

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**FORMİK ASİT'İN KARDEŞ KROMATİD DEĞİŞİM (KKD=SCE)
ORANINA ETKİLERİNİN İNSAN PERİFERAL LENFOSİT KÜLTÜRÜNDE
İNCELENMESİ**

Duygu DEMİRCİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Süleyman GÜL

MAYIS-2013

KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans öğrencisi Duygu DEMİRCİ' nin Doç. Dr Süleyman Gül danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı “**Formik Asit’in Kardeş Kromatid Değişim (KKD=SCE) Oranına Etkilerinin İnsan Periferik Lenfosit Kültüründe İncelenmesi**” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy.. **birliği**..... ile kabul edilmiştir.

27/05/2013

Adı ve Soyadı

İmza

Başkan: Doç. Dr. Süleyman GÜL

Üye: Doç. Dr. Fikret AKDENİZ

Üye: Doç. Dr. Hasan ORAL



Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../20.. gün ve/.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.....

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji anabilim dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışmanın tez konusu olarak seçiminde, yürütülmesinde yol gösteren, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen, gerekli laboratuvar olanaklarını sunan, sayın hocam, Doç. Dr. Süleyman GÜL' e, laboratuvar çalışmalarımnda her zaman yanımda olan yüksek lisans öğrencisi Evren ULUDAŞ' a ve Nilüfer GÜNEŞ' e teşekkürlerimi bir borç bilirim. Ayrıca bana her zaman destek olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kars, 2013

Duygu DEMİRCİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
RESİMLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER VE TABLOLAR DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Kromozomlar	3
2.1.1 Kromozomların Yapısı ve Morfolojileri Hakkında Genel Bilgi	3
2.1.2 Kromozomları Oluşturan Özel Bölgeler	7
2.2 Mutasyonlar	9
2.2.1 Gen Mutasyonları	10
2.2.2 Kromozom Mutasyonları	10
2.2.3 Genom Mutasyonları	12
2.2.4 Mutajen Etkenler	13
2.3 Genotoksisite	13
2.3.1 Kardeş Kromatid Değişimi	14
2.4 Formik Asit	16
2.4.1 Metanol Zehirlenme Belirtileri	17
2.4.2 Formik Asidin Kullanım Alanları	18
2.4.3 Gıda Katkı Maddeleri	19

3.MATERYAL VE METOT	21
3.1 Mitomisin-C (MMC) 2 mg (Sigma, M 0503)	21
3.1.1 Mitomisin-C (MMC)' nin Özellikleri	21
3.1.2 Mitomisin-C (MMC)'nin Kullanım Alanları	21
3.2 Kullanılan Kimyasal Maddelerin Çözeltilerinin Hazırlanması	22
3.2.1 Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler	22
3.2.2 Formik Asit	23
3.2.3 Mitomisin- C (MMC) Çözeltisinin Hazırlanması	23
3.2.4 Sorensen Tamponunun (Sorensen Buffer) Hazırlanması	24
3.2.5 Boyanın Hazırlanışı	24
3.2.6 Kromozom Medyumu (Besi Yeri)	24
3.2.7 Kolsişin	25
3.2.8 Hipotonik Çözelti	25
3.2.9 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)	25
3.2.10 Fiksatif	25
3.2.11 Giemsa	26
3.3 Kullanılan Deney Ekipmanları	26
3.3.1 Hassas Terazî	26
3.3.2 Santrifüj	26
3.3.3 Mikroskop	26
3.3.4 Etüv	26
3.3.5 Deney Ekipmanları	26
3.3.6 Sarf Malzemeler	27
3.4 Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre	

İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması ve Boyanması	27
3.4.1 Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması	27
3.4.2 Preparatların Boyanması	29
3.4.3 Mikroskopik inceleme	29
3.4.4 KKD Sayısının Saptanması	30
3.4.5 Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi=PI) Saptanması	30
3.5 İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi	33
4. BULGULAR	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	45
6. KAYNAKLAR	48
7. ÖZGEÇMİŞ	54

ÖZET

Formik asit, bitkiler, arılar, toprak, araçlar, gübre yanması ve fotokimyasal reaksiyonlar gibi çeşitli kaynaklarca üretilen ve çevrede yaygın bulunan, ayrıca çeşitli endüstriyel ve evsel kullanıma sunulmuş, renksiz ve güçlü bir asit özelliği taşıyan kimyasal bir maddedir. Bu çalışmanın amacı formik asit'in kardeş kromatid değişim oranına etkilerinin, insan periferel lenfosit kültüründe in vitro olarak araştırılmasıdır. İnsan periferel kanında bulunan lenfosit hücreleri kullanılarak hazırlanan lenfosit kültürü, formik asit'in 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml ve 20 µg/ml'lik dozları ile 24 saat etkileşime bırakılmıştır. Formik asit uygulanmış deneme grupları negatif kontrol ve pozitif kontrol ile kıyaslandığında, uygulanan formik asit dozlarının kardeş kromatid değişim oranında artışa yol açtığı belirlenmiştir. Ayrıca formik asitin dozlarının artışı ile hücre replikasyon indeksinin düştüğü, KKD'nin arttığı ve KKD-replikasyon indeksi arasında negatif bir korelasyon ($r = -0.98$) olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Formik asit, lenfosit kültürü, kardeş kromatid değişimi (KKD), replikasyon indeksi

ABSTRACT

Formic acid, plants, bees, soil, tools, fertilizer, produced by sources such as combustion and photochemical reactions commonly found in the environment, as well as presented in a variety of industrial and domestic use, which is colorless and feature a strong acid is a chemical substance. The purpose of the study was to investigate of the effects of formic acid by sister chromatid exchange, the in vitro culture of human peripheral lymphocytes. Human blood lymphocyte cells have been exposed to formic acid 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml ve20 µg/ml for 24-hours. Applied formic acid treatment groups compared with negative control and positive control, the applied doses of formic acid to lead to an increase in the rate of sister chromatid exchange. Furthermore, it has been observed that decrease of cell replication index, SCE increase with formic acid dose increase and a negative correlation between SCE and replication indeks ($r=-0,98$).

Keywords: Formic acid, lymphocyte culture, the sister chromatid exchange (SCE), replication index

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μM	Mikromolar
μl	Mikrolitre
μg	Mikrogram
MMC	Mitomisin-C
Rpm	Devir Sayısı
KKD	Kardeş kromatid değişimi
BrdU	5'-Bromo-2'-deoxyuridine

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1.1 İnsan kromozomu'nun elektron mikroskobu görüntüsü ve kısımları	4
Şekil 2.1.2 Normal insan karyotipi	6
Şekil 2.1.3 Kromozomların yapısı, a) Dıştan görünüşü, b) İçten görünüşü	7
Şekil 2.1.4 Sentromerin yerine göre kromozom tipleri, A) Metasentrik, B) Submetasentrik, C) Akrosentrik, D) Telosentrik	9
Şekil 2.3.1 BrdU' ya maruz bırakılmış kromozomda KKD gösterimi	15
Şekil 2.4.1 Formik asit	16
Şekil 3.4.4.1 Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi	30
Şekil 3.4.5.1 Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdU) ve Deoxyuridin (dU)'in kimyasal yapıları.	31
Şekil 3.4.5.2 BrdU'in DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. Mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması	33

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa No
Resim 4.1 Sağlıklı bir bireye ait metafaz plağı mitoz 1	34
Resim 4.2 Sağlıklı bir bireye ait metafaz plağı mitoz 2	34
Resim 4.3 Sağlıklı bir bireye ait metafaz plağı mitoz 3	35
Resim 4.4 3 KKD' nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı	36
Resim 4.5 Çoklu KKD' nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı	36
Resim 4.6 6 KKD' nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı	37
Resim 4.7 5 KKD' nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı	37
Resim 4.8 4 KKD' nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı	38
Resim 4.9 3 KKD'nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı	38
Resim 4.10 3 KKD' nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı	39

ÇİZELGELER VE TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 2.1.1 Bazı türlerin diploid kromozom sayıları	5
Çizelge 4.1 Formik asit'in farklı dozlarıyla etkileşime giren insan lenfosit kültürü hücrelerindeki KKD oranları	41
Çizelge 4.2 Formik asit'in farklı dozlarıyla etkileşime giren insan lenfosit kültürü hücrelerinin Replikasyon indeksi	43
Çizelge 4.3 Formik asit'in farklı dozlarıyla replikasyon indeksi (RI) arasındaki regresyon	44
Tablo 4.1 Kontrol ve Formik Asit Gruplarının İnsan Lenfosit Kültürü Hücrelerinde Kardeş Kromatid Değişimi (%)	40
Tablo 4.2 Kontrol ve Deney Gruplarının İnsan Lenfosit Hücrelerinde Replikasyon İndeksi	42

1.GİRİŞ

Günümüzde tüm canlı hayatı tehdit eden çevresel tehlikeler değişerek farklı boyutlar kazanmaktadır. Yeryüzünde insanların kullanımına sunulan 2 milyon çeşitten fazla kimyasal madde bulunmaktadır ve her yıl ortalama 2000 ila 4000 yeni kimyasal madde bu sayıya eklenerek kullanıma sunulmaktadır [1]. Bu maddelerin gerekenden fazla, uzun süreli ve yanlış kullanılmaları sonucunda maddeye maruz kalan insanlarda ciddi hastalıkların oluşmasının yanı sıra kanser vakalarının artmasına sebep olduğu da yapılan çalışmalar sonucunda kanıtlanmıştır. Bu kimyasal maddeler insanlarda tedavi edilebilen geçici rahatsızlıklar yapabildikleri gibi canlının yaşamı için ciddi tehlike arz eden ve DNA da oluşturdukları geri dönüşümsüz hasarlar sonucu kalıtsal yapıda kalıcı, tedavisi olmayan hasarların da ortaya çıkmasına sebep olmaktadır [2].

Bireyin kalıtsal özelliklerinin ortaya çıkmasını sağlayan genetik şifre herhangi bir nedenden dolayı (radyasyon, ultraviyole, X ışınları, bazı ilaçlar ve kimyasallar vb.) yapısını kaybederek bozulabilmektedir. Bu durum sonucunda DNA' nın sentezlediği enzim veya protein bozulur. Bu bozulma sonucunda canlının proteinden dolayı yapısı, enzimden dolayı metabolizması değişime uğrar. Genetik metaryalimizde meydana gelen ve gen rekombinasyonunun dışında herhangi bir başka nedenle ve ani olarak gelişen değişimlere mutasyon adı verilmektedir. Mutasyon terimi; genlerdeki ve kromozom sayısındaki değişimleri kapsar. Genetik maddenin yapısında, miktarında ya da organizasyonundaki değişimleri belirtmekte kullanılmaktadır. Bir gen mutasyon geçirdikten sonra kararlı bir hal alır ve eski haline geri dönmek için herhangi bir eğilim göstermez [3].

Sanayinin ve teknolojinin hızla gelişmesiyle birlikte ,kullanıma sunulmak amacıyla üretilen yeni ilaçlar, kimyasallar, tarım ilaçları, gıda katkı maddeleri ve bunların atıkları canlıların genetik yapısında mutasyonların oluşmasına neden olmaktadır [4]. Bu kimyasal maddelerden biri olan formik asit çeşitli endüstriyel ve evsel kullanıma sunulmuş, renksiz ve zayıf bir organik asit özelliği taşıyan kimyasal bir maddedir [5,6].

Ayrıca hızlı bir PH azalması sağlar ve aynı zamanda mikrobiyal aktiviteyi inhibe etmesi sebebiyle etkili bir katkı maddesi olarak kullanımında söz konusudur [7,8]

Genetik maddede oluşan hasarların tespitinde, genotoksisite testleri adı altında toplanan, kimyasal ve fiziksel ajanların mutajenitelerinin belirlenmesi ve bu ajanların karsinojenik potansiyellerinin tahmin edilebilmesinde kullanılan testler mevcuttur. Bu testlerden en yaygın olanları; Ames testi, Comet testi, Kromozom anormallikleri (KA) testi, Kardeş kromatid değişimi (KKD) testi ve Mikronükleus (MN) testi'dir [9].

1970 yılından sonra geliştirilen, en çok kabul gören ve en hassas, kısa süreli kanserojenite ve mutajenite testi olan Kardeş Kromatid Değişimi (KKD=SCE=Sister Chromatid Exchange) yöntemi, bir kromozomdaki kardeş kromatidler arasındaki simetrik segment değişimini ifade eder [10-12].

KKD (=SCE) yöntemi, genetik hastalıkların teşhisinde son derece hassas sonuçlar göstermesinin yanı sıra in vitro ve in vivo deneylerde kullanılarak bir çok kimyasal maddeyle birlikte , virüslerin ve radyasyonun da çok sayıda etkilerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır [11,13].

Bu çalışmanın amacı, farklı konsantrasyonlardaki Formik Asit'in, insan periferik lenfosit kültürü hücrelerine 24 saat süreyle uygulanması sonucu kültür hücreleri üzerindeki Kardeş Kromatid Değişim (SCE=KKD) Oranına etkilerinin gözlemlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kromozomlar

Canlı organizmaların üreme, gelişme, adaptasyon, protein sentezi ve diğer hücresel olaylarının gerçekleşmesinden ve ayrıca tüm bu fonksiyonların sürekliliği için gerekli olan genetik bilginin depolanması, bir sonraki kuşağa aktarılması ve kullanımından sorumlu olan genetik materyal, ilk kez 1869 yılında Friedrich Miescher tarafından tespit edildi.

1953 yılında James Watson ve Francis Crick tarafından genetik yapısı açıklanan DNA molekülü, hücrelerdeki genetik materyal olarak tanımlanmıştır. DNA molekülü beş karbonlu bir şeker olan deoksiriboz, azotça zengin olan pürin (Adenin= A, Guanin= G) ve pirimidin (Timin=T, Sitozin= C) bazlarına ilave olarak fosfat grubundan oluşan polimerik bir makro moleküldür. DNA molekülü, 5¹ ucundan 3¹ ucuna doğru şeker-fosfat omurgasından oluşan iki zincirin 'double helix' de denilen, anti paralel bir şekilde sarılması ile meydana gelmiş çift sarmal bir yapıdır. Normal fizyolojik şartlara sahip hücrelerde genelde sağa dönümlü olan B-DNA formunda olan DNA zinciri, nadiren de olsa sola dönümlü Z-DNA formunda bulunabilir. İnterfaz adı verilen safhada DNA' nın arjinin ve lizince zengin olan bazik histon proteinleri ile bağlanması sonucu kromatin denilen yapı oluşur. Mitoz ve mayoz bölünme sırasında kromatinler, kromozom denilen yapıya dönüşürler. Bir haploid memeli hücresi 23 çift kromozomdan yani 3×10^9 nükleotid çiftinden oluşur. Bu 23 çift kromozomdan 22 çifti otozomal kromozomları, son çift ise eşey (X,Y) kromozomlarıdır [14-17].

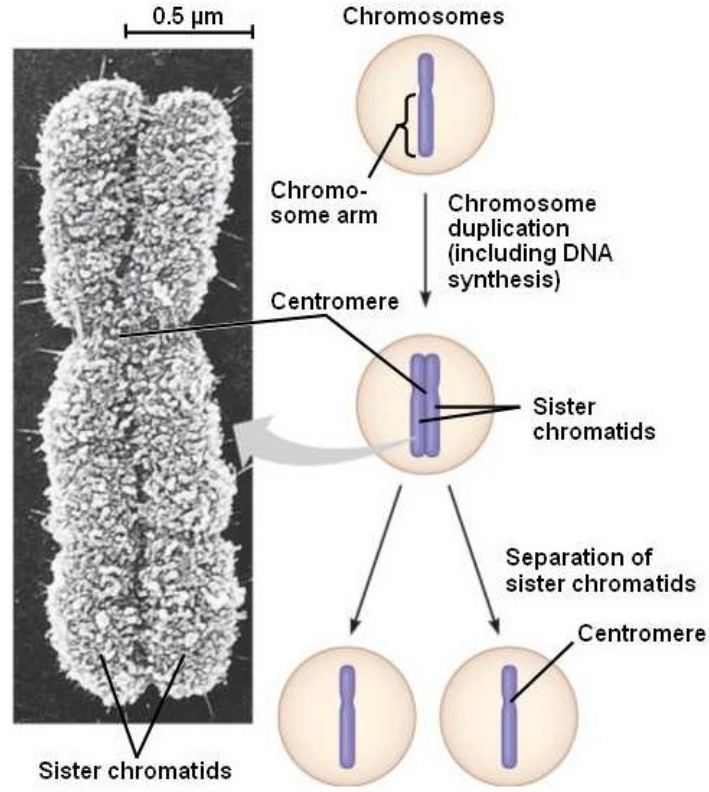
2.1.1 Kromozomların Yapısı ve Morfolojileri Hakkında Genel Bilgi

1888 yılında, 'Colored Thread' olarak bilinen ve yunanca bir kelimeden köken alan ' kromozom' terimi W.Waldeyer tarafından bilim dünyasına tanıtılmıştır [18].

