**Tablo 4.2.** Altı kişinin lenfositlerinde farklı sitrinin dozları, negatif kontrol, pozitif (MMC) kontrol ve etanol kontrollerdeki binükleer hücre/mononükleer hücre değerleri (değerler yüzde olarak verilmiştir).

Denek(n)	Negatif kontrol	Etanol kontrol	Pozitif kontrol	10 µM sitrinin	20 µM sitrinin	40 µM sitrinin	60 µM sitrinin	80 µM sitrinin	100 µM sitrinin
1	35.59	26.78	16.98	24.03	21.11	17.54	18.20	17.38	12.17
2	34.40	32.86	15.22	27.31	24.29	18.79	14.11	10.78	10.15
3	33.78	29.19	17.68	23.55	18.84	16.03	16.49	15.13	11.53
4	39.79	35.97	19.36	27.78	22.83	18.24	17.59	15.11	9.91
5	46.06	38.19	20.74	35.47	23.99	18.55	17.52	16.40	13.37
6	34.62	27.90	15.82	30.06	21.43	13.45	13.88	8.16	4.66
Ortalama %±SS	37.37±4.77	31.82±4.62	17.63±2.11	28.03±4.39	22.08±2.05	17.10±2.05	16.30±1.87	13.83±3.58	10.30±3.05
P*		0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
P**			0.014	0.102	0.102	0.014	0.014	0.014	0.014

SS: Standart sapma (SD)

\*Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında (Friedman test)

\*\*Etanol kontrol ile karşılaştırıldığında (Friedman test)

Farklı sitrinin dozlarında binükleer hücrelerin sayısı, MN'lu binükleer hücrelerin sayıları, binükleer hücrelerde MN (1MN, 2MN, 3MN, 4MN, ve 5MN ) sayıları, MN ve binükleer hücrelerin yüzdeleri Tablo 4.3.'de verilmiştir.

Altı kişinin lenfositlerinde 9 farklı (10 µM, 20 µM, 40 µM, 60 µM, 80 µM ve 100 µM) sitrinin dozları, negatif kontrol, pozitif (MMC) kontrol ve etanol kontrollerdeki mitoz ve hücre sayıları (Mitoz sayısı/hücre sayısı) Tablo 4.4.'de verilmiştir.

Altı kişinin lenfositlerinde farklı sitrinin dozları negatif kontrol, pozitif (MMC) kontrol ve etanol kontrollerdeki mitotik indeks değerleri yüzde olarak Tablo 4.5.'de verilmiştir.

Ortalama  $\% \pm SS$  değerleri: negatif kontrolde  $6.72 \pm 1.45$ , etanol kontrolde  $5.81 \pm 1.40$ , pozitif kontrolde  $3.53 \pm 0.32$ , 10 µM sitrininde  $5.39 \pm 1.57$ , 20 µM sitrininde  $4.51 \pm 0.99$ , 40 µM sitrininde  $3.77 \pm 0.76$ , 60 µM sitrininde  $3.61 \pm 0.75$ , 80 µM sitrininde  $3.44 \pm 0.67$ , ve 100 µM sitrininde  $3.19 \pm 0.47$  olarak bulunmuştur. Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında (Friedman test) etanol kontrol, pozitif kontrol, 10 µM, 20 µM, 40 µM, 60 µM, 80 µM, 100 µM sitrinin değerleri istatistiksel olarak hepsi anlamlı bulunmuştur ( $p=0.014$ ). Etanol kontrol ile karşılaştırıldığında (Friedman test) pozitif kontrol, 40 µM, 60 µM, 80 µM, 100 µM değerleri istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0.014$ ), 10 µM, 20 µM değerleri istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $p>0.05$ ).

Altı kişinin lenfositlerindeki sitrinin dozları ve binükleer/mononükleer hücre değerleri arasındaki ilişki korelasyon analizi ile değerlendirildiğinde, farklı sitrinin dozlarında binükleer/mononükleer hücre değerlerinin doza bağlı olarak azaldığı görülmektedir ( $r^2$ : 0.7193; Şekil 4.1).

Altı kişinin lenfositlerindeki sitrinin dozları ve MN'lu binükleer hücre sayıları arasındaki ilişki korelasyon analizi ile değerlendirildiğinde, farklı sitrinin dozlarında MN'lu binükleer hücre sayılarının doza bağlı olarak arttığı görülmektedir ( $r^2$ : 0.6921; Şekil 4.2).

Altı kişinin lenfositlerindeki sitrinin dozları ve mitotik indeks değerleri arasındaki ilişki korelasyon analizi ile değerlendirildiğinde, farklı sitrinin dozlarında mitotik indeks değerlerinin doza bağlı olarak azaldığı görülmektedir ( $r^2$ :0.592; Şekil 4.3).

**Tablo 4.3.** Farklı sitrinin dozları, negatif kontrol, pozitif (MMC) kontrol ve etanol kontrollerdeki binükleer hücrelerin sayısı, MN'lu binükleer hücrelerin sayısı, MN sayıları ve binükleer hücrelerin yüzdeleri.

Grup	Total binükleer hücrelerin sayısı	MN'lu binükleer hücrelerin sayısı	MN'lu binükleer hücrelerin sayısı					MN frekansı ortalama (%±SS)	binükleer/mononükleer hücre ortalama (% ± SS)
			1 MN	2 MN	3 MN	4 MN	5 MN		
Negatif kontrol	6278	115	81	11	4	-	-	1.84±0.54	37.37±4.77
Etanol kontrol	6302	114	99	6	1	-	-	1.85±0.45	31.82±4.62
Pozitif kontrol	6111	318	258	28	-	1	-	5.20±1.92	17.63±2.11
10 µM sitrinin	6156	127	111	3	2	1	-	2.07±0.43	28.03±4.39
20 µM sitrinin	6206	150	109	13	2	1	1	2.42±0.43	22.08±2.05
40 µM sitrinin	6140	186	156	10	2	1	-	3.03±0.64	17.10±2.05
60 µM sitrinin	6277	235	180	19	3	2	-	3.74±0.47	16.30±1.87
80 µM sitrinin	6196	248	188	19	3	2	1	4.00±0.51	13.83±3.58
100 µM sitrinin	6199	294	220	25	4	3	-	4.73±0.79	10.30±3.05

MN: Mikronukleus, SS: Standart sapma (SD),

**Tablo 4.4.** Altı kişinin lenfositlerinde farklı sitrinin dozları, negatif kontrol, pozitif (MMC) kontrol ve etanol kontrollerdeki mitoz ve hücre sayıları (Mitoz sayısı/hücre sayısı)

