

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

**FORMİK ASİT'İN İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRÜNDE *İN VİTRO***  
**MUTAJENİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Zeynep TAYFA**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Danışman**  
**Doç. Dr. Süleyman GÜL**

**2010**  
**KARS**

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Zeynep TAYFA'nın Doç.Dr. Süleyman GÜL'ün danışmanlığında yüksek lisans tezi olarak hazırladığı “**FORMİK ASİT'İN İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRÜNDE KROMOZOMLAR ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**” adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy.....ile kabul edilmiştir.

...../...../2009

	Adı Soyadı	İmza
Başkan	: Doç. Dr. Süleyman GÜL	.....
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Gey	.....
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Oktay ÖZKAN	.....

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun ..../..../2009 gün ve ...../..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Abdullah Doğan  
Enstitü Müdürü

## ÖNSÖZ

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır. Çalışmada formik asit'in insan lenfosit kültüründe kromozomlar üzerine etkileri incelenmiştir.

Bu çalışmanın tez konusu seçiminde ve yürütülmesinde, bana gerekli laboratuvar olanakları sunan, yol gösteren, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam, Doç. Dr. Süleyman GÜL'e, harzaman bana destek olan nişanlım Sorel KEÇELİ'ye, tezimde bana yardım eden arkadaşlarım Duygu SAĞIN ve Evren KOÇ'a teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b>	iii
<b>ABSTRACT</b>	iv
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	v
<b>RESİMLERİN LİSTESİ</b>	vi
<b>ÇİZELGELERİN LİSTESİ</b>	vii
<b>1.GİRİŞ</b>	1
<b>2.GENEL BİLGİLER</b>	3
2.1 Formik asit	3
2.1.1 Metanol Zehirlenme Belirtileri	4
2.1.2 Formik Asidin Kullanıldığı Yerler	5
2.1.3 Gıda Katkı Maddeleri	6
2.2..Kromozomlar	7
2.2.1 Kromozom Morfolojisi	12
2.2.2 Sentromer	13
2.2.3 Primer Boğum	15
2.2.4 Telomer	15
2.2.5 Satellit	15
2.3 Mutasyonlar	15
2.3.1 Gen Mutasyonları	16
2.3.2. Kromozom Mutasyonları (Kromozom Yapı Değişiklikleri)	16

2.3.3 Genom Mutasyonları (Kromozom Sayı Mutasyonları)	18
2.4 Mutajen Etkenler	19
2.5. Analiz Yöntemleri	20
2.5.1 Kromozom Tipi Hataların Belirlenmesi	20
2.5.1.1 İn-Vivo Kromozom Hatası Testi	21
2.5.1.2 İn-Vitro Kromozom Hatası Testi	21
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>22</b>
3.1 Gereçler	22
3.1.1 Demirbaş malzemeler	22
3.1.2 Sarf malzemeler	23
3.1.3 Kullanılan kimyasal maddelerin eriyiklerinin hazırlanması	24
3.2 Yöntem	27
3.2.1 Çalışma Grubu	27
3.2.2 Kan Örneklerinin Alınması	27
3.2.3 Kültür Tekniği	27
3.4 Kromozom Anormalliklerini (Chromosomal Aberration=CA) Saptamak	
Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması	
ve Boyanması	27
3.4.1 Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması	27
3.5 Mikroskopik İnceleme	29
3.6 İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi	29

<b>4.BULGULAR</b>	30
4.1 Formik Asitin İnsan Kromozomlarına Etkisi	34
<b>5- SONUÇ ve TARTIŞMA</b>	36
<b>6.KAYNAKLAR</b>	39
<b>7. ÖZ GEÇMİŞ</b>	43

## ÖZET

Bu çalışmanın amacı, karınca asidi olarak bilinen formik asidin etkilerinin incelenmesiydi. İnsan kan lenfosit hücreleri formik asidin 3.5, 5, 10, 15 ve 20, 25, 40 µg /ml'lik dozları ile 24 saat etkileşime bırakıldı. Pozitif kontrol olarak kullanılan mitomisin C (MMC, 0.3 µg/ml) ve negatif kontrolle karşılaştırıldığında formik asidin 24 saatte tüm uygulama derişimlerinde, kromozomal aberasyonların sıklığını belirgin bir şekilde arttırdığı gözlenmiştir. 3.5µg /ml derişimi dışında, tüm uygulama derişimlerinde kromozom ve kromatid kırıkları, kardeş kromatid birleşmeleri ve kromatid değişimleri saptandı. Bazı formik asit konsantrasyonları ve pozitif kontrol, poliploidi gözlenmesine sebep oldu. Sonuçlarımız formik asidin insan lenfosit kromozomları üzerine *in-vitro* olarak klastojenik ve anöjenik etkisinin olduğunu göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** Formik asit, Mitomisin C (MMC), lenfosit kültürü, İnsan kromozomları, Kromozom aberasyonları.