Hücre, bölünme sürecinde değilken şekilsiz ve granüler bir yapıda olan kromatin adı verilen genetik materyali oluşturur ve hücre bölünmeye başladığı sırada kromatinler sıkışık ve kitlesel bir yapı oluşturarak kromozomları meydana getirirler [20-22]

En iyi şekilde metafaz ya da prometafaz safhasında analiz edilebilen kromozomlar, sentromer pozisyonu, uzunluk, büyüklük ve ' banding pattern' diye isimlendirilen koyu ve açık bantların düzenlenme biçimine göre birbirlerinden ayrılırlar [18].

Koyu boyanan bölgelere heterokromatin denilirken açık boyanan bölgelere ökromatin adı verilir. Sıkıca katlanmış kromozom ipliklerinden meydana gelen heterokromatin bölgeler genetik olarak inaktif bir haldedirler [21-23].



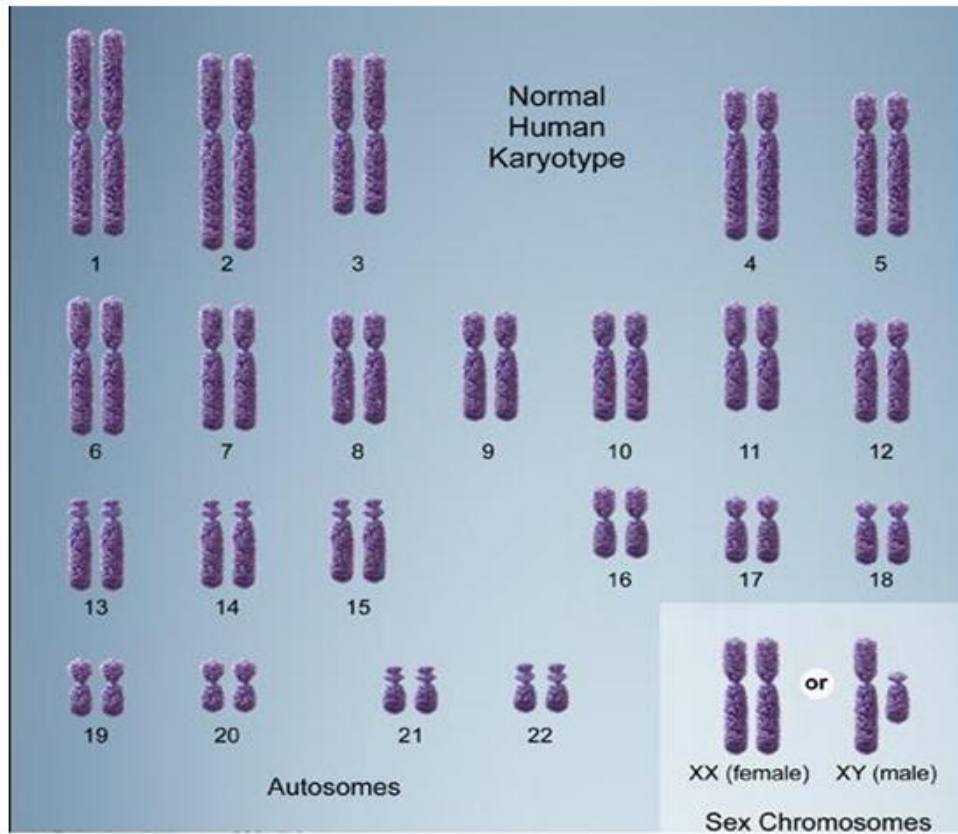
Şekil 2.1.1 İnsan kromozomu'nun elektron mikroskobu görüntüsü ve kısımları [25].

Kromozomun sayısı, şekli ve yapısı her canlı türü için kendine özgüdür ve tür içinde sabittir. Canlı türünün organizasyon derecesi ve kromozom sayısı arasında bir bağlantı bulunmamaktadır. Bir kromozomun çapı 0,2 ile 2 µm, uzunluğu 0,2 ile 50 µm arasında değişmektedir. İnsan kromozomları ise genellikle 4-6 µm uzunluğundadır [21-24].

Denek Adı - Tür adı	Diploid No
İnsan <i>Homo sapiens</i>	46
Şempanze <i>Pantroglodytes</i>	48
Rhesus maymunu <i>Macaca mulatta</i>	42
Sığır <i>Bos taurus</i>	60
Köpek <i>Canis familiaris</i>	78
Kedi <i>Felis domestucus</i>	38
At <i>Equus caballus</i>	64
Fare <i>Mus musculus</i>	40
Sıçan <i>Rattus novergicus</i>	42
Tavşan <i>Oryctolagus cuniculus</i>	44
Kurbağa <i>Rana pipiens</i>	26
İpek böceği <i>Bombyx mori</i>	56
Sirke sineği <i>Drosophyla melanogaster</i>	8
Karasinek <i>Musca domestica</i>	12
Balarısı <i>Apis mellifera</i>	32
Soğan <i>Allium cepa</i>	16
Arpa <i>Hordeum vulgare</i>	14
Buğday <i>Triticum avestium</i>	42
Mısır <i>Zea mays</i>	20
Pamuk <i>Gossypium hirsutum</i>	52
Domates <i>Lycopersicum esculentum</i>	24
Tütün <i>Nicotiana tabacum</i>	48
Fasulye <i>Phaseolus vulgaris</i>	22
Bezelye <i>Pisum sativum</i>	14

Çizelge 2.1.1 Bazı türlerin diploid kromozom sayıları [23].

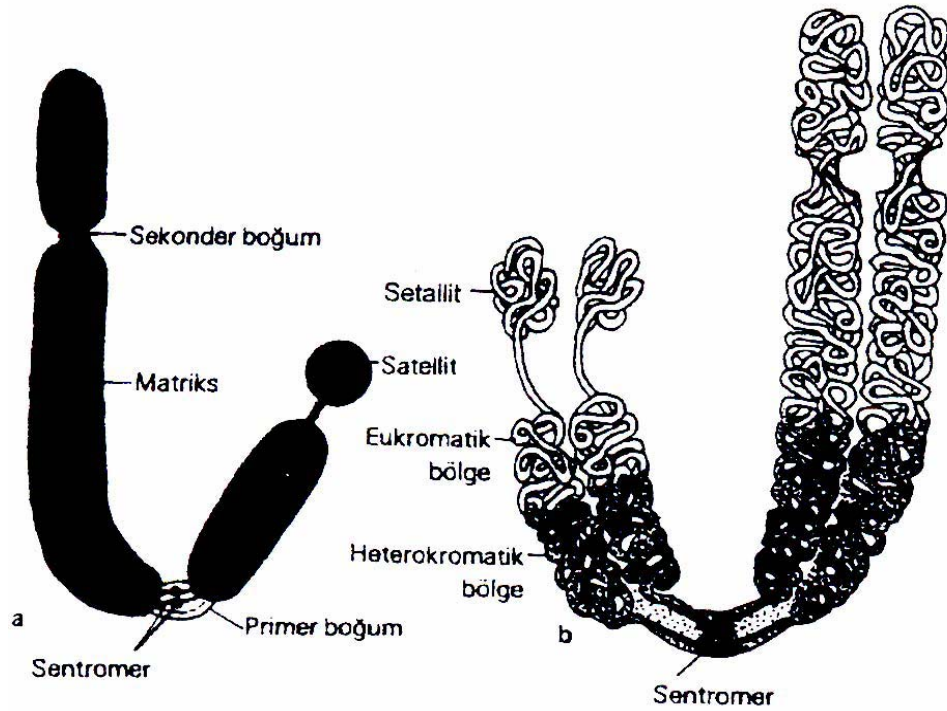
Karyotip; bir türün, bireyin veya bir hücrenin kromozomal toplamına verilen addır ve her tür için karakteristiktir. Metafaz safhasındaki kromozomların morfolojilerine göre ışık mikroskopundaki görüntüleri karyotip ile ifade edilmektedir. Tüm kromozomların homolog kromozomlar şeklinde gösterilmesini ise ‘ karyogram ’ ifade eder. Karyogramda, göreceli uzunluklarına ve sentromer şekillerine göre düzenlenmiş olan homolog kromozom çiftlerinden biri dişi bireyden diğeri ise erkek bireyden gelmektedir. İnsanlarda 46 kromozom yani 23 çift kromozom bulunduğunu, bunlardan ilk 22 çiftin otozomal kromozomlar , son çiftin ise eşey kromozomlar olduğunu belirtmiştik. Bu son çift kromozom erkeklerde XY, dişilerde XX şeklindedir. Karyotip gösterimleri 46,XX ve 46,XY şeklindedir. Bu şekilde gösterimde virgül öncesi toplam kromozom sayısını belirtirken, virgül sonrası eşey kromozomlarını ifade eder [18].



Şekil 2.1.2 Normal insan karyotipi [25].

2.1.2 Kromozomları Oluşturan Özel Bölgeler

Metafaz evresindeki kromozomların iyi bir şekilde incelenebilmelerinin ve gözlemlenebilmelerinin sebebi kromozomların, bu evrede silindir şeklinde görülen en kısa ve en kalın hallerinde olduklarından dolayı tipik şekillerinin görülmesidir. Bu evredeki bir kromozomda genel olarak primer boğum, sekonder boğum, telomer, sentromer ve satelit gibi kısımları ayırt edilebilir [26,27]



Şekil 2.1.3 Kromozomların yapısı, a) Dıştan görünüşü, b) İçten görünüşü [26].

Sentromer: Kinetokor denilen küçük bir granül içeren ve primer boğumda yer alan, spesifik proteinlerin bağlandığı DNA dizilerinden oluşan, parlak açık bölgeye verilen addır. Sentromerler kromozomların iç ipliklerine bağlanmasında ve kutuplara çekilmesinde görev aldıklarından dolayı sentromeri olmayan kromozomlar hücre bölünmesine katılamazlar ve yok olurlar [28].

Kromatid : Kromatinlerin protein iskelete sarılması ile oluşurlar, ortada bulunan sentromere göre kromozomların kolları olarak görünürler. Sentromer, kromatidleri uzun(p) ve kısa(q) kollara ayırır [15]

Primer boğum: kromozomlarda sentromerin bulunduğu daralma bölgesine verilen addır. Primer boğumlar, sekonder boğumlardan kromozom kollarının açılması ile ayrılırlar [26-30].

Satellit: Bazı kromozomlarda, DNA'dan yapılmış bir uçta yer alan ince bir filament ile kromozoma bağlanmış, 10 kadar baz çifti taşıyan, yuvarlak veya silindirik şekilde bulunan yapıya verilen addır. Satellit bulunduran kromozomlara SAT-Kromozom adı verilir ayrıca satellitin çapı kromozom çapına eşittir [27-30].

Telomerler: Kromozom uçlarının bozulmadan kalmasını sağlayarak, kromozomların diğer kromozomlara yapışmasını ve kendi üzerine katlanmasını engelleyerek kromozoma kararlılık kazandırır. Bu durum telomerlerin bir polariteye(kutuplaşmaya) sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Telomerler özel DNA dizilerinden oluşurlar ve yaşlanmaya bağlı olarak kısalırlar, fakat bu kanser hücrelerinin telomerik dizileri için geçerli değildir [15, 27,30].

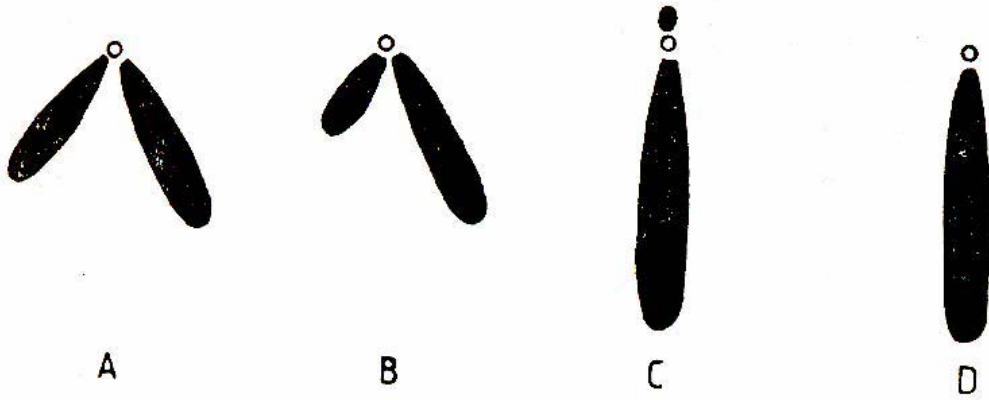
Kromozom Şekilleri

Kromozom şekilleri “ Denver” klasifikasyonuna göre sınıflandırılmaktadır.

- 1) **Metasentrik (medium) kromozom:** Kromozom kollarının birbirine eşit olduğu bu yapıda sentromer kromozomun merkezindedir.
- 2) **Submetasentrik (submedian) kromozom:** Kromozom kollarının birbirine eşit olmadığı bu yapıda ise sentromer kromozomun merkezinde bulunmaktadır.
- 3) **Akrosentrik kromozom:** Kromozom kollarının arasındaki uzunluk farkının en fazla olduğu durumda verilen addır. Sentromer kromozomun uç kısmına çok yakın bir bölgededir.

- 4) **Telosentrik kromozom:** Kromozomun yalnızca uzun kollarının olduğu bu yapıda sentromer kromozomun en uç kısmında bulunur. İnsanlarda bu kromozom tipi bulunmamaktadır.

İki insanın DNA dizileri arasındaki fark yaklaşık % 0.5' dir. Bu küçük fark tüm evrendeki genetik çeşitliliği sağlamaktadır. Canlı DNA' sında ki nükleotid dizilerinde meydana gelen değişimler eğer canlının fenotipine etki ediyorsa mutasyon, genetik çeşitliliğe yol açıyorsa polimorfizm adını alır [15].



Şekil 2.1.4 Sentromerin yerine göre kromozom tipleri, A) Metasentrik, B) Submetasentrik, C) Akrosentrik, D) Telosentrik [21].

2.2 Mutasyonlar

Bir canlı türünün kendine özgü olan kalıtsal metaryalinin, miktarında, içeriğinde veya organizasyonunda, gen rekombinasyonu dışında oluşan ani ve kalıtsal değişimlere mutasyon denir. Kısaca kromozomlarda veya genlerde meydana gelen değişimler olarak adlandırılabilir [21,31].

Mutasyonlar doğada kendiliğinden meydana gelebilirken, mutajen adı verilen fiziksel ve kimyasal etkenler yüzünden de oluşabilirler. DNA' nın tamir mekanizması tarafından onarılmaya çalışılan bu mutajenlerin sebep olduğu mutasyonlar, bazı durumlarda tamir mekanizmasının da mutasyona uğraması yüzünden onarılamaz. Mutasyonların tamamı zararlı olarak değerlendirilmemelidir. Çünkü mutasyonlar aynı zamanda organizmanın gelişiminde, evriminde ve canlı çeşitliliğinde de önemli rol oynamaktadır [32].

Mutasyonlar meydana geliş mekanizmalarına göre üç grupta toplanabilir:

- Gen mutasyonları,
- Kromozom mutasyonları
- Genom mutasyonları.

2.2.1 Gen Mutasyonları

Gen mutasyonları, DNA molekülünde gen düzeyinde ortaya çıkan değişikliklere verilen addır. DNA'da gözlenen mutasyonlar genel olarak dört gruba ayrılır [31].

a) Uzunluk Mutasyonları: Genetik materyalde artma veya eksilmeler sonucu meydana gelen mutasyonlardır.

b) Nokta Mutasyonları: DNA seviyesinde veya protein seviyesinde kodonlar üzerinde etkili olabilen nokta mutasyonları, bir gende tek bir nükleotidin değişmesi sonucu meydana gelen mutasyonlardır..

c) Tersine Mutasyonlar: Mutant fenotiplerden yabancıl fenotipleri oluşturan mutasyonlara geri mutasyonlar denir. Yabancıl tiplerden anormal fenotipleri (mutant) oluşturan mutasyonlara ileri mutasyon denir.

d) Baskılayıcı Mutasyonlar: Bir gende ilk oluşan mutasyondan başka bir yerde ortaya çıkan ve ilk mutasyonun etkisini tersine çeviren ikinci mutasyona baskılayıcı mutasyon denir. [31].