<b>Denek(n)</b>	<b>Negatif kontrol</b>	<b>Etanol kontrol</b>	<b>Pozitif kontrol</b>	<b>10 µM sitrinin</b>	<b>20 µM sitrinin</b>	<b>40 µM sitrinin</b>	<b>60 µM sitrinin</b>	<b>80 µM sitrinin</b>	<b>100 µM sitrinin</b>
1	224/3165	195/3028	109/3101	203/3389	141/3182	120/3090	115/3126	106/3002	100/3101
2	142/3148	125/3057	118/3432	133/3056	135/3141	116/3171	103/3092	104/3272	92/3134
3	173/3189	134/3097	118/3152	110/3121	91/3120	92/3205	90/3292	88/3327	80/3049
4	230/3177	190/3250	106/3421	144/3239	136/3200	108/3169	103/3121	105/3330	95/3088
5	252/3017	238/3058	133/3317	224/3006	174/3025	159/3083	151/3035	141/3025	121/3000
6	231/3004	201/3148	102/3056	167/3017	175/3235	113/3103	109/3018	107/3077	99/3071

**Tablo 4.5.** Altı kişinin lenfositlerinde farklı sitrinin dozları, negatif kontrol, pozitif (MMC) kontrol ve etanol kontrollerdeki mitotik indeks değerleri (değerler % olarak verilmiştir).

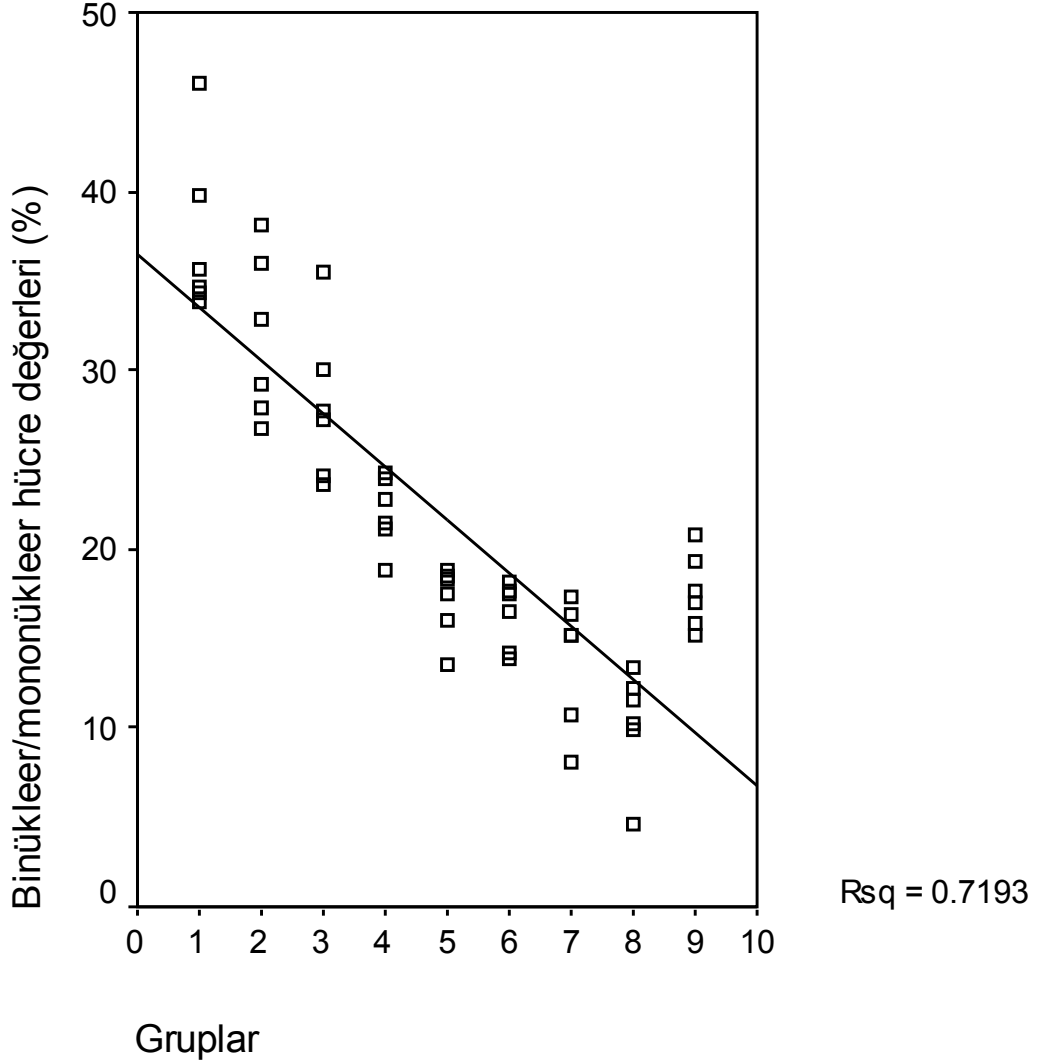
Denek(n)	Negatif kontrol	Etanol kontrol	Pozitif kontrol	10 µM sitrinin	20 µM sitrinin	40 µM sitrinin	60 µM sitrinin	80 µM sitrinin	100 µM sitrinin
1	7.08	6.44	3.52	6.99	4.43	3.88	3.68	3.53	3.23
2	4.51	4.09	3.44	4.35	4.30	3.66	3.33	3.18	2.94
3	5.43	4.33	3.74	3.53	2.92	2.87	2.73	2.65	2.62
4	7.24	5.85	3.10	4.45	4.25	3.41	3.30	3.15	3.08
5	8.35	7.78	4.01	7.45	5.75	5.16	4.98	4.66	4.03
6	7.69	6.39	3.34	5.54	5.41	3.64	3.61	3.48	3.22
Ortalama %±SS	6.72±1.45	5.81±1.40	3.53±0.32	5.39±1.57	4.51±0.99	3.77±0.76	3.61±0.75	3.44±0.67	3.19±0.47
P*		0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014	0.014
P**			0.014	0.414	0.102	0.014	0.014	0.014	0.014

SS: Standart sapma (SD).

\*Negatif kontrol ile karşılaştırıldığında (Friedman test).