**ABSTRACT**

The aim of this study is, observing the effects of formic acid which is also known as the ant acid. The lymphocyte cells of the human blood were exposed to interaction with 3.5, 5, 10, 15, 20, 25 and 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  doses of formic acid for 24 hours. When compared with negative control and with mitomycin C(MMC, 0.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) -which is used as positive control-, it is observed that formic acid is rising the frequency of chromosomal aberration significantly at all appliance concentrations in 24 hours. Chromosome and broken chromatids, mate chromatid coalition and chromatid changes were detected at all appliance concentrations except the 3.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration. Some formic acid concentrations and positive control provided the observation of polyploid. The results showed that formic acid has clastogenic and aneugenic effects as *in-vitro* on human lymphocyte chromosomes.

**Keywords:** Formic acid, mitomycin C(MMC), lymphocyte culture, human chromosomes, chromosomal aberrations.



## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Kısaltmalar

AA-AH	: Anafaz hataları
BN	: Binükleer
KKD	: Kardeş kromozomlarda kromatid değişim
LC	: Letal doz
MN	: Mikronükleus
Ns	: Önemsiz
PHA	: Fitohemaglutinin
SCE	: Kardeş kromatid değişimi
SHE	: Suriye Hamster Embriyosu

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

	<u>Sayfa no</u>
Resim 1 Kromozomların yapısı, a) Dıştan görünüşü, b) İçten görünüşü	13
Resim 2 Sentromerin yerine göre kromozom tipleri	14
Resim 3 Normal bireye ait bir metafaz	30
Resim 4 Anamolili bir metafaz	31
Resim 5 40 µg formik asit verilen metafaz görüntüsü	32
Resim 6 25 µg formik asit verilen metafaz	33
Resim 7 Poliploidi	34

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

	<u>Sayfa no</u>
Çizelge 1 Bazı türlerin diploid kromozom sayıları	9
Çizelge 2 İnsanın idiogramı	11
Çizelge 3 İnsanda kromozom grupları	12
Çizelge 4 Formik asit'in değişik dozları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültürü kromozomlarında kromozom aberasyonu sıklığı	35

## 1. GİRİŞ

Canlı vücudunun başlıca yapı taşı hücrelerdir. Bir insanın vücudunda trilyonlarca (70 kg'lık bir insan vücudunda ise 70 trilyondan fazla) hücre bulunur. Bu hücrelerin her birinin çekirdeğinin içinde bulunan DNA molekülü, kendi eksenini etrafında kıvrılarak yükselen bir çift spiral yapı şeklindedir. Örneğin, bir insan vücudundaki bütün DNA moleküllerini çözerek arka arkaya dizesek, dünya ile güneş arasında 400 defadan fazla gidip gelenebilmektedir. Bir organizmaya ait bütün bilgiler DNA moleküllerinde 4 özel nükleotidin (A, T, G ve C) diziliş sırasına göre kodlanmış olarak bulunur. DNA üzerindeki bütün bilgiler gen adı verilen özel bölümlerde yer alır. Bir organizmanın vücudunda ise on binlerce gen bulunur ve her bir organ farklı sayıda gen tarafından kontrol edilir. Örnek olarak; insan vücudunda 50 000 den fazla gen bulunur ve bunlardan 29 930 tanesi beyinde görev yapar [1].

Gen denilen parçacıklardan oluşan ve kuşaktan kuşağa aktarılan madde "genetik madde" adını almaktadır. Genetik maddenin iki esas görevi vardır ve bunlar;

- 1) Kendisine tıpa tıp benzeyen ya da kopyası olan maddeleri oluşturmak için replikasyon olayını gerçekleştirmek,
- 2) Enzimler ve hücre metabolizması için gerekli olan diğer moleküllerin sentezi ile bilgi aktarım görevini yerine getirmektir. Ancak, bir sonraki nesile "yaşam sırasında kazanılmış olan özellikler değil, yalnızca genlerdeki bilgiler" aktarılmaktadır [1].