2.2.2 Kromozom Mutasyonları

Kromozom mutasyonları kendiliğinden oluşan yapısal değişiklikler nedeniyle oluşabilirken aynı zamanda bir takım viral enfeksiyon, iyonize radyasyon ve bazı kimyasalların indüksiyonu sebebiyle de oluşabilirler. Kromatid ve kromozom kırığı, fragment oluşumu, disentrik kromozom, halka kromozomu, kardeş kromatidlerin birleşmesi, translokasyon, inversiyon, izokromozom, homolog kromozomlar arasında kromatidler arası değişim ve endoreduplikasyon şeklinde gözlenmektedirler [21,27,31].

a) Kromatid Kırığı: Bir kromozomun iki kromatidinden yalnızca birinde kırılma olur ve anafazda kromatidlerin kutuplara çekilmesi sonucu hücrelerden biri defisiyensli kromozom bulundurur.

b) Kromozom Kırığı: Bir kromozomun her iki kromatidinde aynı noktada kırılma olur. Bu durumda hücrelerin her ikisi de defisiyensli kromozom bulundurur.

c) Fragment: Kopmuş olan kromozom parçalarıdır. Metafaz plağı görüntüsünde kopmuş olduğu kromozomdan ayrı yerlerde bulunurlar.

d) Disentrik Kromozom: Kromozom kırığı meydana geldiği zaman, sentromer içeren parçanın kopuk uçlarının birleşmesi sonucu disentrik kromozomlar oluşur.

e) Kardeş Kromatidlerin Birleşmesi: Kromozom kırıklarının olduğu durumlarda yaralı kardeş kromatidlerin kırık olan uçlarının birleşmesidir. Mitozun anafazında bu kromatidler zıt kutuplara çekilirken kromozom köprüsü oluştururlar.

f) Halka Kromozomu: Bir kromozomun iki ucunda da meydana gelen kromozomal kopma sonucu oluşan yaralı uçların birleşmesi ile halka (Ring) kromozomlar oluşur. Bu kromozomların kardeş kromatidlerinin zıt kutuplara çekilmesi sonucu her bir hücrede bir halka kromozomu bulunur.

g) Translokasyon: Kromozomal bir kopmada kopuk olan bir uca homolog olmayan kromozomlardan başka bir kopuk parçanın yapışmasıdır. Translokasyona neden olan kromozom parçası yer değişimleri, tek taraflı veya karşılıklı olabilir.

h) İnversiyon: Bir kromozomun içinden kopan parçanın ters dönerek aynı yere yapışmasıdır. İnversiyon sonucunda kromozomdaki genlerin diziliş sırasında değişme meydana gelir.

ı) İzokromozom: Primer boğumda oluşan kromozomal bir kopma sonucu, kardeş kromatidlerin birleşmesidir. Böylece her iki kolu da birbirinin aynısı olan kromozomlar meydana gelir.

i) Kromozomun Kopup Enine Olarak Ters Dönmesi: Crossing-over'e benzer bir olaydır. Bu durum homolog olmayan parçalar arasında gerçekleşirse kromozomal yapıyı değiştirir.

j) Endoreduplikasyon: bölünmeyen hücrelerin DNA' sının tekrar replike olması sonucunda önceki kromozomun her bir kromatininde iki kromatidli birer kromozom oluşur. Ancak bu kromozomlar birbirinden ayrılmazlar. Endoreduplikasyon ise metafaz plağında bu birbirinden ayrılmayan kromozomların iki kromozom ve dört kromatitten oluşmuş yapılar şeklinde görülmelerine verilen addır [33-36]. DNA molekülünün tüm canlılarda benzer yapıda olması nedeniyle, canlı organizmaların bir grubu için genotoksik olan bir madde, diğer gruplar içinde genotoksik özelliğe sahiptir [37,38].

2.2.3 Genom Mutasyonları

Genom mutasyonları; öploidi ve anöploidi olmak üzere iki gruba ayrılır:

a) Öploidi: Organizmada, kromozomların hepsinin birden, sayılarının tam katlar halinde yükselmesi durumuna veya organizmada yalnız bir takım kromozomun bulunması olayına denir. Canlı türler içerisinde bazı bireylerin somatik hücrelerinde sadece bir takım kromozomun bulunmasına monoploidi, bu durumdaki bireylere de monoploid adı verilir. Döllenenmiş yumurtanın gelişmesiyle monoploidi oluşurken, bir takımdaki kromozomların sayılarının hepsinin birden ikiden fazla katlar halinde yükselmesi ile de poliploidi meydana gelir. Bireyin somatik hücrelerinde poliploidi oluşumunu sağlayan olay ise endopoliploidi adını alır. Bölünme yeteneğini kaybetmiş ve farklılaşmış hücrelerde bazen çekirdek zarı kaybolmadığı halde DNA'nın replike olması durumuna Endokinez denir. Bu olayın sonucunda 3n, 4n, 5n veya yüksek kat sayılı kromozomlara sahip bireyler oluşur. Bu bireyler de triploid, tetraploid, pentaploid gibi isimler alırlar [21,31].

b) Anöploidi: Hipoploidi ve hiperploidi olarak iki gruba ayrılarak incelenen bu olay bir takımdaki kromozomlardan bir veya bir kaçının sayısının değişmesine verilen addır.

Hipoploidi; monosomi ve nullisomi olarak adlandırılan iki farklı şekilde gerçekleşebilen ve genomdaki kromozom sayısının azalması olayına verilen addır. Monosomi, diploid bir bireyde sadece bir kromozomun eksik olması durumuyken, nullisomi, bir kromozomun homologuyla birlikte eksik olmasından dolayı bir kromozom çeşidinin hiç bulunmaması durumudur [21,39].

Hiperploidi veya polisomi; trisomi ve tetrasomi olmak üzere iki alt gruba ayrılan bu durumlarda bir takımdaki kromozomlardan birinin veya bir kaçının artması olayıdır. Trisomi, diploid bir canlıda bir kromozomun fazla bulunması ($2n+1$) durumuyken tetrasomi ise takımdaki kromozomlardan birinin 4 tane ($2n+2$) olmasıdır [21,39].

2.2.4 Mutajen Etkenler

Mutasyonlar meydana geldikleri türün sınırları dışına çıkmazlar ve çoğu zaman oluşan bu mutasyonlar canlının ölümüne sebep olurlar [40].

10^{-5} - 10^{-10} gibi düşük bir oranda da olsa kendiliğinden ortaya çıkabilen mutasyonlar aynı zamanda mutajen adı verilen çeşitli çevresel faktörler etkisiyle de oluşabilirler. Bu çevresel faktörler ise fiziksel mutajenler ve kimyasal mutajenler olmak üzere iki grupta toplanırlar [21].

S fazına bağlı olmayan klastojenler olarak bilinen fiziksel mutajenler; sıcaklık, manyetik ve elektriksel alan, UV, X, γ , proton ve nötron ışınlarıdır. Etkisini ise bir baz çiftinin yerini başka bir baz çiftinin alması şeklinde gösterir [21].

S fazına bağlı olan klastojenler olarak bilinen kimyasal mutajenlerin etkisi ise daimi değişiklikler şeklindedir. Bunların da; bazların kimyasal yapısını değiştiren kimyasal mutajenler (nitroz asidi- HNO_2 , hidroksilamin- NH_2OH , alkilleyici maddeler), çerçeve kaymasına yol açan kimyasal mutajenler (akridin boyaları) ve baz analogları olan kimyasal mutajenler olmak üzere üç çeşidi vardır [21].

2.3 Genotoksisite

Kimyasal ve fiziksel mutajenler DNA molekülünde birçok hasara sebep olabilirler. Bu hasarlardan bazıları hücrede bulunan özel mekanizmalar tarafından onarılır. Bazı durumlarda ise hücreyi ölümden kurtarmak için yapılan onarımda hata oluşabilir. Yaş, hastalık, beslenme ve ısı gibi etmenlerin olumsuz etkileriyle ya da onarım

mekanizmasının çalışmasını kontrol eden genlerde mutasyon oluşması nedeniyle DNA’da meydana gelen hasarlar onarılmayabilir. Bu durumun sonucunda o hücrede mutasyon oluşur. Oluşan mutasyon çeşitli bozuklukların ortaya çıkmasına neden olur. Kansere ve hücre ölümüne mutasyonun sonuçlarından bazılarıdır. Bazen de canlıda üstün karakterlerin ortaya çıkmasına neden olabilir, ancak genelde canlı için olumsuz olan özelliklerin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır [41].

Canlı DNA’sında oluşan hasarların yani mutasyonların tespitinde Ames testi, Comet testi, Kromozom anomalileri testi, Kardeş Kromatid Değişimi testi ve Mikronükleus testi kullanılmaktadır. Bu testler kimyasal ve fiziksel ajanların mutajenitelerinin belirlenmesinde ve bu ajanların karsinojenik potansiyellerinin tahmin edilmesinde kullanılırlar [9].

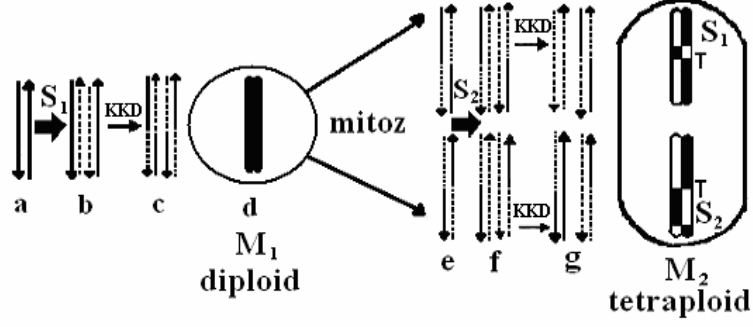
2.3.1 Kardeş Kromatid Değişimi

Bir kromozomun eş kromozom lokuslarında iki kromatid arasında meydana gelen ve kromozom morfolojisinde değişikliğe neden olmayan, karşılıklı segment değişimi olayına Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) denir. Klatojenite, genotoksisite ve genetik instabilitenin araştırılmasında kullanılan KKD testi sitogenetik bir yöntemdir ve KKD sıklığında gözlenen artış mutasyon ve kanser riskinin artışının göstergesi olarak kabul edilmektedir [42].

KKD değişiminden ilk defa, 1938 yılında somatik mısır hücreleri üzerinde yapılmış olduğu çalışmalarla Mc Clintock söz etmiştir. Daha sonrasında 1957 yılında J.H. Taylor ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarla KKD yöntemi ortaya konmuştur. Fakat yöntem çok zaman alıcı ve radyoaktivite içermesi nedeniyle yaygın olarak kullanılmamıştır.

1972 yılında Zakharov ve Egolina, kardeş kromatidleri göstermek amacıyla çin hamster hücrelerini BrdU (5-bromo-2-deoksiüridin)’ lu ortamda iki döngü boyunca kültüre edip ardından giemsa boyası ile boyamışlardır. BrdU replikasyon esnasında yeni oluşan DNA molekülünün yapısına girmekte ve kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını sağlamaktadır. BrdU içeren DNA daha açık boyanmakta ve floresan mikroskopunda mavi-yeşil renk vermektedir [42].

Bir timin analogu olan Brdu (5'-Bromo-2'-deoxyuridine), kültür ortamında çoğalan DNA'da ki timidin' in yerine geçer. Kültür ortamında ki hücreler in vitro çalışmalarda bir veya iki replikasyon siklusu, in vivo çalışmalarda bir replikasyon siklusu boyunca BrdU' ya maruz bırakılarak boyanırlar [43].



Şekil 2.3.1 BrdU' ya maruz bırakılmış kromozomda KKD gösterimi [59].

KKD süresi boyunca, DNA'nın duplikasyonu sırasında kromatidler arasında parça değişimi ve DNA sarmalında kırıklar oluşmaktadır. Bu olay, hücre siklusunun S fazında normal olarak meydana gelebilmektedir. Ancak DNA replikasyonunu engelleyen mutajenlerin etkisi altında daha sık olmaktadır [42].

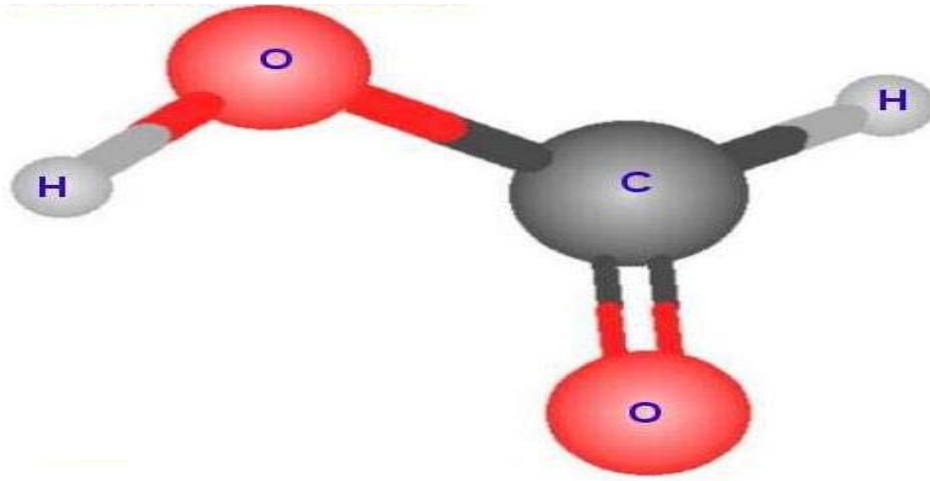
KKD sıklığının belirlenmesi hassasiyet gerektiren bir yöntemdir. Kültüre ilave edilen BrdU miktarının değişmesi, sonuçları önemli ölçüde etkilemektedir [42].

KKD'nin kardeş olmayan kromozomların kromatidleri arasındaki parça değişimi olayından, yani krossing-over' dan farkı, KKD'nin bir kromozomun kardeş kromatidleri arasındaki parça değişimini ifade etmesidir [44].

Işık mikroskobu altında kolaylıkla bu değişim gözlemlenebilmekte ve sayılabilmektedir. KKD sıklığı, sayılan kardeş kromatid değişimi sayısının incelenen metafaz sayısına bölünmesiyle elde edilmektedir. Kimyasal meddelere, ultraviyole ışığa maruz kalma gibi etkenler KKD sıklığını etkilemekte ve mutajenik etkinin varlığını göstermektedir [45].

2.4 Formik Asit

Kimyasal formülü HCOOH olan formik asit, tek karbonlu karboksilik bir asittir. Ayrıca metanoik asit olarakta bilinir. Karbonil karbonuna bağlı alkil grubu içermemesiyle de en basit karboksilli asit özelliği taşımaktadır [46].



Şekil 2.4.1 Formik asit[48]

Almanca “Amise Söure” olan ve “ Karınca Asidi” anlamına gelen formik asit, ilk olarak bir çok karıncanın damıtılmasıyla elde edilmiştir. Yaygın olarak karınca asidi ismiyle bilinen formik asidi karıncalar, saldırı ve savunma durumlarında kullanmaktadırlar [47].

Hidrokarbonlarla bir dereceye kadar çözünebilen formik asit, su ve çoğu polar organik çözücü ile tamamen çözünebilmektedir. Hidrokarbonlarda gaz halindeyken bireysel molekül yapı yerine hidrojen bağlı monomer çiftinden oluşur. Gaz halindeki formik asit hidrojen bağı eğilimi sayesinde, ideal gaz kanunlarına aykırı bir yapıdadır. Katı formik asit (iki polimorf), etkin bir sonsuz ağ şeklinde hidrojen bağlı formik asit moleküllerinden oluşur. Bu nispeten karışık olan yapı ayrıca, su (%22.4) ile kaynama noktası düşük bir azeotrop oluşturur ve sıvı formik asit aşırı-soğutucu eğilimi gösterir [48].

Formik asit deri ile temasında yakma etkisi göstererek deriye zarar verir. 160 °C' ye kadar ısıtılırsa hidrojene ve karbondioksite ayrışır. Karıncalarda, terde, ısırılan otunda, odun katranında, idrarda ve et suyunda serbest olarak bulunmaktadır [49].

Almanya'nın Rostock kentindeki Leibniz Kataliz Enstitüsü'nden Matthias Beller ve meslektaşları formik asiti, genel bir koruyucu ve antibakteriyel eşliğinde, düşük sıcaklıklardaki hidrojen gazına çevirmek için bir yöntem bulmuşlardır. Bu yapılan araştırmalarla formik asitin, kolay taşınabilen ve güvenli bir hidrojen yakıt pili kaynağı olabileceği tespit edilmiştir [50].