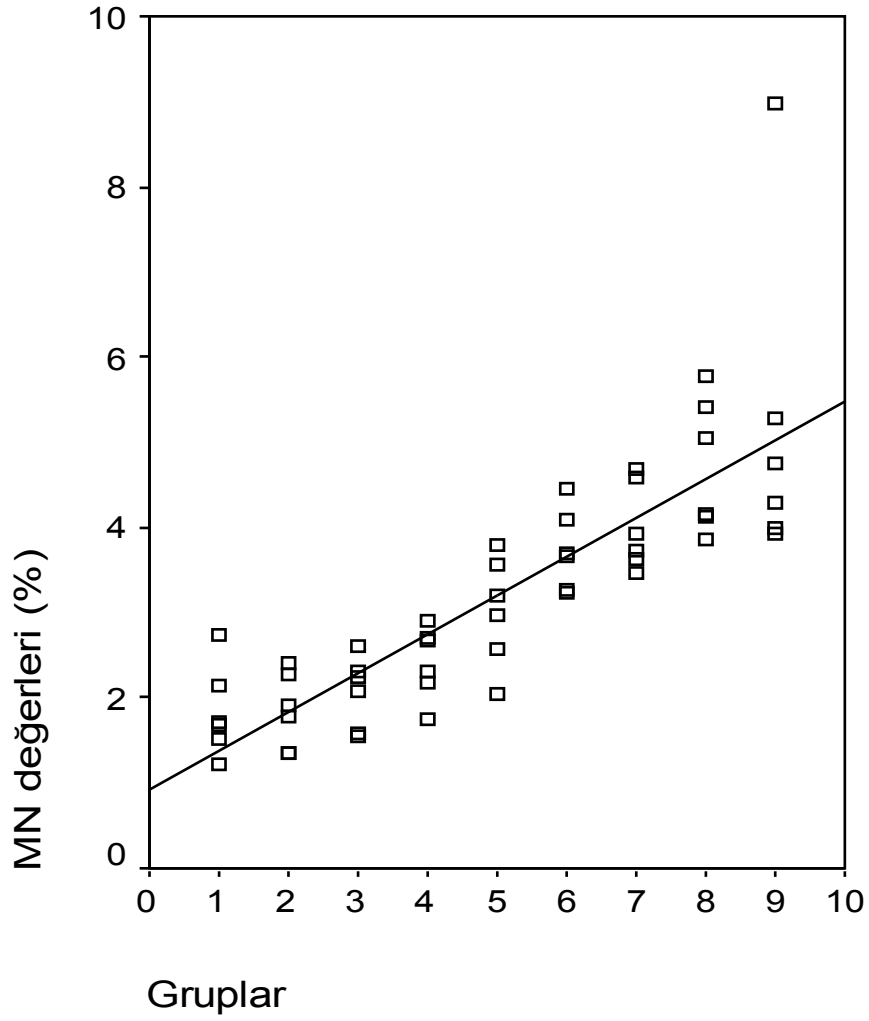
\*\*Etanol kontrol ile karşılaştırıldığında (Friedman test).





**Şekil 4.1.** Altı kişinin lenfositlerinde farklı sitrinin dozları, negatif kontrol, pozitif (MMC) kontrol ve etanol kontrollerdeki binükleer/mononükleer hücre değerleri

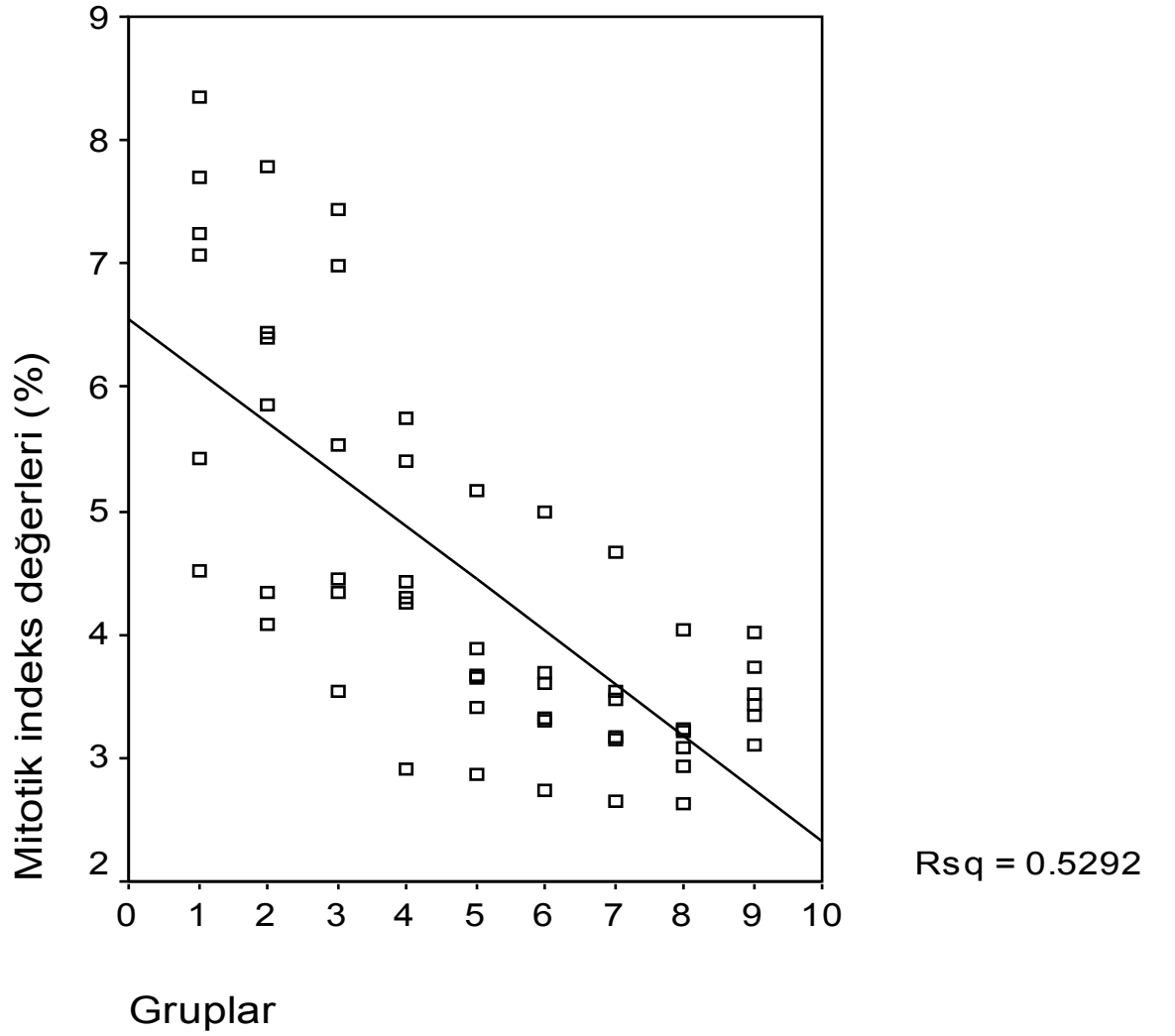
(Değerler % olarak verilmiştir. Gruplar: 1.Negatif kontrol; 2.Etanol kontrol; 3.10  $\mu\text{M}$  sitrinin; 4.20  $\mu\text{M}$  sitrinin; 5.40  $\mu\text{M}$  sitrinin; 6.60  $\mu\text{M}$  sitrinin; 7.80  $\mu\text{M}$  sitrinin; 8.100  $\mu\text{M}$  sitrinin; 9.Pozitif kontrol).