Bir hücredeki genetik materyalin tamamı o organizmanın genomunu oluşturur. Genom bir organizmanın DNA'sının tamamı olup o organizmanın yaşamı boyunca tüm yapı ve aktivitelerini belirler [2].

Canlıların yaşamlarını sürdürdükleri sürece birbiri ile etkileşen en önemli iki unsur; türe ait genom ve genomun çevresidir. Genetik karakteristiği çevreden etkilenir ve bu etkileşim gelecek nesillere aktarılır. Çevre kalıcı olarak değişmeden devam ederse, bu şartlara uygun genetik yük gelecek nesillere değişmeksizin aktarılır ve etkileşim olumlu olarak devam eder. Eğer çevre kalıcı olarak değişirse, çevre ile genetik yük

arasında yeni ortaya çıkan uygunsuzluk, genetik karakteristikte yeni bir düzenleme ile sonuçlanır [3].

Tüm canlılar gibi insanda da genetik olarak atalarının yaşadığı çevresel şartlara uyumlu durumda olmaktadır. Bununla birlikte pek çok bilgi, insanoğlunun son üç yüz yılında büyük bir çevresel kalıcı değişim ile karşılaştığını göstermektedir. Böylece insan çevre-gen uyumsuzluğunun içinde yaşamakta ve pek çok kronik hastalık (diyabet, hipertansiyon, kanser) ile karşılaşmaktadır [4].

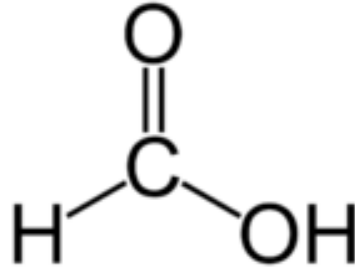
Bireyin kalıtsal özelliklerinin ortaya çıkmasını sağlayan genetik şifre, herhangi bir nedenden dolayı ( X ışını, radyasyon, ultraviyole, bazı ilaç ve kimyasallar, ani sıcaklık değişimleri vb. maddelerle ) bozulabilmektedir. Bu durumda DNA' nın sentezlediği protein veya enzim bozulur. Bunun sonucunda canlının, proteinden dolayı yapısı, enzimlerinden dolayı metabolizması değişmektedir. Bir gen mutasyona uğradıktan sonra kararlı hale gelir ve tekrar eski haline dönmek için herhangi bir eğilim göstermez. Genetik maddede gen rekombinasyonundan başka nedenlerle ve ani olarak oluşan değişikliklere mutasyon denilmektedir. Mutasyon terimi genel olarak, kromozom sayısının değişmesini ve genlerdeki değişiklikleri kapsar. Genetik maddenin miktarında, organizasyonunda ya da yapısındaki değişikliği ifade etmekte kullanılmaktadır [1]. Günümüzde tüm canlıları tehdit eden çevresel tehlikeler değişmekte ve farklı boyutlar kazanmaktadır. İnsanlığın kullanımına sunulmuş 2 milyon çeşitten fazla kimyasal madde mevcut olup, bunlara her yıl ortalama 2 000 – 4 000 yeni kimyasal madde eklenmekte ve kullanıma sunulmaktadır [5]. Bu maddelerin yanlış kullanılmaları, maddeye maruz kalan insanlarda ciddi hastalıkların oluşmasına ve kanser vakalarının artmasına sebep olduğu saptanmıştır. Bu maddeler insanlarda tedavisi mümkün olan geçici rahatsızlıklar yapabildiği gibi, en önemlisi ve en tehlikelisi olan, ayrıca tedavisi de olmayan kalıtsal yapıda oluşturabilecekleri DNA hasarlarının da ortaya çıkmasına sebep olurlar. [6].

Bu çalışmanın amacı, *in-vitro* olarak formik asidin insan kromozomlarının üzerine etkisinin araştırılmasıdır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Formik Asit:

**Formik asit**, HCOOH, tek karbonlu karboksilik asittir. Metanoik asit olarak da bilinir. Formik asit, karbonil karbonuna bağlı alkil grubu içermemesiyle en basit karboksilli asit özelliği taşır [7].