Vücutta metabolizma sonucunda formik asit ve formaldehite dönüşen metil alkolün toksisitesi de formik asitin oluşturduğu asidoza bağlı gelişmektedir. Asidoz sonucunda retinada sinir tahribatı ve buna bağlı olarak körlük veya ileri safhalarında ölüm meydana gelmektedir [51].

2.4.1 Metanol Zehirlenme Belirtileri

Vücutta metabolize olması sonucu formik asite dönüşmesinden dolayı zehirlenmeye yol açan metil alkol, metabolize olmadığı sürece zararsızdır ve sadece sarhoş edici bir etkisi vardır. Metil alkolün kandaki düzeyi 20 miligram/100ml üstünde ise bu dozlar toksik yani zehirleyici doz olarak kabul edilmektedir. 40 miligram/100ml üstü çok ciddi bozukluklara yol açarken, 80-100 miligram/100 ml dozları ise sınır düzeyi olarak kabul edilmektedir. Yani içilen metil alkol miktarına bağlı olarak 4-15 ml körlük, 15-100 ml de ise ölüm meydana gelmektedir [51].

Odun talaşının damıtılmasıyla elde edilen metil alkolü (metanol), endüstride, teksir makine sıvısı, antifriz, boya inceltici ve cam temizleyici gibi maddelerin yapımında kullanılmasının yanı sıra yasadışı olarak sahte kolonya ve içki yapımında da kullanılmaktadır. Bu şekilde ağızdan alınması sonucunda vücutta metanol zehirlenmesine yol açar. [51].

Metil alkol alınımından sonraki ilk 5 saatte sarhoşluk ve gastrit etkisi, 30 saatten sonra ciddi metabolik asidoza (biriken asit nedeniyle kanın pH değerinin asit hale gelmesine) yol açar. Metil alkolün asıl zehirlenme belirtileri alınımından 10-24 saat

sonra görülür. Toksisitesi, oluşan asidozun derecesine bağlıdır ve başlıca belirtileri aşağıda sıralanan şekilde ortaya çıkar:

- Bilinç bulanıklığı, denge ve hareket bozukluğu,
- Baş ağrısı,
- Bulantı, kusma,
- Şiddetli karın ağrısı,
- Sırt, kol ve bacaklarda ağrı,
- Görme bozukluğu ve daha sonra körlük,
- Tedavi edilmediği takdirde metabolik asidoz, koma ve solunum durması sonucu ölüm [51].

2.4.2 Formik Asidin Kullanıldığı Yerler

1. Çeşitli kimyevi madde imalatlarında (Formiyatlar, esterler, oksalit asit vs.)
2. Tekstil sanayi boyama ve finishing işlemlerinde
3. Çamaşır temizleme fabrikalarında
4. Soğutucu imalatında
5. Ziraî mücadele ilaçları imalatında
6. Ayna imalatında
7. Elektroliz ile metal kaplama sanayisinde solvent olarak
- 8., Kozmetik sanayisinde lak imalatında
9. Deri sanayisinde
10. Tıp dalında lokal anestezielerde, gıda sanayisinde, matbaa mürekkep imalatında
11. Akrilik elyaf imalatında
12. Parke cila imalatında
13. Plastifasyon imalatında
14. Formaldehit imalatında
15. Ekmek mayası imalatında
16. Sunta imalinde ve çeşitli imalatlarda solvent olarak kullanılır [51].

2.4.3 Gıda Katkı Maddeleri

Gıdalardaki mikrobiyolojik bozulmayı önlemek için, besleyici değeri koruma, dayanıklılığı arttırmak için, teknolojik işlemlere yardımcı olmak ve görünüş, renk, koku, lezzet gibi duyuşal özellikleri iyileştirmek için gıdalara katılan maddelere gıda katkı maddeleri denilmektedir [52]. Formik asit gazlı içecekler, meyve ve sebze konservelerinde koruyucu madde olarak kullanılmaktadır [53].

İlk kullanımları M.Ö' sine dayanan katkı maddelerinin 19 yy. da ki hızlı şehirleşmeyle birlikte, özellikle gıdaları bozulmaya karşı koruma amacıyla kullanımı yaygın bir hale gelmiştir. Günümüzde ise katkı maddeleri sürekli gelişen gıda teknolojisinin vazgeçilmez birer parçalarıdır [52].

Bu katkı maddelerinin özellikleri, gıdalarda kullanım sınırları, uluslararası düzeyde inceleme ve araştırmalarda ele alınan bir konudur. Bu amaçla Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO)'nın ve Gıda Tarım Örgütü (FAO)' nün oluşturduğu, gıdalarla ilgili komisyon (CAC) ve bu kuruluşun alt komitesi olan Birleşik Gıda Katkı Uzman Komitesi (JECFA), gıda katkı maddeleri ve katkı maddelerinin insan sağlığı açısından güvenilirliği konusunda çalışmalar yapmakta ve belirli dozlarda kullanımında sakınca olmadığı belirlenen maddelerle ilgili listeler hazırlanmaktadır. JECFA komisyonunda görev alan tarafsız uzmanlar gerçekleştirdikleri uzun süreli ve detaylı toksikolojik değerlendirmeler sonucunda, söz konusu katkı maddesinin deney hayvanlarına zarar vermeyen dozunu (NOEL) saptamaktadır. Bu değer, insanlar için bir ömür boyu vücut ağırlığının mg başına alındığında zararlı etki yapmayacak doza (ADI) çevrilirken güvenlik faktörü olan 100 rakamına bölünmektedir. Bu verilere dayanarak hazırlanan listelere katkının adı, değeri ve bu değer esas alınarak değişik gıdalarda izin verilecek maksimum miktarları (ML) belirtilmekte, sakıncalı olabilecek maddeler (Butter Yellow, Hidrojen Peroksit, vb.) liste dışı bırakılmaktadır. CAC tarafından önerilen listeler Avrupa Topluluđu (EC) tarafından da benimsenmiş olup, bu topluluğu'nun da benzer listeleri mevcuttur. Dünyadaki çeşitli ülkeler listeleri esas alarak kendi ülkelerinde kullanımına izin verilen katkı maddelerinin listelerini düzenlemektedirler. Ülkemizde de kullanımı uygun görülen gıda maddeleri CAC ve EC tarafından oluşturulan listelerden titizlikle seçilmektedir.

Bu bilgilerden de anlaşılacağı gibi ülkemizde katkı maddeleri konusu, dünyadaki tüm gelişmiş ülkelerde olduğu gibi titizlikle ele alınmakta ve yasal kuruluşlarca denetlenmektedir. Kullanımına izin verilen katkı maddelerinin denetiminde değerlendirilmesi gereken en önemli iki husustan birincisi bu maddelerin gıda saflığında olmaları, diğeri ise gıdalarda izin verilen sınırı aşmamaları gerektiğidir. Bu denetim ise gerek katkı maddeleri kullanımında, gerekse genel anlamda gıda tüketiminde, ülkede etkin bir kontrol sisteminin kurulması ile gerçekleşebilir. [52].

3.MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada sigara içmeyen, birbirine yakın yaşlardaki 10 bayan (22 ve 25 yaşlarında) ve 10 erkekten (22 ve 25 yaşlarında) alınan periferik kan materyal olarak, formik asit test maddesi olarak , Mitomisin-C (MMC) pozitif kontrol olarak, DMSO (Dimetil sülfoksit) ise test kontrolü olarak kullanılmıştır [54].

3.1 Mitomisin-C (MMC) 2 mg (Sigma, M 0503)

3.1.1 Mitomisin-C (MMC)' nin Özellikleri

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan Mitomisin-C (MMC) , antineoplastik ve geniş spektrumlu bir sitostatik (hücre bölünmesini durduran) ajandır. Işıktan korunduğu takdirde 5°C altındaki buzdolabında yedi gün özelliğini koruyabilen MMC, suda çözünebilen (pH=6-9), mavi-menekşe renkte, kristal şeklinde bir maddedir. Mitomisin-C 2 mg ve 10 mg'lık amber renkli şişelerde toz şeklinde bulunur [55].

3.1.2 Mitomisin-C (MMC)'nin Kullanım Alanları

Mitomisin-C (MMC), antineoplastik ilaçlar grubuna girmektedir. Bu grupta daunamycin, Mitomisin-C, cyclophosphamide, uracil mustard ve streptozotocin bulunmaktadır.

Alkilleyici bir ajan olan MMC, aşağıdaki kanser türlerinin tedavisinde kullanılmaktadır.

- Mide kanseri
- Göğüs kanseri
- Pankreas kanseri
- Anüs ve kalın bağırsak kanserleri
- Küçük hücreli akciğer kanseri
- Baş ve boyun kanserleri
- Küçük mesane papillomaları

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddelerin Çözeltilerinin Hazırlanması

3.2.1 Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

1. Etanol (C_2H_5OH), (Merck, K35091886 537)
2. Formik asit (CH_2O_2), (Merck, K34898363 527)
3. Potasyum di-hidrojen fosfat (KH_2PO_4), (Merck, A651773 524)
4. Sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), (Merck, K34623780 516)
5. Mitomisin C (MMC) 2 mg (Sigma, M 0503)
6. Giemsa (Merck, HX694620)

Fosfat Tampon Çözeltisi: Potasyum di-hidrojen fosfat (KH_2PO_4)' dan 9.1 gr. alınır ve 1000 ml. bidistile suya tamamlanır. Başka bir balon jöjeye de sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)'dan 11,9 gr alınır ve 1000 ml. bidistile suya tamamlanır ve stok çözeltiler hazırlanmış olur [56].

Sorenson Fosfat Tampon Çözeltisi: KH_2PO_4 çözeltisinden 60 ml. ve Na_2HPO_4 çözeltisinden 30 ml. alınarak şaleye konulur ve üzerine 10 ml. giemsa boyası eklenmesi suretiyle %10 luk giemsa-sorenson fosfat tampon çözeltimiz hazırlanmış olur. Sorenson fosfat tampon çözeltisi çeşitli pH değerlerine ayarlanabilir, bu işlem için her iki çözeltinin değişik miktarları kullanılarak pH istenilen değere ayarlanır [56].

Çözelti 1:

KH_2PO_4 9.1 gr.
Bidistile su.....1000 ml.

Çözelti 2:

Na_2HPO_411.9 gr.

Standart Saline Citrate (SSC) Çözeltisi

Bu çözelti ışınlamadan sonra kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını artırmak amacıyla kullanılmıştır. SSC çözeltisini hazırlamak için 11.05 gr trisodyum sitrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) ve 21.9 gr NaCl kullanıldı. Bu iki madde ayrı ayrı kaplarda bir miktar saf su içerisinde çözdürüldü, daha sonra aynı kaba aktarılarak birbirleriyle karıştırıldı. Karışımın üzerine 500 ml oluncaya kadar saf su ilave edildi. Hazırlanan bu stok çözelti 5 x SSC'dir. Çözelti buzdolabında saklandı. Deneyde, bu stoktan 20 ml alıp, üzeri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlandı (elde edilen 1 x SSC kullanıldı).

Bidistile su.....1000 ml.

pH 5,6 için: Çözelti 2 den 5 ml. ve çözelti 1 den 100 ml.

pH 6,0 için: Çözelti 2 den 12.3 ml. ve çözelti 1 den 100 ml.

pH 6,5 için: Çözelti 2 den 30 ml. ve çözelti 1 den 100 ml.

pH 6,8 için: Çözelti 2 den 50 ml. ve çözelti 1 den 100 ml.

pH 7,2 için: Çözelti 2 den 70 ml. ve çözelti 1 den 100 ml.

3.2.2 Formik Asit

Bu çalışmada Merck firmasının ürettiği Formik asit (CH_2O_2), 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml ve 20 µg/ml dozlarında test maddesi olarak kullanılmıştır.

3.2.3 Mitomisin- C (MMC) Çözeltisinin Hazırlanması

2 mg Mitomisin-C bulunan ortama 2 ml steril bidistile su ilave edilerek MMC çözdürülmüştür. Sonra bu çözeltiden 5 ml'lik kültür ortamına ilave edilerek son konsantrasyondaki MMC oranı 0.3 µg/ml olan çözeltiler hazırlanmıştır. Yukarıda belirtilen konsantrasyonlardaki MMC ile hücreler 24 saat muamele edilmiştir.

3.2.4 Sorensen Tamponunun (Sorensen Buffer) Hazırlanması

KKD'yi incelemek amacıyla hazırlanan preparat Sorensen tamponu içerisinde UV lambası ile ışınlandırıldı. Sorensen tamponu % 10'luk Giemsa boyasının hazırlanmasında da kullanıldı. Bu tampon çözelti tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış olup, bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanıldı.

Hazırlanışı

Tampon A: 11.34 gr KH_2PO_4 250 ml saf su içinde çözdürülmüştür (pH=4.8).

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

3.2.5 Boyanın Hazırlanışı

Tampon A: 11.34 gr KH_2PO_4 250 ml saf su içinde çözdürülmüştür (pH=4.8).

Tampon B: 14.83gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 250 ml saf su içinde çözdürülmüştür.

3.2.6 Kromozom Medyumu (Besi Yeri)

Bu çalışmada Biochrom firmasının ürettiği Chromosome Medium B (Cat. no. F5023), hücre kültürü olarak kullanılmıştır. Chromosome Medium B'nin her litresinde aşağıdaki maddeler bulunmaktadır:

Non essential Amino Acids.....	850 ml
Fetal Calf Serum	150 ml
Heparin.....	25.000 E
Penicillin G, Sodium Salt.....	75.000 E
Streptomycin Sulphate.....	50 mg
Phytohemagglutinin M.....	2.5 mg

Bu medyum her tüpe 5 ml olacak şekilde paylaştırılmış ve bu miktarlarda kullanılmıştır. Kültür tüpleri steril olarak temin edilmiştir.

3.2.7 Kolşisin

Kromozom preparatlarının hazırlanmasında mitotik zehir olarak Colchicine (Kolsişin) (Sigma) kullanılmıştır. Kolsişin çözeltisi steril saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom medyumunun her ml'sinde 0.06 µg olacak şekilde (0.06 µg/ml) 5 ml'lik kromozom medyumuna ilave edilmiştir. Kolsişin'in bazı özellikleri aşağıdadır.

Kapalı formülü: C₂₂H₂₅N₀₆

Molekül ağırlığı: 399.4

Etil asetat içeriği: %3.4

Kloroform içeriği: < %0.1

3.2.8 Hipotonik Çözelti

Hipotonik çözelti olarak % 0,4'lük KCl (Merck) kullanılmıştır. Çözelti bidistile su içinde stok halinde hazırlanıp, ağzı kapalı bir cam kaptaki buzdolabında (+4 °C) saklandı. Her preparasyondan yaklaşık 2 saat önce yeteri kadar miktar alınıp, 37 °C'deki etüvde ısıtılarak kullanıldı.

3.2.9. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)

BrdU, Sigma firmasından (Cat. No. B 5002) temin edildi. BrdU'dan 5 mg alınarak 10 ml Chromosome Medium B'de çözdürüldü (50 µg/100 µl medium). Bu çözeltiden SCE çalışmasında besi yerine 10 µg/ml gelecek şekilde ilave edildi (100 µl).

3.2.10 Fiksatif

Preparatların hazırlanmasında kullanılan fiksatif, 1 kısım glacial asetik asit' in 3 kısım metanol (1/3 : glacial asetik asit/metil alkol) ile karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Fiksatif kullanılmadan iki saat önce hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır. Her seferinde preparat yapım işleminden iki saat önce taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

3.2.11. Giemsa

Giemsa boyası Merck firmasından (Cat. No. 9204) temin edilmiş olup, deneyde Sorensen tamponu içinde hazırlanmış olan % 10'luk ve % 5'lik çözeltileri preparatların boyanmasında kullanıldı.

3.3 Kullanılan Deney Ekipmanları

3.3.1 Hassas Terazı

Tartım işlemlerinde 0,0001 gr hassasiyetindeki PRECİSA XB 220 A marka terazi kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

3.3.2 Santrifüj

5000 rpm'e kadar yükselebilen devir hızı, 15 dk.'lık zaman ayarlayıcı ve 8 tüp kapasiteli ELEKTRO-MAG marka santrifüj çalışmalarda kullanılmıştır.

3.3.3 Mikroskop

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan OLYMPUS marka binoküler ışık mikroskobu preparat incelemeleri sırasında kullanılmıştır.

3.3.4 Etüv

Elektro-mag M 420 Bp marka 0 °C - 100 °C ayarlanabilir etüv deneyde hücre kültürünün yapımında ve bazı eriyiklerin 37 °C'ye ısıtılmasında kullanılmıştır.