**Şekil 4.2.** Altı kişinin lenfositlerinde farklı sitrinin dozları, negatif kontrol, pozitif (MMC) kontrol ve etanol kontrollerdeki MN'lu binükleer hücrelerin sayıları.

(Değerler % olarak verilmiştir. Gruplar: 1.Negatif kontrol; 2.Etanol kontrol; 3.10  $\mu$ M sitrinin; 4.20  $\mu$ M sitrinin; 5.40  $\mu$ M sitrinin; 6.60  $\mu$ M sitrinin; 7.80  $\mu$ M sitrinin; 8.100  $\mu$ M sitrinin; 9.Pozitif kontrol).





**Şekil 4.3.** Altı kişinin lenfositlerinde farklı sitrinin dozları, negatif kontrol, pozitif (MMC) kontrol ve etanol kontrollerdeki Mitotik indeks değerleri.

(Değerler % olarak verilmiştir. Gruplar: 1.Negatif kontrol; 2.Etanol kontrol; 3.10  $\mu$  M sitrinin; 4.20  $\mu$ M sitrinin; 5.40  $\mu$ M sitrinin; 6.60  $\mu$ M sitrinin; 7.80  $\mu$ M sitrinin; 8.100  $\mu$ M sitrinin; 9.Pozitif kontrol).

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikotoksinler çeşitli mantar türleri tarafından oluşturulur. Ayrıca yapısal olarak farklı ikincil metabolitleri üretirler. Bu toksik bileşikler besinlere ve ekinlere bulaşabilir. Bulaşan bu materyaller insan ve hayvanlarda patojenik olabilir ve ciddi sağlık problemlerine ve karsinogeneze öncülük yapabilir (8). Çevrede mantarların yayılma doğasından dolayı mikotoksinlerin yiyeceklere bulaşması kaçınılmaz olmaktadır.

Mikotoksinlerden biri olarak sitrinin mikotoksini toksik ikincil bir metabolittir, ilk kez *Penicillium citrinum*'dan izole edilmiştir (9). Sitrinin antibiyotik, bakteriyostatik, antifungal ve antiprotozoal özelliklere sahiptir. Çeşitli türleri hepato-nefrotoksin olarak bilinmesine karşın (41-43), *in vitro* çalışmalar sitrininin renal mitokondriyal fonksiyon ve makromolekül biyosentezi (hücre ölümünde sonuçlanır) üzerinde pek çok etkiye neden olduğunu göstermiştir (44-46). Buna ek olarak sitrinin, et, meyve, tahıl (47) ve peynir (48-50) gibi besinlerde diğer nefrotoksin-ochratoksin A ile birlikte oluşur ve sinerjistik etki yapar (51).

Sitrininin genotoksisitesi insanlarda tam anlaşılamadığından, halkın bu toksine düşük seviyelerde ve uzun süre maruz kalması önemli olmaktadır. Önceki çalışmalar, sitrininin çeşitli hücre ve hayvan modellerinde nefrotoksisiteye sebep olduğunu göstermiştir. Mitokondri elektron transport sistemindeki karışıklık, bu toksinin olası etki şekli olarak tanımlanmıştır. Sitrinin mutagenisitesi ve genotoksisitesi üzerine hem

negatif hem pozitif sonuçlar elde edilmiştir. Sitrinin, V79-E hücrelerinde kromozomal aberasyonlara sebep olur, fakat kardeş kromatid değişimine (KKD) sebep olmaz ve Salmonella typhimurium çalışmalarında mutajenik değildir (57, 58). Diğer taraftan, sitrinin intakt Escherichia coli kromozom DNA'sında DNA tek- ve çift-iplik kırıklarına sebep olur (59). Ayrıca sitrinin, V79 hücrelerinde (60) anöploidogenik potansiyele sahip olduğu ve farelerin kemik iliği hücrelerinde (61) kromozomal anormalliklere sebep olduğu gösterilmiştir. Dahası, erkek F344 ratlarında dietle sitrininin oral alınımı, beslenen ratların % 70'nde renal adenomların oluşumuna sebep olmuştur (62).

Kromozom yapısının tam anlamıyla anlaşılmasına rağmen, kromozom seviyesinde görülen anormallikler DNA seviyesindeki hasarların belirtisidir, örneğin kromozom kırılmaları, DNA'daki çift iplik yapının tekrar tamir edilememesinden meydana gelebilir (67). Kromozom kaybı ve kromozomların hatalı ayrılışı (non-disjunction), kanserde ve yaşlanmada çok önemli olaylardır ve metafazdan önce iğ ipliklerinde, sentromerde yada kromozom yapısındaki bozukluklarla ortaya çıkabilir (68-70). MN'lar, mitoz sırasında kutuplara gidemeyen tüm kromozomlar ya da sentromeri olmayan kromozom kırıklarını içeren bölünen hücrelerde görülebilir. Telofazda, geri kalan kromozomlar ve parçaları etrafında nükleer bir zar oluşur ve bu yapı hücrenin ana çekirdeğinden daha küçük olduğundan "mikronükleus (MN)" olarak adlandırılır (Şekil 2.3). Bundan dolayı, MN'lar hem kromozom kırılması hem de kromozom kaybının uygun ve güvenilir ölçümünü sağlar. MN'lar çekirdek bölünmesi tamamlandıktan sonra oluştuğu için, MN'lar hücre döngüsünün binükleer (iki çekirdekli, BN) safhasında ideal olarak ölçülür (74, 75). Son olarak, yeni kimyasalların genotoksitesini test etmek için metafaz analizi yerine mikronükleus analizinin kullanılması önerilmektedir (91, 93).

Bu çalışmada, 6 sağlıklı kişinin lenfosit kültürlerinde çeşitli sitrinin dozları (10 µM, 20 µM, 40 µM, 60 µM, 80 µM ve 100 µM), negatif kontrol, pozitif (MMC) kontrol ve etanol kontrol için MN frekansları ve MI oranları değerlendirilmiştir.

MN değerleri açısından, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında (Friedman test) pozitif kontrol, 60 µM, 80 µM, 100 µM sitrinin değerleri istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0.014$ ), etanol kontrol, 10 µM, 20 µM, 40 µM sitrinin değerleri istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $p>0.05$ ). Etanol kontrol ile karşılaştırıldığında (Friedman test) pozitif kontrol, 40 µM, 60 µM, 80 µM, 100 µM sitrinin değerleri istatistiksel olarak anlamlı

( $p=0.014$ ) , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , sitrinin değerleri istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $p>0.05$ ) (Tablo 4.1).