**Formik asit**

Formik asit karınca asidi olarak da bilinir. Hatta Almancası direk karınca asidi anlamına gelen, ‘Ameise Säure’ dir. Nedeni de karıncaların saldırı veya savunma amacıyla bu asidi yani formik asidi kullanıyor oluşları ve ilk olarak birçok karıncanın damıtılması sonucu elde edilmesidir [8].

Formik asit su ve çoğu polar organik çözücü ile çözünebilmekte, hidrokarbonlarda da bir dereceye kadar çözülebilmektedir. Hidrokarbonlarda ve gaz halindeyken, bireysel molekül yapı yerine hidrojen-bağlı monomer çiftinden oluşur. Hidrojen-bağlı eğilimi sayesinde, gaz halindeki formik asit ideal gaz kanunlarına aykırı 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 [9].

Deri ile temas ettiğinde yakar. 160°C’ye kadar ısıtılırsa, karbondioksit ve hidrojene ayrışır. Tabiatta, odun katranında ve ısırğan otunda, karıncalarda, terde, idrarda ve et suyunda serbest olarak bulunur [10].

Son araştırmalarda formik asitin, kolay taşınabilen ve güvenli bir hidrojen yakıt pili kaynağı olabileceği tespit edilmiştir. Almanya'nın Rostock kentindeki Leibniz Kataliz Enstitüsü'nden Matthias Beller ve meslektaşları formik asidi, genel bir koruyucu ve antibakteriyel eşliğinde, dūřuk sıcaklıklardaki hidrojen gazına çevirmenin bir yolunu buldular [11].

Metil alkol vücutta metabolizma sonucu formaldehit ve formik aside dönüşür. Toksisitesi de formik asidin oluşturduğu asidoza bağlıdır. Asidoz sonucu retinada sinir tahribatı ve buna bağlı olarak körlük ve daha ileri safhada ölüm meydana gelebilmektedir [12].

### **2.1.1 Metanol Zehirlenme Belirtileri**

Metil alkol, vücutta metabolizmaya uğramadığı zaman zararsız ve sadece sarhoş edici bir etkisi bulunmakla birlikte, vücutta dönüştüğu formik asit zehirlenmeye neden olmaktadır. Kandaki düzeyi 20 miligram/100ml üstünde olan dozlar toksik, yani zehirleyici doz olarak kabul edilmektedir. 40 miligram/100ml üstü çok ciddi bozukluklara yol açmakta, 80-100 miligram/100 ml düzey genellikle sınır düzeyi olarak kabul edilmektedir. Diğer bir deyişle içilen metil alkol miktarına bağlı olarak, içilen 4-15 ml miktar körlük, 15-100 ml dozda ölüm meydana gelebilmektedir.

Odun talaşının damıtılmasıyla elde edilen ve endüstride boya inceltici, teksir makine sıvısı, antifriz, cam temizleyici gibi maddelerin yapımında kullanılan metil alkol (metanol) aynı zamanda yasadışı olarak sahte içki ve kolonya yapımında kullanılmaktadır. Bu şekilde ağızdan alınması sonucu vücutta metanol zehirlenmesi oluşur. Metanol zehirlenmesi hakkında aşağıda açıklayıcı bilgi verilmiştir:

Metil alkol alındıktan sonra ilk 5 saatte sarhoşluk ve gastrit olarak karşımıza çıkar. 30 saatten sonra ciddi metabolik asidoz (biriken asit nedeniyle kanın pH değerinin asit hale gelmesi ) gelişir. Asıl zehirlenme belirtileri metil alkol alımından 10-24 saat sonra görülmeye başlar. Toksisite, oluşun asidozun derecesine bağlıdır ve başlıca aşağıdaki belirtiler 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

### **2.1.2 Formik Asidin Kullanıldığı Yerler**

1. Tekstil sanayi boyama ve finishing işlemlerinde,
2. Çeşitli kimyevi madde imalatlarında (Formiyatlar, esterler, oksalit asit vs.),
3. Çamaşır temizleme fabrikalarında,
4. Zirai mücadele ilaçları imalinde,
5. Soğutucu imalinde,
6. Kozmetik sanayisinde lak imalinde,
7. Elektroliz ile metal kaplama sanayisinde solvent olarak,
8. Ayna imalinde,
9. Deri sanayisinde,
10. Tıp dalında lokal anesteziilerde, gıda sanayisinde, matbaa mürekkep imalinde,
11. Parke cila imalinde,



12. Akrilik elyaf imalinde,
13. Plastifiyon imalinde,
14. Ekmek mayası imalinde,
15. Formaldehit imalinde,
16. Sunta imalinde ve çeşitli imalatlarda solvent olarak kullanılır [12].