3.3.5 Deney Ekipmanları

- 1.Etüv (Elektro-mag M420 Bp)
- 2.Vorteks (Yellowline)
- 3.Mikroskop (Olympus model CHK)
- 4.Santrifüj (Elektro-mag)

5. Derin dondurucu
6. Buzdolabı
7. Otomatik pipet
8. Fotomikroskop (Olympus BH-2, Nikon Coolpix 8800)

3.3.6 Sarf Malzemeler

1. Heparin (Roche)
2. Giemsa (Merck, 5400512)
3. KH_2PO_4 (Merck, 9021622)
4. $\text{Na}_2\text{HP0}_4\text{H}_2\text{O}$ (Merck, K1 690176)
5. Glasiyal asetik asit (Merck, 247K18855556)
6. Metanol (Merck, 502K05275408)
7. İmmersiyon yağı (Merck, 09403569)
8. KCL (Merck, 340TA611835)
9. Alkol (Merck)
10. Distile su
11. Tüplük
12. Çeşitli cam malzemeler
13. Konik tabanlı 10ml'lik steril kültür tüpü
14. Enjektör
15. Çeşitli ebatlarda puarlar
16. Pastör pipeti
17. Lam
18. Lamel

3.4 Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

3.4.1 Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Speit ve Haupter (1985)'in geliştirdikleri metod modifiye edilerek bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını (sister chromatid differentiation=SCD)

sağlamak amacıyla kullanılmıştır [57]. Sigara içmeyen, sağlıklı ve yaşları birbirine yakın on bayan ve on erkekten alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri steril şartlarda kromozom medyumlarına (5 ml) 12 damla ekildi. Daha önce steril şartlarda hazırlanan BrdU çözeltisinden her tüpe 10 µg/ml olacak şekilde (hazırlanan BrdU solüsyonundan 100 µl) yine steril şartlarda ve ilave edilerek iyice karıştırıldı (50 µg BrdU/100 µl besi yeri) ve hücre kültürü etüvde 37 °C'de 72 saat için inkübe edildi. Kültür süresinin bitimine 24 saat kala formik asit'in insan kromozomları üzerine etkisini incelemek için son konsantrasyon kültür tüplerine ilave edilmiştir.

MMC, pozitif kontrol olarak kullanmak amacıyla steril bidistile suda çözülmüştür. Kültür bitimine 24 saat kala MMC'nin insan kromozomları üzerine etkisini incelemek için son konsantrasyonu 0.3 µg/ml MMC kültür tüplerine ilave edilmiştir. Negatif kontrol olarak ise distile su (%1), kullanılmıştır [58].

Kültürün 70. saatinde (yani kültür süresinin bitiminden 2 saat önce) hazırlanan kolşisin çözeltisinden her tüpe ilave edildi (0.06 µg/ml) ve iyice karıştırmak amacı ile tüpler hafifçe sallandı. Hücreler 2 saat süresince (37 °C'de) kolşisin ile ön muameleye tabi tutulmuştur. Kültür tüpleri, kültür süresi olan 72. saatin bitiminde 10 dk. 2000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Hücreleri ihtiva eden ve tüpün dibinde kalan 0.5-0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra etüvde 37 °C'de tutulan hipotonik çözelti tüplere ilave edildi. Bu işlem sırasında hücrelerde kümeleşme olmaması için çözelti tüplere damla damla ve karıştırılarak ilave edildi. Hipotonik çözelti her tüpe 5 ml olacak şekilde ilave edildikten sonra ağızları kapatılarak etüve konuldu. 37 °C'de 30 dk etüvde bekletilen hipotonik ilave edilmiş tüpler, sürenin sonunda 10 dk. 2000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Soğuk fiksatif, her tüpe 5 ml olacak şekilde hipotonik çözelti ilavesindeki gibi yavaş yavaş ve karıştırarak, ilave edildi. Fiksatif ile muamele edilen hücreler 2000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Bu işlem 3 kere tekrarlandı ve İşlem sonrası tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görüldü. Son santrifüjden sonra dipte 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldı. Tüpte kalan 0.5-0.7 ml'lik kültür sıvısı ile preparatlar hazırlandı. Bu işlem yapılırken tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirildi ve Pasteur pipetine 4-5 damla bu hücre süspansiyonundan çekildi ve bu süspansiyon daha önce temizlenmiş lamların üzerine yaklaşık olarak 50 cm yükseklikten ve farklı alanlara 1'er damla damlatıldı (her lama 3-4 damla). Bu işlem yapılırken damlaların üst üste

düşmemesine dikkat edilerek hücrelerin lam üzerine yayılmaları sağlandı ve yayma işleminden sonra preparatlar kurumak üzere 24 saat oda ısısında bekletildi.

3.4.2 Preparatların Boyanması

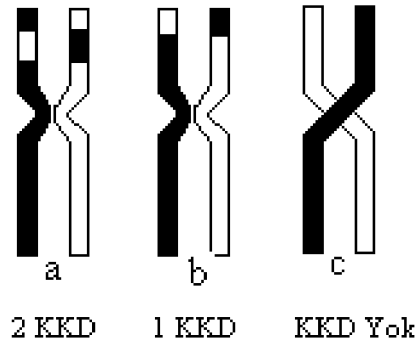
Speit ve Haupter (1985)'in geliştirdikleri metot modifiye edilerek, bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını (sister chromatid differentiation=SCD) sağlamak amacıyla kullanıldı [57]. Bu amaçla bir gün kurutulmuş preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri bir film gibi örtülecek şekilde Sorensen tamponu ile kapatıldı. Işınlama çözeltisi, 5 ml tampon A, 5 ml tampon B'den alınıp bu karışımın distile su ile 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlandı (pH=6.8). Işınlama çözeltisinin fazla veya az olması kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını önemli derecede etkilediği görülmüştür. Bu nedenle preparatların üzeri ince bir tabaka halinde ışınlama çözeltisi ile örtülmüştür. Örtülmüş preparatlar, karanlıkta 15 cm yükseklikten 30W'lık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen tek ultraviyole lamba ile 30 dk. ışınlandı. Işınlama bittikten sonra preparatlar 1xSSC eriyiği içerisinde 58-60 °C arasındaki sıcaklıklarda 60 dk. inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitmeden 15 dk. önce % 5'lik Giemsa boya çözeltisi hazırlandı. % 5'lik Giemsa boyası, 5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5 ml Giemsa'nın karıştırılarak üzeri 85 ml saf su ile tamamlanmasıyla hazırlandı (pH=6.8). Sonra bu boya dik bir şale içine filtre kâğıdından süzüldü. İnkübasyon süresinin sonunda preparatlar 1xSSC solüsyonundan alınarak direkt olarak boya içerisine konuldu ve yaklaşık olarak 20 dk. beklendi (kardeş kromatidler arasındaki en iyi kontrast farkı bu sürede sağlanmıştır). Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarıldı, üç ayrı kaptaki saf su içinden geçirilerek preparatlar üzerindeki fazla boyanın akması sağlandı. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirildi. Entellan kuruduktan sonra bu daimi preparatlar mikroskop altında incelendi.

3.4.3 Mikroskopik inceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar Olympus marka binoküler ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (10x100=1000 büyütmede).

3.4.4 KKD Sayısının Saptanması

Bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılması esasına dayanarak, kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 500 metafazda KKD sayısı belirlendi [59]. Kromozom kollarının orta kısmında bir parça değişimi olmuş ise bu iki KKD olarak, sadece kromozom kollarının uç kısmında parça değişimi olmuş ise bu da bir KKD olarak sayıldı. Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekmektedir. Bu durumdaki kromozomlarda KKD yoktur.



Şekil 3.4.4 Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi [59].

3.4.5 Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi=PI) Saptanması

Formik asit'in DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile RI hesaplanmıştır. Bunun için tesadüfen seçilmiş 500 hücre incelendi. Bu incelemeler sırasında gözlenen birinci, ikinci ve üçüncü metafaz evresindeki hücreler sayıldı. Bu verilerden yola çıkarak RI aşağıdaki formülle hesaplandı.

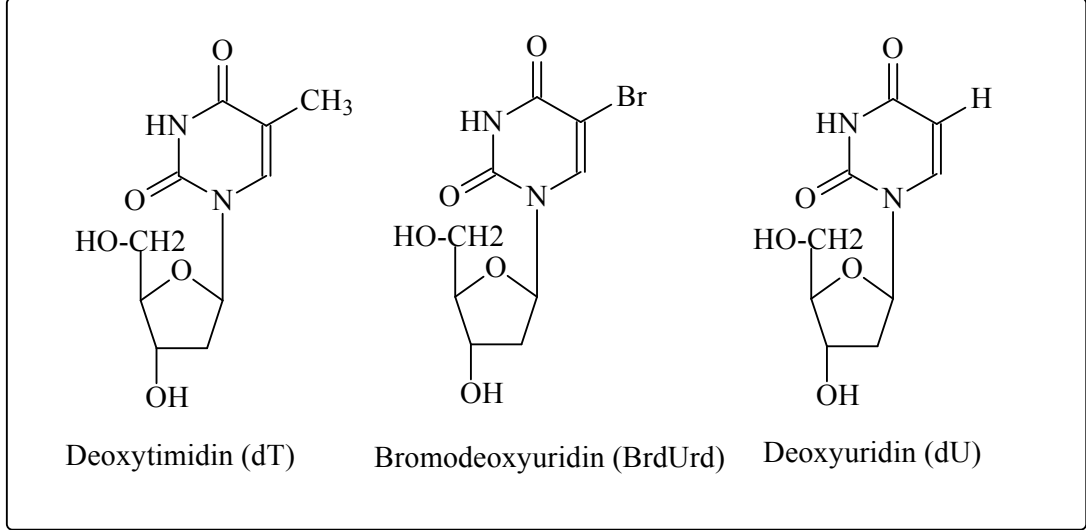
$$RI = (1 \times M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3) / 100$$

M1: 1. Mitozdaki hücre sayısı

M2: 2. Mitozdaki hücre sayısı

M3: 3. Mitozdaki hücre sayısı

Birinci, ikinci ve üçüncü metafazlar şu şekilde ayırt edilmiştir [60]: BrdU, deoxytimidin (dT) ve deoxyuridin (dU) birbirlerinin analogu olan bileşiklerdir. BrdU, dT ve dU arasındaki tek fark taşıdıkları benzen halkasındaki 5.C atomuna dT’de CH₃, BrdU’de Br ve dU’de H atomunun bağlı olmasından kaynaklanmaktadır.

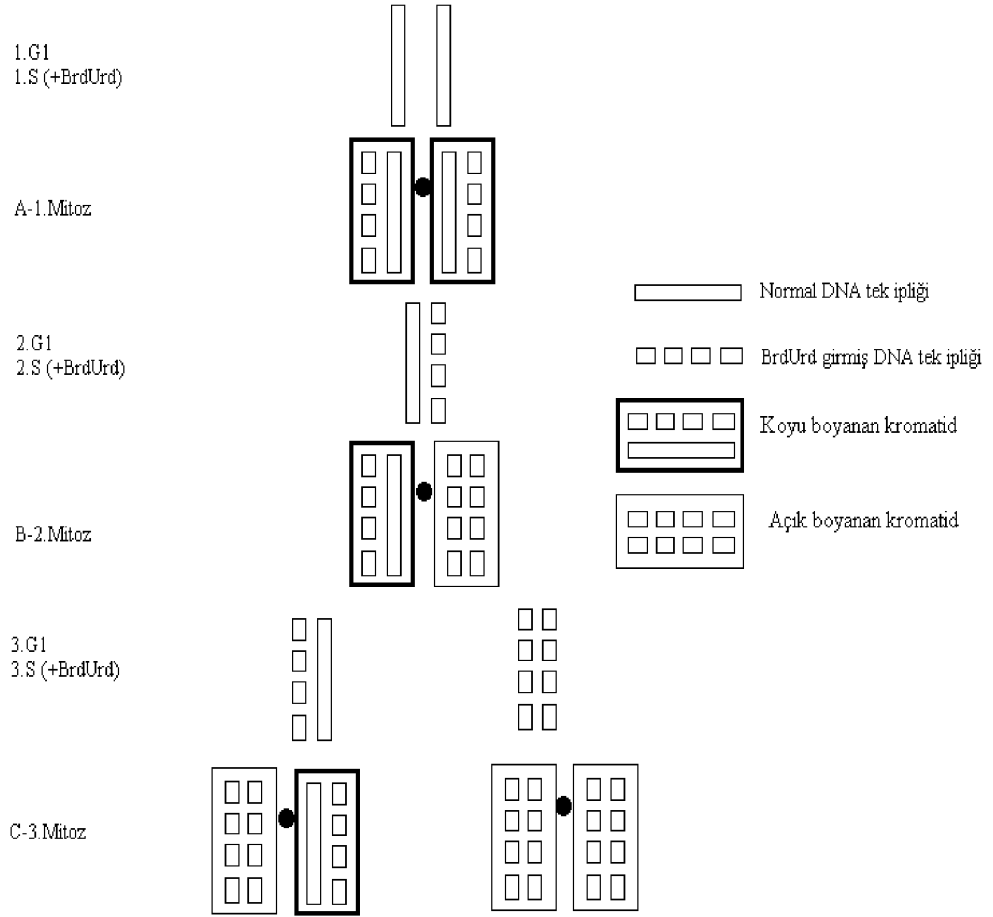


Şekil 3.4.5.1 Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdU) ve Deoxyuridin (dU)’in kimyasal yapıları.

Kültür ortamına BrdU koyulduğunda, hücre DNA’sını replike ettiği sırada (1.S fazında) yeni sentezlenen DNA dallarından birinin (polinükleotid ipliği) içine dT’in yerine BrdU geçmektedir. Böyle hücreler 1. Mitoza uğradıklarında meydana gelen yeni hücrelere ait kromozomların her iki kromatidinde koyu renkte boyanmaktadır. Bu hücreler S (2. S fazı) fazına girdiğinde DNA ipliğinin birisi BrdU diğeri dT taşıdığından, DNA replike olduğunda tekrar ortamda bulunan BrdU’i yapılarına almaktadırlar. Bu hücreler 2. Mitoza uğradıklarında yavru hücrelerin kromozomlarının kromatidlerinden biri koyu boyanırken diğeri açık boyanmaktadır. Çünkü, kromatidlerden koyu boyananda DNA ipliğinin biri dT taşırken, diğeri BrdU taşımaktadır. Diğer kromatidi oluşturan DNA ipliğinin ikisi de BrdU taşımaktadır (açık boyanan). Böyle yavru hücreler tekrar BrdU bulunan ortamda S fazına (3. S fazı) girdiklerinde ortamdaki BrdU’i yapılarına alırlar. Bu hücrelerin kromozomlarından birini oluşturan DNA ipliğinden biri BrdU’i, diğeri dT’i taşıdığından 3. mitozu girdiğinde yavru hücrelerin kromatidlerinden biri koyu diğeri açık boyanmaktadır. Açık boyanan kromatidleri taşıyan hücreler ise 3. Mitoza uğradıklarında kromatidleri oluşturan DNA ipliklerinin her ikisi de BrdU

taşıdığından yeni yavru hücrelerin kromozomlarını oluşturan kromatidlerin her ikisi de açık boyanmaktadır. Bu nedenle yeni yavru hücrelerin (3. Mitoz sonucu oluşan) bazılarının her iki kromatidi açık boyanırken, bazılarının kromatidlerinden biri açık diğeri koyu boyanmaktadır. Özetleyecek olursak, BrdU'li ortamda bulunan hücrelerin kromozomlarını oluşturan kromatidlerin her ikisi, birinci mitoz sonucu oluşan yavru hücrelerde koyu boyanır. İkinci mitoz sonucu oluşan yavru hücrelerde kromatidlerin biri koyu diğeri açık boyanır. Üçüncü mitoz sonucu oluşan hücrelerde ise hücrelerin bir kısmında kromatidlerin biri açık, diğeri koyu boyanırken, diğeri bir kısmında ise kromatidlerin ikisi de açık boyanmaktadır. Şekil 3.4.5.2'de şematik olarak gösterilmiştir.

Bu boyanma şeklinde hücrelerin kaçınıcı mitozda olduğu anlaşılabilir. Bu şekilde görüntülenen metafaz plaklarında bazı kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık, diğeri kromatidi de koyu renkte boyanmaktadır ve bu durum hücreleri 3. mitoz bölünmeyi geçirdiğini göstermektedir. Taranan preparatlarda metafaz esnasında bulunan 100 hücre incelenerek kaçınıcı mitoz evresinde oldukları belirlendi. Bu sonuca göre formülle replikasyon indeksi (RI) hesaplandı.