Binükleer hücre/mononükleer hücre değerleri açısından, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında (Friedman test) etanol kontrol, pozitif kontrol, 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  değerleri istatistiksel olarak hepsi anlamlı bulunmuştur ( $p=0.014$ ). Etanol kontrol ile karşılaştırıldığında (Friedman test) pozitif kontrol, 40  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0.014$ ), 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , değerleri istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $p>0.05$ ) (Tablo 4.2).

Mitotik indeks değerleri açısından, negatif kontrol ile karşılaştırıldığında (Friedman test) etanol kontrol, pozitif kontrol, 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  sitrinin değerleri istatistiksel olarak hepsi anlamlı bulunmuştur ( $p=0.014$ ). Etanol kontrol ile karşılaştırıldığında (Friedman test) pozitif kontrol, 40  $\mu\text{M}$ , 60  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı ( $p=0.014$ ), 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  değerleri istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur ( $p>0.05$ ) (Tablo 4.5).

Ayrıca, 6 kişinin lenfositlerindeki sitrinin dozları ve binükleer/mononükleer hücre değerleri arasındaki ilişki korelasyon analizi ile değerlendirildiğinde, farklı sitrinin dozlarında binükleer/mononükleer hücre değerlerinin doza bağlı olarak azaldığı görülmektedir ( $r^2$ : 0.7193; Şekil 4.1). Altı kişinin lenfositlerindeki sitrinin dozları ve MN'lu binükleer hücre sayıları arasındaki ilişki korelasyon analizi ile değerlendirildiğinde, farklı sitrinin dozlarında MN'lu binükleer hücre sayılarının doza bağlı olarak arttığı görülmektedir ( $r^2$ : 0.6921; Şekil 4.2). Altı kişinin lenfositlerindeki sitrinin dozları ve mitotik indeks değerleri arasındaki ilişki korelasyon analizi ile değerlendirildiğinde, farklı sitrinin dozlarında mitotik indeks değerlerinin doza bağlı olarak azaldığı görülmektedir ( $r^2$ : 0.5292; Şekil 4.3).

Literatür araştırmasına göre insan lenfositleri üzerinde sitrinin, mikronukleus ve mitotik indeks ile ilgili olarak az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmalardan birinde, patulin ve sitrininin insan hücrelerinde genotoksik etkileri üzerine yapılan bir çalışmada, patulinin insan kan lenfositlerinde ve insan embriyonik böbrek (HEK293) hücrelerinde genotoksik olduğu gösterilirken, sitrininin önemli genotoksik ve klastojenik etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir (63). Ancak, bizim çalışmamıza benzer şekilde, Lorkowski ve arkadaşları mikotoksin sitrininin yüksek konsantrasyonlarda (100  $\mu\text{M}$ ) kültüre edilmiş hepatoma hücrelerinde RNA, protein ve DNA sentezini (64)

ve Wasternack ve arkadaşları da sitrininin V79-E hücrelerinde konsantrasyon ve doza bağlı olarak RNA sentezini inhibe ettiğini bulmuşlardır (65).

Kiso ve arkadaşları çalışmalarında sitrinin ve patulin mikotoksinlerinin mikrotubul (mitoz sırasında kromozomların ayrılmasında fonksiyon gören) kaybı üzerine etkilerini etkilerini araştırmışlar ve sitrininin 25-100 µg/Disk konsantrasyonlarında A. nidulans benA33 mutantlarında mikrotubul asemblesini inhibe ettiğini göstermişlerdir (110). Bizim çalışmamızda da mikrotubul inhibisyonu ile tutarlı bir şekilde sitrinin doz artışı ile mitotik indeks değerlerinin azaldığı bulunmuştur (Şekil 4.3). Yine bizim çalışmamızla uyumlu olarak, soğan (*Allium cepa*) kök hücrelerinde sitrininin farklı dozlarında mitotik indeks oranlarının araştırıldığı başka bir çalışmada, sitrinin dozları artışı ile mitotik indeksin azaldığı gösterilmiştir (111).

Çalışmamızın sonuçlarına göre, insan lenfositlerinde in vitro olarak yüksek konsantrasyonlarda sitrinin genotoksik ve sitotoksik etkilere sahip olduğu için, sitrininin dolaylı ve doğrudan alımından kaçınılmalıdır.

## 6. KAYNAKLAR

1. Omurtag GZ, Atak G, Yurdun T, Ersoy Ö. Aflatoxin Analysis In Dried Red Pepper Samples by TLC and HPLC. *Acta Pharm Turcica* 1998; XXXX(3): 125-130.
2. Yurdun T, Omurtag GZ, Ersoy Ö. Aflatoxin Contamination in Peanut Butters and Spices in Istanbul. *J Fac Pharm* 2001; 34: 41-48.
3. Tanker M, Soner O, Şahin AA, Kaya S, Ayanoğlu-Dülger G, Ersoy Ö, Omurtag GZ, Yurdun T. Aflatoksinler ve Besinlerle Sağlığımız Üzerinde Oluşturabileceği Tehlikeler, Eds. Ersoy Ö, Baykara S, Atay T, *Aktüel Eczacı* 1995; 2(16), 14-18.
4. Trucksess MW. Mycotoxins. *J AOAC In* 2004; 87: 275-284.
5. Molinie A, Pfohl-Leszkowicz A. Toxic effects of cocontamination of ochratoxin A and citrinin. *Drug Met Rev* 2003; 35: 153 Suppl. 1.
6. Richetti A, Cavallaro A, Ainis T, Fimiani V. Effect of some mycotoxins on superoxide anion production of isolated human neutrophils and in whole blood. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2003; 25: 441-449.
7. Kaya S. Mikotoksinler. Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A (Eds). *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji*. Medisan, Ankara, 2002: 537-542.
8. Bennett JW, Klinc M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(3): 497-516.

9. Hetherington AC, Raistrick H. Studies in biochemistry of microorganism XI. On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, produced from glucose by *Penicillium citrinum* Thom. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 1931; 220: 269-297.
10. Ei-Banna AA, Pitt JL, Leistner L. Production of mycotoxins by penicillium species. Syst Appl Microbiol 1987; 10: 42-46.
11. Kurata H. Mycotoxins and mycotoxicoses. In A.E.Pohland, V.R.Dowell, J.L.Richards (Eds), Microbial toxins in foods and feeds. New York, USA: Plenum Pres. 1990; pp.249-259.
12. Blanc PJ, Loret MO, Goma G. Production of citrinin by various species of *Monascus*. Biotechnol Lett, 1995; 17(3): 291.
13. Blanc, PJ, Loussac JP, Le JB, Le BP, Loret MO, Pareilleux A, Prome D, Prome JC, Santerre AL, Goma G. Characterisation of monascidin A from *Monascus* as citrinin. Int J Food Microbiol 1995; 27: 201-213.
14. Li F, Xu G, Li Y. Study on the production of sitrinin by *Monascus* strains used in food industry. Wei Sheng Yan Jiu, 2003; 32(6): 602-605.
15. Wong HC, Koehler PE. Production and isolation of an antibiotic from *Monascus purpureus* and its relationship to pigment production. J Food Sci 1981; 46: 589-592.
16. Betina V. In Betina, V.(Ed.), Mycotoxins-Production, Isolation, Separation and Purification (Developments in Food Science, Vol.8) Elsevier, Amsterdam, the Netherland. 1984; pp. 217-236.
17. Phillips RD, Hayes AW, Berndt WO, Williams W. Effects of citrinin on renal function and structure. Toxicology, 1980; 16: 123-127.
18. Frank HK. Citrinin. Zeitschrift fur Ernährungswissenschaft, 1992; 31: 164-177.
19. IARC. Some natural occurring and synthetic food components, coumrins ultraviolet radiation. In Monographs of the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemical to Human, (Vol.40). IARC, Lyon, France. 1986; pp.83-98.
20. Abramson D, Hulasare R, White NDG, Jayas DS, Marquardt RR. Mycotoxin formation in hullless barley during granary storage at 15 and 19% moisture content. J Stored Prod Res, 1999; 35(3): 297-305.
21. Bailly JD, Querin A, Le Bars-Bailly S, Bernard G, Guerre P. Citrinin production and stability in cheese. J Food Protect, 2002; 65(8): 1317-1321.

22. CAST. Mycotoxin:risks in plant, animal, and human systems. Council of Agricultural Science and Technology, Task force rep. No.139, CAST, Ames, IA. 2003.
23. Comerio R, Fernandez Pinto VE, Vaamonde G. Influence of water activity on penicillium citrinum growth and kinetics of citrinin accumulation in wheat. *Int J Food Microbiol* 1998; 42: 219-223.
24. Gimeno A, Martins ML. Rapid thin layer chromatographic determination of patulin, citrinin and aflatoxin in apples and pears, and their juices and jams. *J Assoc Official Analytic Chem* 1983; 66(1): 85-91.
25. Heber D, Lembertas A, Lu QY, Bowerman S, Go VLW. An analysis of nine proprietary Chinese red yeast rice dietary supplements: implications of variability in chemical profile and contents. *J Altern Complem Med* 2001; 7(2): 133-139.
26. Kpodo K, Sorensen AK, Jakobsen M. The occurrence of mycotoxins in fermented maize products. *Food Chem* 1995; 56(2): 147-153.
27. Meister U. New method of citrinin determination by HPLC after polyamide column clean-up. *Eur Food Res Technol* 2004; 218: 394-399.
28. Phillips R D, Hayes AW, Bearnt WO. High-performance liquid chromatographic analysis of the mycotoxin citrinin and its application to biological fluids. *J Chromatogr*, 1980; 190(2): 419-427.
29. Deshpande SS. *Handbook of Food Toxicology*. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA, 2002; p.424.
30. Poupko R, Luz Z, Destro R. Carbon -13 NMR of citrinin in the solid state and in solutions. *J Phys Chem A*, 1997; 101: 5097-5102.
31. Hajjaj H, Klæbe A, Loret MO, Goma G, Blanc PJ, Francois J. Biosynthetic pathway of citrinin in the filamentous fungus *Monascus ruber* as revealed by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance. *Appl Environ Microb* 1999; 65(1): 311-314.
32. Barber J, Staunton J. New insights into polyketide metabolism; the use of protium as a tracer in the biosynthesis of citrinin by *Penicillium citrinum*. *J Chem Soc Perk T1* 1980; 2244-2248.
33. Sankawa U, Ebizuka Y, Noguchi H, Isikawa Y, Kitagawa S, Yamamoto Y, Kobayashi T, Iitak Y. Biosynthesis of citrinin in *Aspergillus terreus*. *Tetrahedron*, 1983; 39(21): 3583-3591.



34. Hajjaj H, Blanc P, Groussac E, Goma G, Uribe Larrea JL, Loubeire P. Improvement of red pigment/citrinin production ratio as a function of environmental conditions by *Monascus ruber*. *Biotechnol Bioeng* 1999; 64: 497-501.
35. Hajjaj H, Blanc P, Groussac E, Uribe Larrea JL, Goma G, Loubeire P. Kinetic analysis of red pigment and citrinin production by *Monascus ruber* as a function of organic acid accumulation. *Enzyme Microb Tech* 2000; 27: 619-625.
36. Wang JJ, Lee CL, Pan TM. Improvement of monacolin K, -aminobutyric acid and citrinin production ratio as a function of environmental conditions of *Monascus purpureus* NTU601. *J Ind Microbiol Biot* 2003; 30: 669-676.
37. Hajjaj H, Klaebe A, Goma G, Blanc PJ, Barbier E, Francois J. Medium-chain fatty acids affect citrinin production in the filamentous fungus *Monascus ruber*. *Appl Environ Microb* 2000; 66(3): 1120-1125.
38. Montani M, Vaamonde G, Resnik SL, Buera P. Temperature influence on penicillium citrinum Thom growth and citrinin accumulation kinetic. *Int J Food Microbiol* 1998; 7(2): 115-122.
39. Santos IM, Abrunhosa L, Venancio A, Lima N. The effect of culture preservation techniques on patulin and citrinin production by *Penicillium expansum* Link. *Lett Appl Microbiol* 2002; 35: 272-275.
40. Nelson TS, Kirby LK, Beasley JN, Johnson ZB, Ciegler A. The effect of drying method and storage time on citrinin activity in corn. *Poultry Sci* 1985; 64: 464-468.
41. Berndt WO. Ochratoxin-citrinin as nephrotoxins. In GC Llewellyn & PCO' Rear (Eds.), *Biodeterioration Research 3*. New York, USA: Plenum Press. 1990; pp.55-56.
42. Bilgrami KS, Sinha SP, Jeswal P. Nephrotoxic effects of citrinin in mice (*Mus musculus*). *Proceeding of Indian National Science Academy*, 1988, B54: 35-37.
43. Hanika C, Carlton WW, Tuite J. Citrinin mycotoxicosis in the rabbit. *Food Chem Toxicol* 1983; 21: 487-493.
44. Chagas GM, Campello AP, Kluppel MLW. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. I. Effect on respiration, enzyme activities and membrane potential of renal cortical mitochondria. *J Appl Toxicol* 1992; 12: 123-129.
45. Chagas GM, Oliveira MBM, Campello AP, Kluppel MLW. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. II. Effects on respiration, enzyme activities and membrane potential of liver mitochondria. *Cell Biochem Funct* 1992; 10: 209-216.