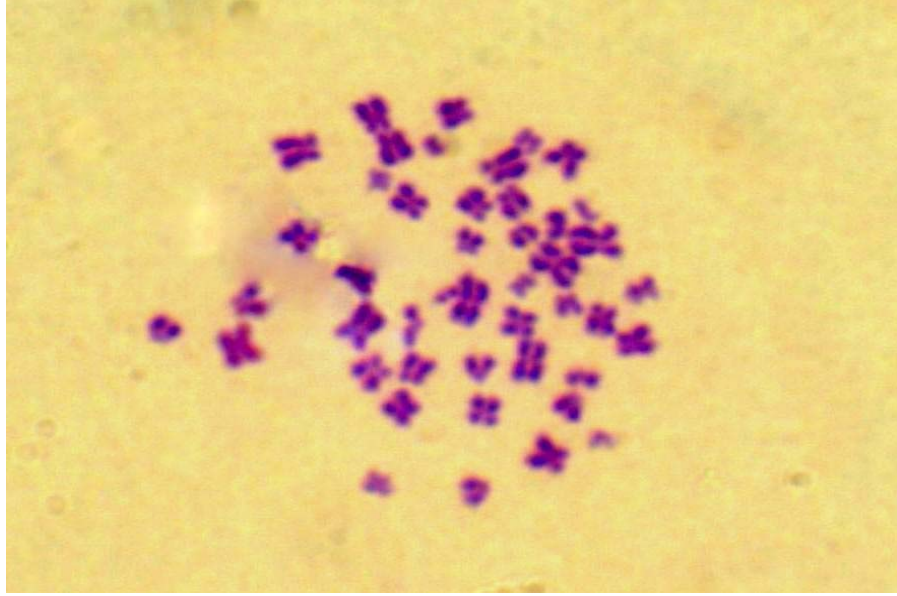
Şekil 3.4.5.2 BrdU'in DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması [59].

3.5 İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

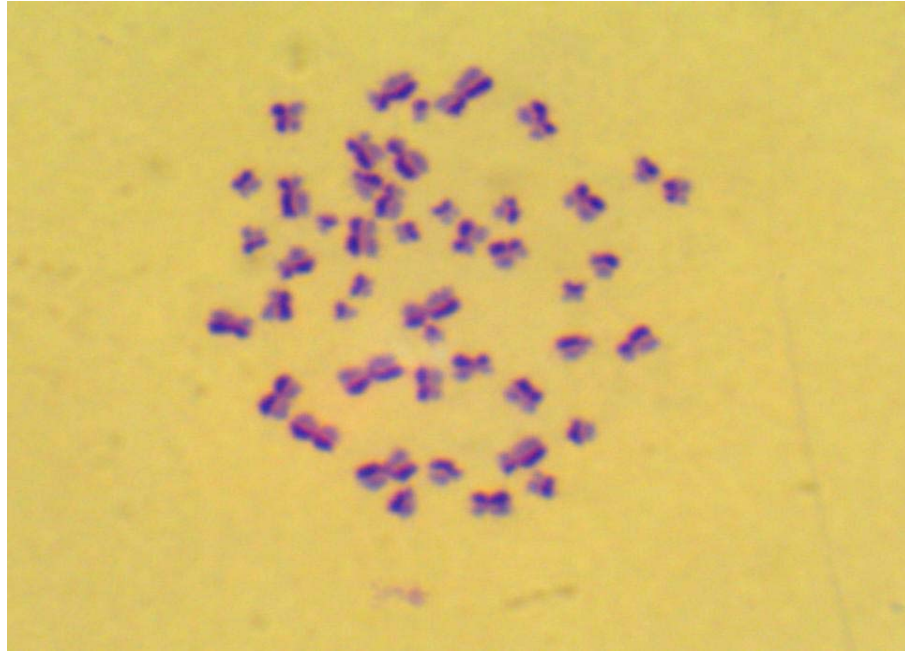
Tüm istatistiksel analizler Windows 95 GraphPad InStat 3.05 (GraphPad Software, San Diego California USA) kullanılarak yapılmıştır. Kimyasallarla muameleli gruplar ve negatif kontroller arasında farklılığın tespiti için Dunnett t testi kullanılmıştır. Doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla regresyon ve korelasyon analizleri yapıldı, regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı (r) bulundu ve regresyon doğrusu çizildi.

4.BULGULAR

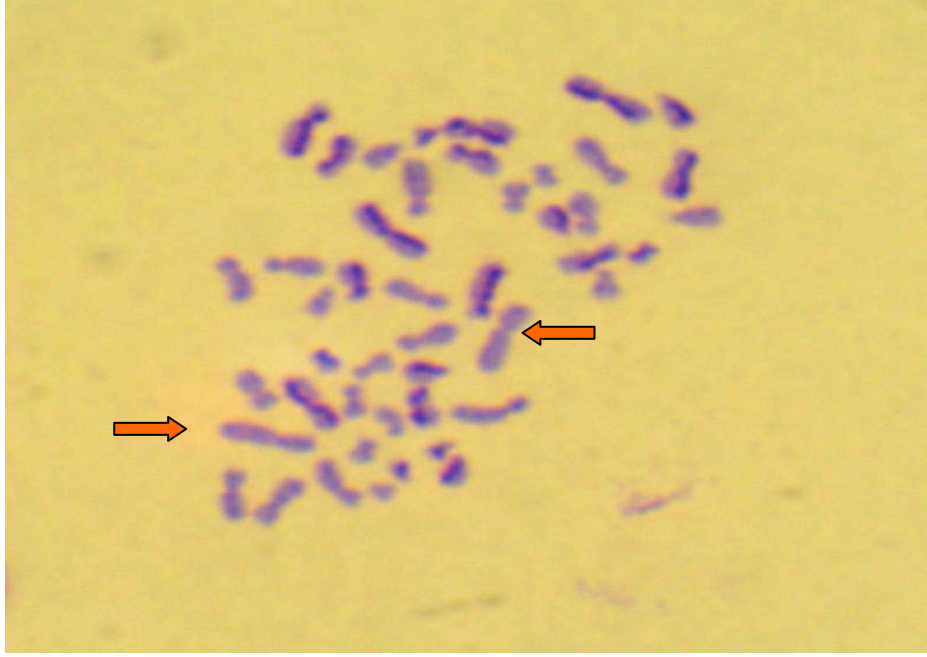
Sigara ve alkol kullanmayan sağlıklı bireylerden alınmış kandan laboratuvarımızda elde edilen metafazlar evreleriyle aşağıda görülmektedir.



Resim 4.1 Sağlıklı bir bireye ait metafaz plağı mitoz 1 (normal kromozom görüntüsü)

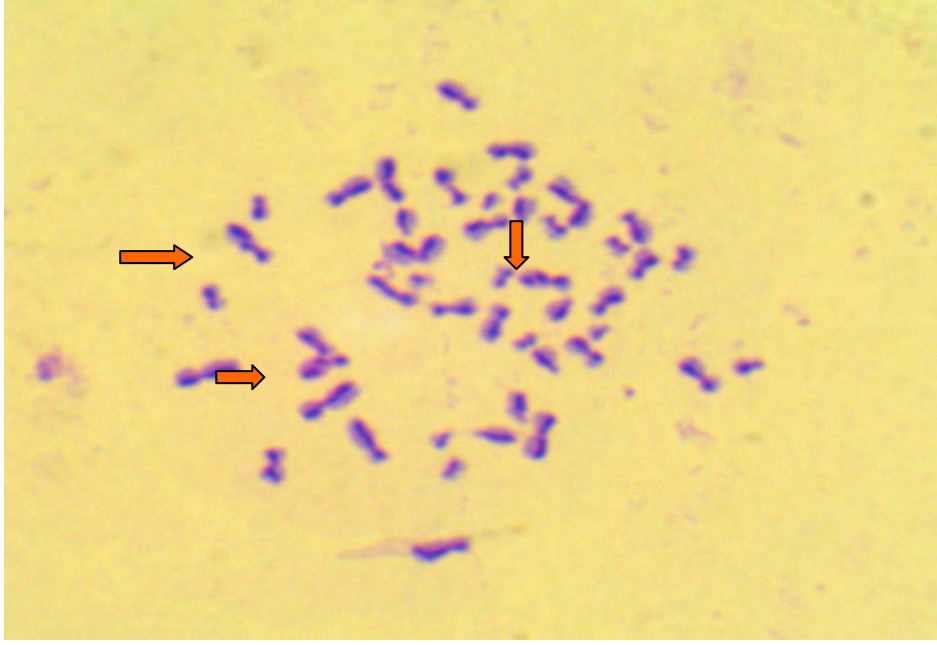


Resim 4.2 Sağlıklı bir bireye ait metafaz plağı mitoz 2 (normal kromozom görüntüsü)

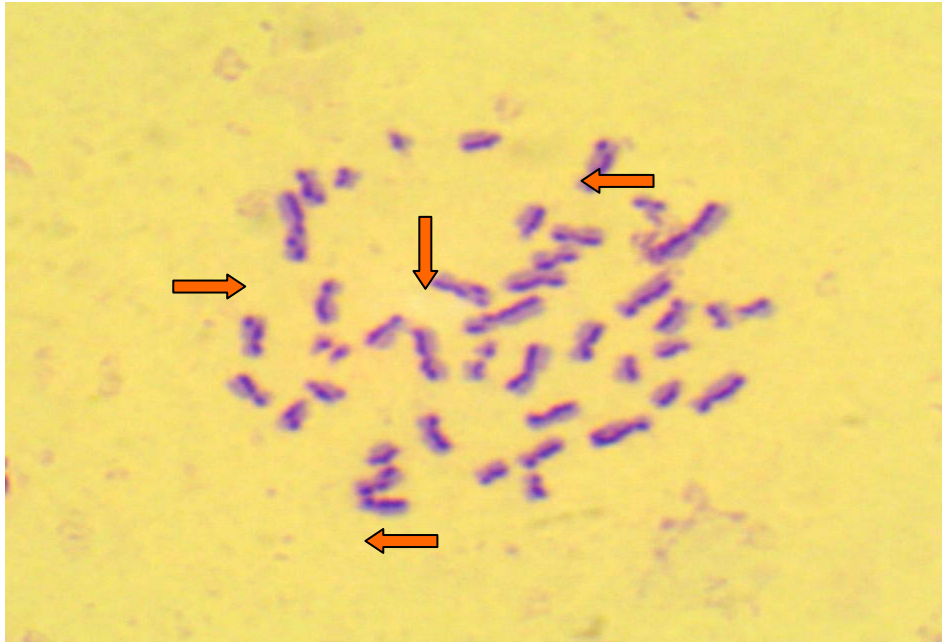


Resim 4.3 Sağlıklı bir bireye ait metafaz plağı mitoz 3 (normal kromozom görüntüsü)

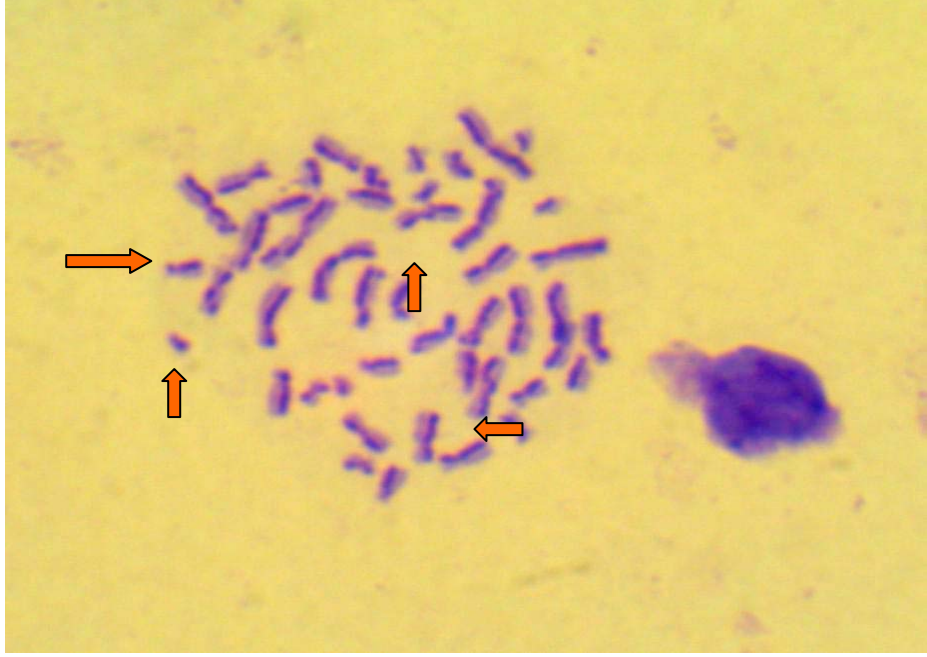
Sigara ve alkol kullanmayan sağlıklı bireylerden alınan kan, farklı dozlarda Formik Asit ile muamele edilmiştir. İnsan periferik lenfosit hücre kültüründen elde edilen kromozomlara ait metafaz plağı görüntüleri aşağıda yer almaktadır.



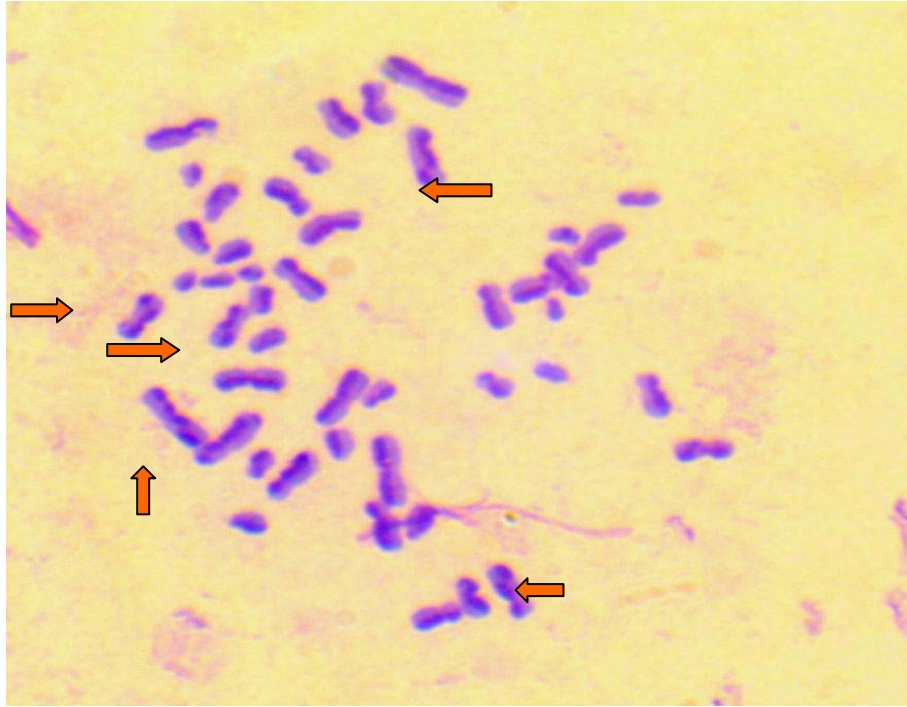
Resim 4.4 3 KKD' nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı



Resim 4.5. Çoklu KKD' nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı



Resim 4.6 6 KKD' nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı



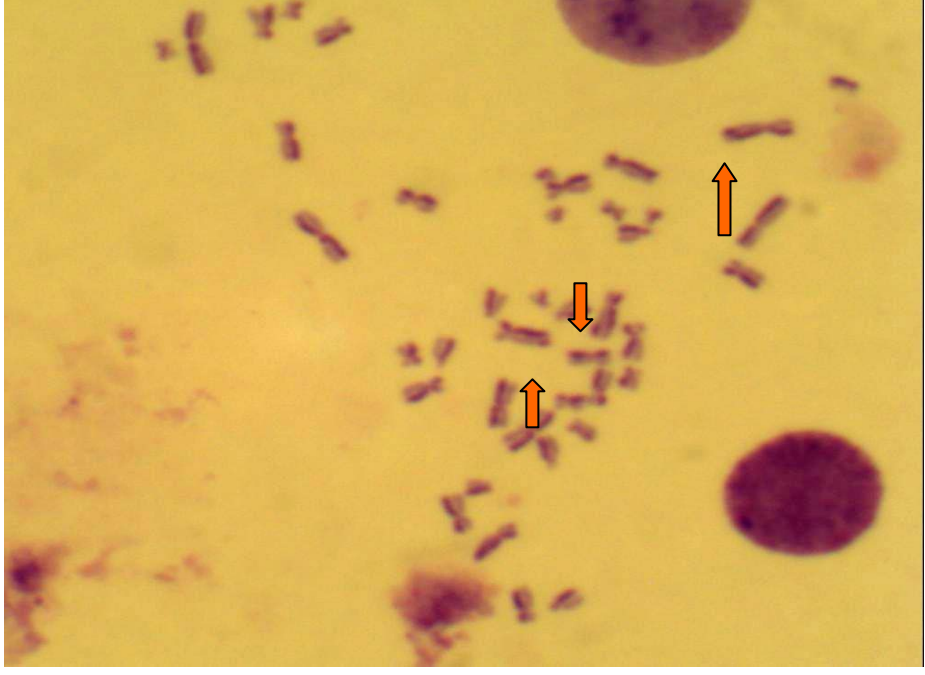
Resim 4.7 5 KKD' nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı



Resim 4.8 4 KKD' nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı



Resim 4.9 3 KKD' nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı



Resim 4.10 3 KKD' nin görüldüğü mitoz 2 evresindeki metafaz plağı

Tablo 4.1 Kontrol ve Formik Asit Gruplarının İnsan Lenfosit Kültürü Hücrelerinde Kardeş Kromatid Değişimi (%)

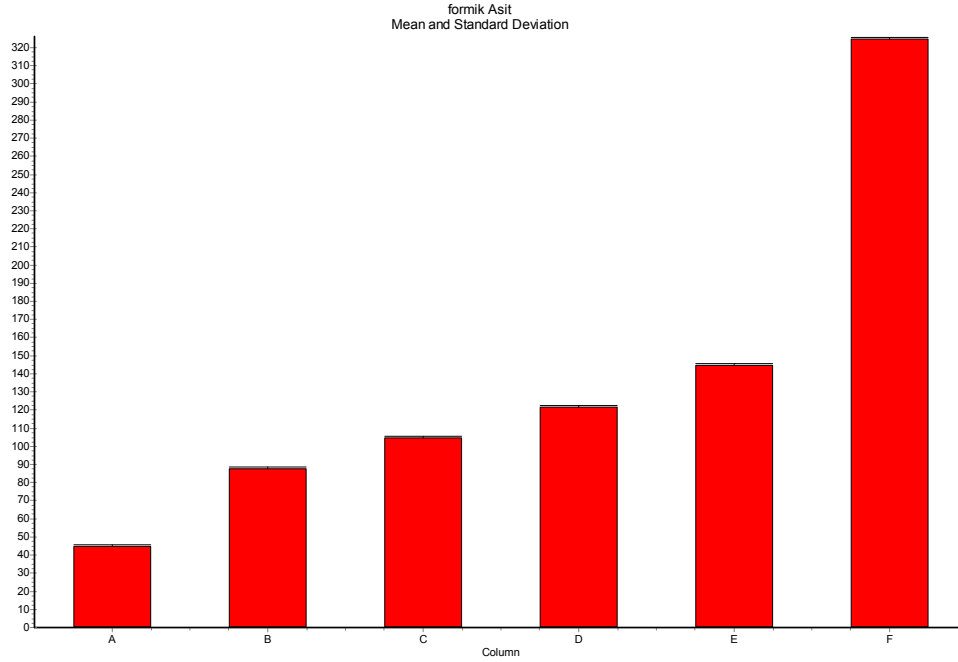
Gruplar	Muamele süresi	Toplam hücre sayısı	KKD sayısı (ort.)	±SEM (%)
Negatif kontrol	24 s	500	45	±0,31
Pozitif kontrol MMC (03 µg/ml)	24 s	500	325	±0,37
Formik Asit (5µg/ml)	24 s	500	88*	±0,37
Formik Asit (10µg/ml)	24 s	500	105*	±0,37
Formik Asit (15µg/ml)	24 s	500	121*	±0,50
Formik Asit (20 µg/ml)	24s	500	145*	±0,37

* $p < 0,0001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fark önemli (Dunnet T testi) kontrol (%1 distilled water).

KKD: Kardeş Kromatid Değişimi

DMSO: Dimetil sülfoksit

MMC: Mitomisin-C



Çizelge 4.1 Formik asit'in farklı dozlarıyla etkileşime giren insan lenfosit kültüründeki KKD oranları (A: negatif kontrol, B: 5 µg/ml, C: 10 µg/ml , D:15 µg/ml, E:20 µg/ml, F: pozitif kontrol MMC)

* $p < 0,0001$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fark önemli (Dunnet T testi). kontrol (%1 distilled water).

KKD ile formik asitin dozları arasındaki ilişkiyi göstermek amacıyla, pozitif ve negatif kontroller ile mukayeseli bir şekilde çizilen yukarıdaki çizelgede, formik asitin artan dozuna bağlı olarak KKD oranının da arttığı gözlemlenmiştir. Çizelgeden de anlaşılacağı üzere formik asit lenfosit kültüründeki hücrelerin DNA tamir mekanizmasını devre dışı bırakarak KKD ne sebep olmuştur ve hücrelerdeki KKD sayısı formik asitin dozunun artmasına bağlı olarak artmıştır.

Tablo 4.2 Kontrol ve Deney Gruplarının İnsan Lenfosit Hücrelerinde Replikasyon İndeksi

Gruplar	Muamele süresi	Toplam hücre sayısı	M1	M2	M3	Toplam RI oranı 24 saat (%)	RI \pm SEM (%)
Negatif kontrol	24s	500	35	45	420	2,77	\pm 0,12
Pozitif kontrol MMC (03 μ g/ml)	24s	500	455	20	25	1,14	\pm 0,02
Formik Asit (5 μ g/ml)	24s	500	87	110	303	2,43*	\pm 0,06
Formik Asit (10 μ g/ml)	24s	500	90	130	280	2,38*	\pm 0,01
Formik Asit (15 μ g/ml)	24s	500	100	135	265	2,33*	\pm 0,05
Formik Asit (20 μ g/ml)	24s	500	120	140	240	2,24*	\pm 0,07

* $p < 0,01$ kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fark önemli (Dunnet T testi). kontrol (%1 distilled water).

KKD: Kardeş Kromatid Değişimi

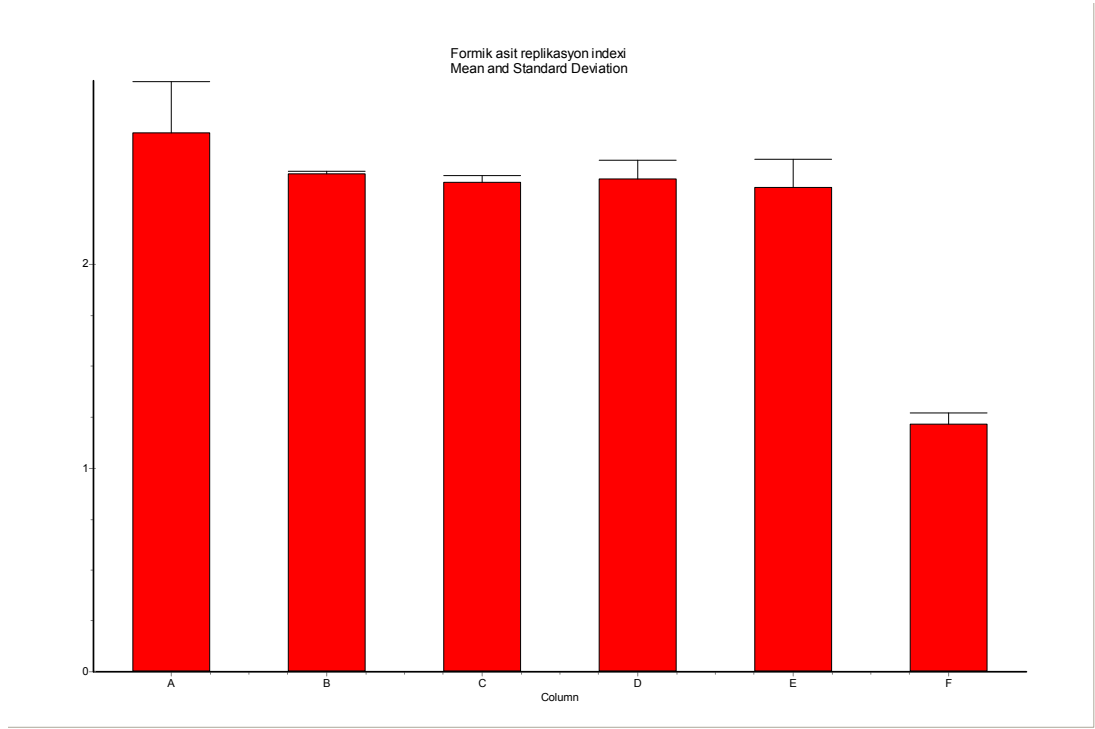
RI: Replikasyon İndeksi

M1: Mitoz 1

M2: Mitoz 2

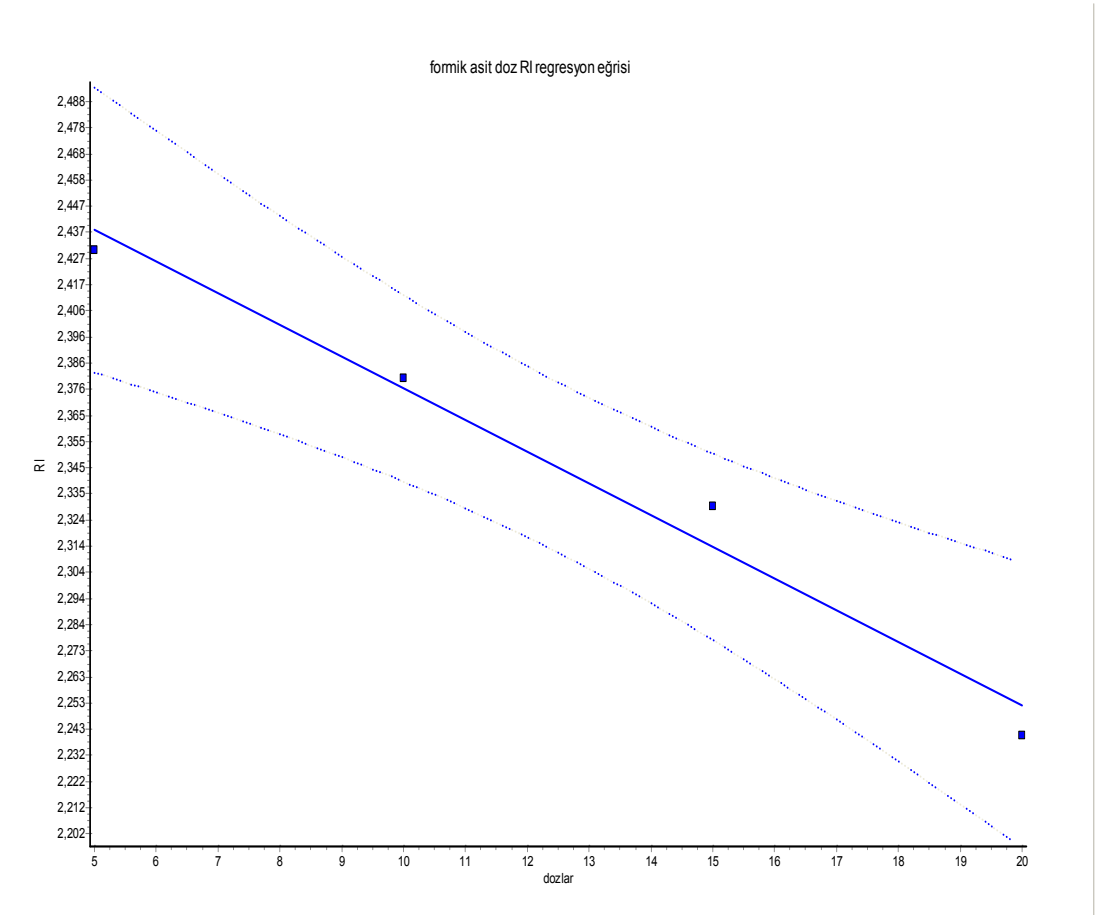
M3: Mitoz 3

MMC: Mitomisin-C



Çizelge 4.2 Formik asit'in farklı dozlarıyla etkileşime giren insan lenfosit kültüründeki Replikasyon indeksi (A: negatif kontrol, B: 5 µg/ml, C: 10 µg/ml, D:15 µg/ml , E: 20 µg/ml F: pozitif kontrol MMC)

Formik asitin farklı dozlarıyla lenfosit kültüründeki hücrelerin replikasyon indeksi arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla çizilen yukarıdaki çizelgede (Çizelge 4.2) de görüldüğü üzere, artan formik asitin dozuna bağlı olarak kültür ortamındaki lenfosit hücrelerinin replikasyon indeksleri de düşmektedir. Bu çizelgeden anlaşılacağı üzere formik asitin hücre bölünmesini baskılayarak buna bağlı olarak replikasyon indeksini düşürdüğü gözlemlenmiştir.



Çizelge 4.3 Formik asit'in farklı dozlarıyla replikasyon indeksi (RI) arasındaki regresyon

($r = -0,98$) çizelgesi

Yapılan denemeler sonrası formik asit'in 24 saat etkileştirme süresinin uygun olduğu daha fazla sürenin mitoz bölünmeyi engellediği saptanmıştır. Uygulan dozlar sonucunda replikasyon indeksini düşürdüğü ve formik asid' in farklı dozları ile replikasyon indeksi arasında negatif korelasyona ($r = -0.98$) olduğu saptanmıştır.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Suda çözünebilen ve son derece keskin kokulu olan formik asid, lateksten kauçuk eldesinden, yağları ve reçineleri çözmede, deri sanayisinde, kokulu esterler ve tuzların sentezinde ve bir takım kimyasal maddelerin sentezinde kullanılmaktadır. Ciltle teması sonucu koagülasyon nekrozuna bağılı olarak doku hasarı meydana getiren formik asidin absorpsiyonu sonucu ise hemoglobinüri, hemoliz ve asidoz gibi sistemik toksisite gelişebildiğı gibi diyalize rağmen akut böbrek yetmezliğine bağılı ölümler bile ortaya çıkabilmektedir [60-62].

İçerisinde tatlandırıcı olarak aspartam ihtiva eden ürünler kullanıldıkları taktirde aspartam ; aspartat, fenilalenin ve metanole ayrışır.Bu bileşenlerden oranı yaklaşık olarak % 10 olan metanol tek başına zararlı olmamasına karşın karaciğerde bulunan enzimler tarafından son derece toksik olan iki bileşene ayrışmaktadır.Metanol primer enzim reaksiyonu sonucu folmaldehite ayrışır. Uzun süreli maruz kalma sonucunda insanlarda kansere sebep olabilen formaldehit, sekonder enzim reaksiyonu sonucu vücutta uzun süre kalamadan hızlı bir şekilde formik aside metabolize edilir. İnsan sağlığı açısından son derece toksik olan formik asidin, hücrelerdeki mitokondrial fonksiyonu bozduğu bilinmektedir [63].

Çin hamsterlerinin ovaryum hücreleri üzerinde laktik asit, asedik asid ve formik asid ile yapılan bir çalışma sonucu bu asitlerin kromozomal aberasyona sebep oldukları ve bu etkilerinin ph düzey ile yakın ilişkili olduğu saptanmıştır [53].

Yapılan bir başka çalışmada formik asitin 4 farklı dozu (20, 40, 60, 80 µg/ml) insan periferel lenfosit kültüründe 24 saat etkileşim süresi boyunca hücreye etkisi incelenmiştir. Yapılan çalışma sonunda formik asitin tüm dozlarında mikronükleus (MN) frekansını artırdığı ve bölünme indeksini düşürerek apoptoz ve negroza sebep olduğu saptanmıştır [64].

Günümüzde klastojen ve mutajen maddelerin kromozomlar üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde kullanılan ve aynı zamanda kalıtsal hastalıkların teşhisinde de son derece duyarlı olan kardeş kromatid değişimi (KKD) diğere bir adıyla Sister Chromatid Exchange (SCE) yöntemi, lenfosit hücreleri üzerinde başarıyla kullanılmaktadır [65].

Yapılan in vitro bir çalışmada, Gemfibrozilin 4 farklı konsantrasyonunun (50, 100, 125, 150 µg/ml) insan periferal lenfosit kültüründe 24 saat muamele edilmesi sonucu Gemfibrozil'in; replikasyon indeksini düşürdüğü ve replikasyon indeksi ile gemfibrozilin farklı konsantrasyonları arasında negatif korelasyon olduğu, hücre bölünmesini baskıladığı ve negatif kontrolle karşılaştırıldığında doza bağlı olarak KKD' ni arttırdığı saptanmıştır [66].