46. Chagas GM, Oliveria MBM, Campello AP, Kluppel MLW. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. III. Effects on renal cortical and liver mitochondria swelling. *J Appl Toxicol* 1995; 15: 91-95.
47. Nishijima M. In H. Kurata & Y. Ueno (Eds.), *Toxigenic fungi*. Amsterdam, the Netherlands, Elsevier, 1984; pp. 172-181.
48. Lepom P. Simultaneous determination of the mycotoxins citrinin and ochratoxin A in wheat and barley by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1986; 355(1): 335-339.
49. Vazquez BII, Fente C, Franco C, Cepeda A, Prognon P, Mahuzier G. Simultaneous high-performance liquid chromatographic determination of ochratoxin A and citrinin in cheese by time-resolved luminescence using terbium. *J Chromatogr A* 1996; 727: 185-193.
50. Vrabcheva T, Usleber E, Dietrich R, Martlbauer E. Cooccurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy. *J Agr Food Chem* 2000; 48: 2383-2488.
51. Glahn RP, Shapiro RS, Vena VE, Wideman RF, Huff WE. Effects of chronic ochratoxin A and citrinin toxins on kidney function of single comp white leghorn pullets. *Poultry Sci* 1989; 68(9): 1205-1211.
52. Kitabatake N, Trivedi AB, Doi E. Thermal decomposition and detoxification of citrinin under various moisture conditions. *J Agr Food Chem*, 1991; 39(12): 2240-2244.
53. Trivedi AB, Doi E, Kitabatake N. Toxic compounds formed on prolonged heating of citrinin under watery conditions. *J Food Sci* 1993; 58(1): 229-231.
54. Trivedi AB, Hirota M, Doi E, Kitabatake N. Formation of a new toxic compound, citrinin H1, from citrinin on mild heating in water. *J Chem Soc Perk T1* 1993; 2167-2171.
55. Hirota M, Menta AB, Yoneyama K, Kitabatake N. A major decomposition product, citrinin H2, from citrinin on heating with moisture. *Biosci Biotech Bioch* 2002; 66(1): 206-210.
56. Shu PY, Lin CH. Simple and sensitive determination of citrinin in *Monascus* by GC-selected ion monitoring mass spectrometry. *Anal Sci* 2002; 18(3): 283-287.
57. Thust R, Kneist S. Activity of citrinin metabolized by rat and human microsomal fractions in clastogenicity and SCE assays on Chinese hamster V79-E cells. *Mutat Res* 1979; 67: 321-330.

58. Wurgler FE, Friederich U, Schlatter J. Lack of mutagenicity of ochratoxin A and B, citrinin, patulin and cneistine in *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res* 1991; 261:209-211.
59. Martin W, Lorkowski G, Creppy EE, Dirheimer G. Action of citrinin on bacterial chromosomal and plasmid DNA in vivo and in vitro. *Appl Environ Microb* 1986; 52:1273-1279.
60. Pfeiffer E, Gross K, Metzler M. Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin. *Carcinogenesis* 1998; 19:1313-1318.
61. Jeswal P. Citrinin-induced chromosomal abnormalities in the bone marrow cells of *Mus musculus*. *Cytobios* 1996; 86:29-33.
62. Arai M, Hibino T. Tumorigenicity of citrinin in male F344 rats. *Cancer Lett* 1983; 17:281-287.
63. Liu BH, Yu FY, Wu TS, Li SY, Su MC, Wang MC, Shih SM. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicol Appl Pharm* 2003;191:255-263.
64. Lorkowski G, Creppy EE, Beck G, Dirheimer G, Rösenthaller R. Inhibitory action of citrinin on cultured hepatoma cells. *Food Cosmet Toxicol* 1980; 18:489-491.
65. Wasternack C, Weisser J. Inhibition of RNA- and DNA-synthesis by citrinin and its effects on DNA precursor-metabolism in V79-E cells. *Comp Biochem and Phys B* 1992; 101: 225-230.
66. Evans HJ. Molecular mechanisms in the induction of chromosome aberrations, in: D.Sobels(Eds), *Progress in genetic toxicology*, Elsevier North Holland Biomedical Pres, 1977; pp.57-74.
67. Savage JRK. Update on target theory as applied to chromosomal aberrations. *Environ Mol Mutagen* 1993; 22: 198-207
68. Evans HJ. Cytogenet. : Overview. *Prog Clin Biol Res* 1990; 340B: 301-323.
69. Dellarco L, Mavournin KH, Tice RR. Aneuploidy and health risk assessment:current status and future directions. *Environ Mutagen* 1985; 7: 405-424.
70. Guttenbach M, Schmid M. Exclusion of specific human chromosomes into micronuclei by 5-azactidine treatment of lymphocyte cultures. *Exp Cell Res* 1994; 211: 127-132.
71. Natarajan AT, Obe G. Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: cytogenetic assays, in: J.A.Heddele (ed.), *Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology*, Academic press, New York, 1982; pp.171-213.

72. Schmind W. The micronucleus test. *Mutat Res* 1975; 31: 9-15.
73. Hedle JA. A rapid in vivo test for chromosome damage. *Mutat Res* 1973; 18: 187-192.
74. Fenech M, Morley AA. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios* 1985; 43: 29-36.
75. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronucleus method in human lymphocytes. *Mutat Res* 1985; 147: 29-36.
76. Fenech M, Morley AA. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low-dose x-irradiation. *Mutat Res* 1986; 161: 193-198.
77. Carter SB. Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature* 1967; 213: 261-264.
78. Masunaga S, Ono K, Abe M. A method for the selective measurement of the radiosensitivity of quiescent cells in solid tumours-combination of immunofluorescence staining to BrdU and micronucleus assay. *Radiat Res* 1991; 125: 243-247.
79. Odigiri Y, Takemoto K, Fenech M. Micronucleus induction in cytokinesis-blocked Mouse bone-marrow cells in vitro following in vivo exposure to X-irradiation and cyclophosphamide. *Env Mol Mutagen* 1994; 24: 61-67.
80. Degrassi F, Tanzarella C. Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: a new assay for the aneuploidy. *Mutat Res* 1988; 203: 339-345.
81. Thompson EJ, Perry PE. The identification of micronucleated chromosomes: a possible assay for aneuploidy. *Mutagenesis* 1988; 3: 415-418.
82. Farooqi Z, Darroudi F, Natarajan AT. Use of fluorescence in situ hybridisation for the detection of aneuploidy in cytokinesis-blocked Mouse splenocytes. *Mutagenesis* 1993; 8: 329-334.
83. Hando JC, Nath J, Tucker JD. Sex chromosomes, micronuclei and aging in women. *Chromosoma* 1994; 103: 186-192.
84. Parry EM, Henderson L, Mackay JM. Guidelines for testing of chemicals. Procedures for the detection of chemically induced aneuploidy: recommendations of a UK Environmental Mutagen Society working group. *Mutagenesis* 1995; 10 (1): 1-14.
85. Elhajouji A, Hummelen P, Van, Kirsch-Volders M. Indications for a threshold of chemically induced aneuploidy in vitro in human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 1995; 26: 292-304.

86. Fenech M, Neville S. Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes. *Env Mol Mutagen* 1992; 19(1): 227-236.
87. Zijno A, Marcon F, Leopardi P, Crebelli R. Simultaneous detection of X-chromosome loss and non-disjunction in cytokinesis-blocked human lymphocytes by in situ hybridisation with a centromeric DNA probe; implications for the human lymphocyte in vitro micronucleus assay using cytochalasin-B. *Mutagenesis* 1994; 9 (3): 225-232.
88. Elhajouji A, Tibakdi F, Kirsch-Volders M. Indication for thresholds of chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human lymphocytes. *Mutagenesis* 1997; 12: 133-140.
89. Schuler M, Rupa DS, Eastmont DA. A critical evaluation of centromeric labelling to distinguish micronuclei induced by chromosomal loss and breakage in vitro. *Mutat Res* 1997; 392: 81-95.
90. Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Cundari E, Hummelen P. Van. The in vitro micronucleus test: a multi-end-point assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat Res* 1997; 392: 19-30.
91. Fenech M, Crott J, Turner J, Brown S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and result for hydrogen peroxide. *Mutagenesis* 1999; 14 (6): 605-612.
92. Kirsch-Volders M. (Ed). The CB in vitro Micronucleus Assay in Human Lymphocytes. Special Issue, *Mutat Res* 1997; 392: Special Issue (1,2).
93. Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardeme M, Albertinin S, Eastmond D, M.Fenech, Ishidate M, Lorge E, Norppa H, Surrales J, Hude W. Von der, Wakata A. Report from the in vitro micronucleus assay working group, Washington International Workshop on Genotoxicity Test Procedures. (25-26 March 1999) 2000.
94. Fenech M, Rinaldi J, Surrales J. The origin of micronuclei induced by cytosine arabinoside and its synergistic interaction with hydroxyurea in human lymphocytes. *Mutagenesis* 1994; 9(3): 273-277.
95. Surrales J, Carbonell E, Marcos R, Degrassi F, Antoccia A, Tanzarella C. A collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* 1992; 7 (6): 407-410.

96. Surrales J, Xamena N, Creus A, Morcos R. The suitability of the micronucleus assay in human lymphocytes as a new biomarker of excision repair. *Mutat Res* 1995; 341(12): 43-59.
97. Wakata A, Sasaki MS. Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells: comparison with types and rates of chromosome aberrations. *Mutat Res* 1987; 190: 51-57.
98. Prosser JS, Moquet JE, Lloyd DC, Edwards AA. Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes. *Mutat Res* 1988; 199: 37-45.
99. Lindholm C, Norpa H, Hayashi M, Sorsa M. Induction of micronuclei and anaphase aberrations by cytochalasin-B in human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 1991; 260: 369-375.
100. Minissi S, Gustavino B, Degrassi F, Tanzarella C, Rizzoni M. Effect of cytochalasin-B on the induction of chromosome missegregation by colchicine at low concentrations in human lymphocytes. *Mutagenesis* 1999; 14: 43-49.
101. Fenech M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res* 1997; 392: 11-18.
102. Kalweit S, Utesch D, Hude W, Von der Madle S. Chemically induced micronucleus formation in V79 cells-comparison of three different test procedures. *Mutat Res* 1999; 439(2): 183-190.
103. Matsushima T, Hayashi M, Matsuoka A, Ishidate M. Jr, Miura KF, Shimizu H, Suzuki Y, Morimoto K, Ogura H, Mure K, Koshi K, Sofuni T. Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis* 1999; 14(6): 569-580.
104. Fenech M. Mathematical model of the in vitro micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not scored specifically in binucleated cells or cells that have completed one nuclear division. *Mutagenesis* 2000; 15 (4): 329-336.
105. Vig BK, Swearngin SE. Sequence of centromere separation: kinetochore formation in induced lagging end micronuclei. *Mutagenesis* 1986; 1: 193-198.
106. Earnshaw WC, Migeon BR. Three related centromere proteins are absent from the inactive centromere of a stable dicentric chromosome. *Chromosoma* 1985; 92: 290-296.
107. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 2000; 455: 81-95.

108. Umegaki K, Ikegami S, Inoue K, et al. Beta-carotene prevents X-ray induction of micronuclei in human lymphocytes. *Am J Clin Nutr* 1994; 59: 409-412.
109. Balasem AN, and Ali AS. Establishment of dose-response relationships between doses of CS-317  $\gamma$ -rays and frequencies of micronuclei in human peripheral blood. *Mutat Res* 1991; 259: 133-138.
110. Kiso T, Fujita K, Ping X, Tanaka T, Taniguchi M. Screening for microtubule-disrupting antifungal agents by using a mitotic-arrest mutant of *Aspergillus nidulans* and novel action of phenylalanine derivatives accompanying tubulin loss. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(5): 1739-1748.
111. Sinha RK, Dubey A, Sinha KK. Cytotoxic effect of citrinin on relative division rate of *Allium-cepa* root-cells. *Lett Appl Microbiol* 1992; 14 (3): 118-120.

## ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Tomarza'da doğdu. İlkokulu Mehmet Ali Bakkaloğlu İlkokulu'nda, Ortaokulu Gözübüyük Ortaokulu'nda, Lise tahsilini Kayseri Lisesi'nde tamamladı. 1997 yılında Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünü kazandı. 2001 yılında bu bölümden mezun oldu. 2002 yılının güz döneminde Tıbbi Biyoloji bölümünün açmış olduğu Yüksek Lisans sınavını kazanarak aynı bölümde yüksek lisans eğitime başladı. Ders döneminden sonra "İnsan Kan Lenfositlerinde Sitrininin Mikronükleus Sıklığı ve Mitotik İndeks Üzerine Etkilerinin Araştırılması" isimli yüksek lisans tezini hazırladı.