Yapılan bir başka in vitro çalışmada ise tarım alanında yaygın bir şekilde insektisid olarak kullanılan acetamiprid (Acm) ve alpha-cypermethrinin (A-cyp) ayrı ayrı ve karışım halinde kullanılmaları durumunda insanlar üzerinde genotoksik riske sahip olup olmadıkları insan periferal lenfosit kültüründe KKD (Kardeş Kromatid Değişimi), Kromozom anomalisi (KA) ve Mikronükleus (MN) testleri kullanılarak araştırılmıştır. İnsan periferal lenfosit kültürü hücreleri ilk önce ayrı ayrı A-cyp'nin 5, 10, 15, 20 µg/ml'lik konsantrasyonlarına, Acm' nin ise 25, 30, 35 ve 40 µg/ml'lik konsantrasyonlarına ve daha sonra ise bu iki maddenin konsantrasyonlarının yarısı kadar konsantrasyonlarında karıştırılıp (A-cyp + Acm) 24 ve 48 saat muamele edilmiş ve bu çalışmanın sonucunda Acm ' nin tüm süre ve konsantrasyonlarda KA'nu , KKD ' ni ve yüksek üç konsantrasyonda MN oluşumunu istatistiksel olarak önemli derecede arttırdığı, mitotik indeksi (MI) ve Nükleer bölünme indeksini (NBI) bütün dozlarda, proliferasyon indeksini (PI) ise 35 ve 40 µg/ml' de 24 saatlik muamele için, 40 µg/ml de 48 saatlik muamele için önemli derecede düşürdüğü saptanmıştır. A-cyp' nin ise bütün süre ve konsantrasyonlarında KKD' ni ve KA' u ve düşük iki konsantrasyonda MN oluşumunu önemli derece arttırdığı, tüm konsantrasyonlarda MI' i, NBI' ni ve yüksek üç konsantrasyonda PI' ni önemli derecede düşürdüğü saptanmıştır. Acm ve A-cyp' nin tek başlarına çalışıldıkları konsantrasyonlarının yarısı kadar konsantrasyonlarda bile bir araya geldiklerinde en az ayrı ayrı kullanıldıklarındaki kadar ya da daha fazla genotoksik etki gösterdikleri saptanmıştır [19].

Antifungal bir ilaç olan Terbinafin ile yapılan bir diğer in vitro çalışmada ise Terbinafin' in farklı konsantrasyonlarının (0,1 µg/ml, 1µg/ml, 10µg/ml) insan periferal lenfosit kültüründe muamele edilmesi sonucu KKD, RI ve MI oranları incelenmiş ve çalışmanın sonucunda ise Terbinafin' in herhangi bir genotoksik etkisi tespit edilmemiştir [67].

Sonuç itibariyle yaptığımız bu çalışma ile Formik asid' in dört farklı konsantrasyonun (5, 10, 15, 20 µg/ml) insan periferal lenfosit kültüründe 24 saat süre ile muamele edilmesi sonucu formik asid' in;

- a) Replikasyon indeksini düşürdüğü ve formik asid' in farklı konsantrasyonları ile replikasyon indeksi arasında negatif korelasyon ($r = -0.98$) olduğu,
- b) Negatif kontrolde 2.77 olan olan mitotik indeksin, formik asid' in en üst dozunda 2.24 e düştüğü, dolayısıyla hücre bölünmesini baskıladığı,
- c) Negatif kontrolle karşılaştırıldığında konsantrasyona bağlı olarak KKD' ni de arttırdığı saptanmıştır.

Yapmış olduğumuz in vitro çalışmamız sonucunda günümüzde biyopestisid olarakta kullanılan ve doğal bir organik asid olan formik asit'in sitotoksik ve genotoksik etkilerini gösterdik. Formik asit ile ilgili daha detaylı bilgilerin elde edilmesi için in vivo çalışmaların yapılmasını öneriyoruz.

6.KAYNAKLAR

- [1] Agülođlu, S. ve Ortakaya, C., “Eritromycin’in İnsan Kromozomları Üzerine invitro Etkileri”, XI.Ulusal Biyoloji Kongresi, Edirne. 208-216 1992.
- [2] Kontelevtsev, S. V., “Biochemical and Genotokxicological Monitoring of Ecosytms with Special Reference to Lake Baikal and Northern Black Sea”, In: Molecular aspects of Oxidative Drug Metabolizing Enzymes Edited by E., Arınç, J.B.Schenkman and E.Hodgson .,Springer-Verlag Berlin Heidelberg.NATO.ASI.Series,Vol.H 90 pp:567-589,1995
- [3] Ulupınar, M., Alaş, A., “Balık Sitogenetiđi ve Laboratuar Teknikleri Kitabı”, I Baskı, s. 10, 2002.
- [4] Stich, H.F., Dunn, B.P., "Relationship between cellular levels of beta-carotene and sensitivity to genotoxic agents." Int J Cancer 38:713-717, 1986.
- [5] Tintinalli JE, Stapczynski JS, Kelen GD. Emergency medicine: a comprehensive study guide. 6th edn. New York: McGraw-Hill Companies, Inc.; 2003.
- [6] Naik RB, Stephens WP,Wilson DJ,Walker A, Lee HA. Ingestion of formic acid containing agents – report of three fatal cases. Postgrad Med J;56:451–6, 1980.
- [7] Wilson, R.F., Wilkins, R.J.: Formic Acid as Silage Additive for Wet Crops of Cocksfoot and Lucerne. J. Agric. Sci., Camb.,; 80: 225-231, 1973 .
- [8] Lattemae, P., Ohlsson, C., Lingvall, P.: The Combined Effect of Molasses and Formic Acid on Quality of Red-Clover Silage. Swedish J. Agric. Res.,; 26: 31-41, 1996.

- [9] Mumcu, E., Seydi ayı (Eskişehir) evresinden Toplanan Su ve Toprak rneklerinde Ames/Salmonella/Mutajenite Testi ile Bor Elementinin Mutajenitesinin Araştırılması., A.Ü Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2005.
- [10] Jonasson, J.A., “Analysis and interpretation of human chromosoma preparations.” Roonay, D.E., Czepulkowski, B.H., (Ed) Human Cytogenetics. Oir press Oxford-Washington DC.,1986.
- [11] Perry, P., Evans, HJ., “Cytological detection of mutagen- carcinogen exposure by sister chromatid exchange.” Nature Vol. 258: 121-124, 1975.
- [12] Wolff, S., Sister chromatid exchange. Annual Review of Genetics 11:183-201, 1977.
- [13] Nilsson, K., and Ponten, J., “Clasification and biological nature of established human hematopoietic cell lines.” Int. J. Cancer 15:321-341, 1975.
- [14] Teksen, F.,“Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ders Kitabı” Ankara Üniversitesi Sağlık Eğitim Fakültesi Yayınları No:4 2. Baskı,2006.
- [15] Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., “Concepts of Genetics”, Palme Yayıncılık, Ankara, 2011.
- [16] Başaran, N., “Tıbbi Genetik”, Bilim Teknik Yayınevi, 1985.
- [17] Mc Ghee, J.D., Felsenfeld, G., Nucleosome structure. Annu. Rev. Biochem 49:1115, 1980.
- [18] Passarge, E., Color Atlas of Genetics, 3rd edition 2007 Thieme.
- [19] Yavuz Kocaman, A., “Acetamidrid ve alpha-cypermethrin pestisidlerinin tek başına ve karışım halinde kullanıldıkları zaman insan periferal lenfositlerindeki in vitro genotoksik etkileri”, Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Adana, 2007.
- [20] Yakar, 1987 Kuru ve Gözükara, 2001.
- [21] Temizkan, G., Genetik (Temel Genetik). İ.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 276 s., 1994.
- [22] Kuru, M., Gözükara, S.E. Genetik. Palme Yayıncılık, Ankara, 360 s. 2001.

- [23] Bozcuk, A. N. Genetik. Palme Yayıncılık, Ankara, 320 s., 2000.
- [24] Ozban, N., Hücre Sitolojisi. İ.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 250 s., 1994.
- [25] <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/normalkaryotype.jpg>
(Erişim Tarihi: Mart 2013)
- [26] Demirsoy, A.. Yaşamın Temel Kuralları. Meteksan Matbaacılık ve Teknik Sanayi Tic. Ltd. Şti., Ankara, 560 s. 1991.
- [27] Topaktaş, M., Rengüzoğulları, E. Sitogenetik. Ç.Ü. Fen Fakültesi, Adana, 182 s., 1995.
- [28] Suludere, Z.. Hücre Biyolojisi. A.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, Ankara, 458 s., 1995.
- [29] <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/basics/chromosome>
(Erişim Tarihi: Mart 2013)
- [30] Akman, Y. Bitki Biyolojisine Giriş, Botanik. Palme Yayıncılık, Ankara, 220 s., 1998.
- [31] Solak, M. Moleküler Genetik ve Rekombinant DNA Teknolojisi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Yayın No:5, Afyon, 2000.
- [32] Yıldırım, A., Bardakçı, F., Karataş, M., Tanyolaç, B., ‘‘Moleküler Biyoloji, Protein Sentezi ve Yıkımı’’, Nobel Yayın Dağıtım, 2007.
- [33] World Health Organization (WHO)., Revision of the WHO Guidelines for Drinking Water Quality, Geneva, Switzerland, 1996.
- [34] Boorman GA, Dellarco V, Dunnik JK, Chapin RE, Huntr S, Hauchman F, Gardner H, Cox M, Sills RC., Drinking water disinfection by-products: review and approach to toxicity evaluation. Environ Health Perspect 107 (1): 207–217, 1999.
- [35] Soffritti M, Belpoggi F, Lenzi A, Maltoni C., Results of long term carcinogenicity studies of chlorine in rats. Ann. NY Acad. Sci, 26: 189–208, 1997.

- [36] Koivusalo M, Pukkala E, Vartiainen T, Jaakkola JJ, Hakulinen T., Drinking water chlorination and cancer—a historical cohort study in Finland. *Cancer Causes Control*, 8: 192–200, 1997.
- [37] Aksu, P., Gül, S., Özkan, O., Nur, G., Kaya, Ö.T., 2008. Evaluation of the Acute Toxicity and genotoxicity of NaOCl on *Acanthalburnus microlepis* (De-Filippi 1863) *Fresenius Environmental Bulletin*, 17:3, 298-302, 2008.
- [38] Monarca, S., Zani, C., Susan, D., Richardson, D., Thruston, Jr., Massimo, M., Donatella, F., Milena, V., A new approach to evaluating the toxicity and genotoxicity of disinfected drinking water, *Water Research*, 38, 3809–3819, 2004.
- [39] Karol, S., Hücre Biyolojisi. A.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, Ankara, 451 s., 1998.
- [40] Gözükara, E.M. Biyokimya. Ofset Repronat Ltd. Şti., Ankara, 1104 s., 1990.
- [41] Natarajan, A. T., Obe, G.: Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: Cytogenetic Assays. In: Heddle JA(ed) Mutagenicity. New Horizons in Genetic Toxicology. Academic Pres, New York, 1-213, 1982.
- [42] Ergün, S.: Sjögren Sendromlu hastalarda genomik instabilitenin sitogenetik bir biomarker olan kardeş kromatid değişim sıklığı yöntemiyle araştırılması. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bil. Ens. Ağız, Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul, 2005.
- [43] Barch, J.M., “The act cytogenetic laboratory manual. Gustashow KM. Chromosome stains.” Second edition. Raven Press, Ltd. 1185 avenue of the America, New York, 1991.
- [44] Lavappa, K.S., and Yerganian, G., “Spermatogonial and meiotic chromosomes of the Armenian hamster *Cricetulus migratius*.” *Exp. Cell. Res.* 61:159-172, 1970.
- [45] Altıntaş, N., Örenay, S., Aşçı, M., Reyhan, E., Türk, M., Yolasığmaz, A.: Karaciğer kist hidatiği tedavisinde albendazol kullanan hastalarda kardeş kromatid değişimi (KKD) Çalışması. *Türkiye Parazitol. Derg.* 29, 4: 235-237, 2005.

- [46] http://tr.wikipedia.org/wiki/Formik_asit
(Erişim Tarihi: Mart 2013)
- [47] <http://www.kimyasanal.net/konugoster.php?yazi=nejf3nt7q>
(Erişim Tarihi: Mart 2013)
- [48] http://en.wikipedia.org/wiki/Formic_acid
(Erişim Tarihi: Mart 2013)
- [49] <http://www.nedirbilelim.com/dizin2/formik-asit.html>
(Erişim Tarihi: Mart 2013)
- [50] <http://www.technologyreview.com/news/410135/hydrogen-fuel-from-formic-acid/> (Erişim Tarihi: Mart 2013)
- [51] <http://www.alkokimya.com/urunler.php>
(Erişim Tarihi: Mart 2013)
- [52] Altuğ, T., “Gıda Katkı Maddeleri”, *Hekim ve Yaşam Dergisi*, Haziran 99, 29- 31, 1999.
- [53] Morita, T., Takeda, K. and Okumura, K., “Evaluation of clastogenicity of formic acid, acetic acid and lactic acid on cultured mammalian cells”, *Mutat Res.*, . 240; 3, Pages 195-202, 1990.
- [54] Uzun, S., “Sodyum Hipoklorite maruz kalmış kişilerin lenfositlerindeki mikronükleus sıklığının araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim dalı, Kayseri, 2007.
- [55] Rencüzoğulları, E. And Topaktaş, M., “The relationship between Quantities of Bromodeoxyuridine and Human Peripheral Blood with Determination of the Best Differential Staining of Sister Chromatids Using Chromosome Medium-B”. *Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 5(3), 19-24, 1991.
- [56] Frick, M.H., Elo, O., Haapa, K., Heinonen, O.P., Heinsalmi P., Helo P., Engl N., “Helsinki Heart Study: Primary-Prevention Trial with Gemfibrozil in Middle-Aged Men with Dyslipidemia” *J. Med.* 317: 1237-1245, 1987.
- [57] Speit, G., Haupter, S., On the mechanism of differential giemsa staining of bromodeoxyuridine substituted chromosomes. II. Differences Between the

- demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns. *J. Hum. Genet.* 70, 126-129, 1985.
- [58] Kertsen, S., Desvergne, B., and Wahli, W., "Roles of PPARs in health and disease" *Nature* May 25; 405(6785):421-4, 2000.
- [59] Titenko-Holland, N., Ahlborn, T., Lowe, X., Shang, N., Smith, M.T., Wyrobek, A.J., "Micronuclei and developmental abnormalities in 4-day Mouse embryos after paternal treatment with acrylamide". *J. Environ. Mol. Mutagen.* 31:206-217, 1998.
- [60] Karundasa KP, Perera C, Kanagaratnum V, Wijerathne UP, Samarasingha I, Kannangara CK. Burns due to acid assaults in Sri Lanka. *J Burn Care Res*;31:781–785, 2010.
- [61] Chan TC, Williams SR, Clark RF. Formic acid skin burns resulting in systemic toxicity. *Ann Emerg Med*; 26(3):383-6, 1995.
- [62] Sigurdsson J, Bjornsson A, Gudmundsson ST. Formic acid burn--local and systemic effects. Report of a case. *Burns Incl Therm Inj*; 9(5):358-61, 1983
- [63] <http://recipes.howstuffworks.com/question536.htm>
- [64] Erciyas, A., "Formik Asit'in İnsan Lenfosit Kültüründe Mikronükleus Sıklığı Üzerine Etkilerinin Araştırılması" Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Kars, 2009
- [65] Huang, C.C., " Induction of a high incidence of damage to the X chromosomes of *Rattus (Mastomys) natalensis* by base analogues viruses and carcinogens." *Chromosoma* 23:162, 1967.
- [66] Uludaş, E., "Gemfibrozil'in Kardeş Kromatid Değişim (KKD=SCE) Oranına Etkilerinin İnsan Periferik Lenfosit Kültüründe İncelenmesi", Yüksek Lisans Tezi, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kars, 2013.
- [67] Bayel, İ., " Terbinafin'in İnsan Lenfosit Kültürlerindeki Etkilerinin Kardeş Kromatid Değişimi Yöntemi ile İn Vitro Araştırılması" Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Mersin, 2006.

7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Duygu DEMİRCİ

Doğum Yeri : Şenkaya/ ERZURUM

Doğum Tarihi : 01.11.1987

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Gebze Sarkuyusan Lisesi / 2006

Lisans : Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü / 2011

Yüksek Lisans : Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji
Anabilim Dalı (Moleküler Biyoloji) / 2013