### **2.1.3 Gıda Katkı Maddeleri**

Gıda katkı maddeleri, gıdalarda mikrobiyolojik bozulmayı önleme ve dayanıklılığı arttırma, besleyici değeri koruma, teknolojik işlemlere yardımcı olma, renk, görünüş, lezzet, koku gibi duyuşal özellikleri düzeltme gibi pek çok amaçla katılan maddelerdir [13].

Formik asit gazlı içecekler, meyve ve sebze konservelerinde koruyucu madde olarak kullanılmaktadır [14].

Gıda katkı maddelerinin kullanılması ile ilgili tarihsel gelişmeler incelendiğinde, M.Ö. 3 000 yıllarında et ürünlerini kürelemede tuzdan yararlanıldığı, M.Ö. 900 yıllarında ise tuz ve odun tütsüsünün gıda saklama yöntemleri olarak kullanıldıkları görülmektedir. Ortaçağlarda etlere koruyucu amaçla tuz ve tütsünün yanı sıra katılan nitratın etin rengini olumlu yönde değiştirmek ve çürümeyi önlemek amacıyla kullanıldığı bilinmektedir. M.Ö.50. yılda baharatlardan lezzet verici olarak yararlanılmış, gıda boyaları ise günümüzden yaklaşık 3 500 yıl kadar önce Mısırlılar tarafından renklendirici amaçla kullanılmışlardır. 19yy. daki hızlı şehirleşmenin paralelinde katkı maddelerinin kullanımları, özellikle gıdaları bozulmalara karşı koruma amacıyla yaygınlaşmış olup, günümüzde ise bu maddeler gelişen gıda teknolojisinin vazgeçilmez bir parçasını oluşturmuşlardır [13].

Gıda katkı maddeleri gıdalara istenilerek katılan maddeler olup, bu maddelerin özellikleri ve gıdalarda kullanım sınırları dünyada uluslar arası düzeyde araştırmalarla ele alınan bir konudur. Bu amaçla Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) ve

Gıda Tarım Örgütü (FAO) nün oluşturduğu gıdalarla ilgili komisyon (CAC) ve bu kuruluşun gıda katkı maddeleri ile alt komitesi olan Birleşik Gıda Katkı Uzman Komitesi (JECFA) 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 ADI 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 Topluluğu (EC) tarafından da benimsenmiş olup, bu topluluğun 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 ancak ülkede etkin bir kontrol sisteminin kurulması ile gerçekleşebilir. Gerek katkı maddeleri kullanımında, gerekse genel anlamda gıda tüketiminde Toksikoloji biliminin öncülerinden Paracelcus (1493-1541)'un "Her madde toxindir, ancak toxin ile ilacı birbirinden ayıran dozdur" ifadesi de unutulmamalıdır [13].

## **2.2 Kromozomlar**

Bölünme halinde olmayan hücrelerde, genetik materyal kromatin olarak adlandırılan şekilsiz ve granüler bir yapı halindedir. Kromatinin boncuk dizisini andıran yoğun

spiral yaptığı bölgeler kromomer olarak adlandırılır. Hücre bölünmeye başladığında kromatin daha sıkışık ve kitlesel bir yapı kazanarak kromozomları oluşturur. Kromozomlar en iyi hücre bölünmesinin metafaz ve anafaz safhalarında görülürler [15-17].

Kromozomlar üzerinde birbirinden farklı boyanma özelliğine sahip iki ayrı kısım vardır. Bunlardan koyu boyanan bölgeler heterokromatin, açık boyanan bölgeler ökromatin olarak adlandırılır. Genetik olarak inaktif olan heterokromatin bölgeler sıkıca katlanmış kromozom ipliklerinden oluşmaktadır [16-18 ].

Her canlı türünün kromozom sayısı, şekli ve yapısı kendine özgü ve sabittir. Kromozom sayısı ile canlının organizasyon derecesi arasında bir ilişki bulunmamaktadır. Bir kromozomun uzunluğu 0.2 ile 50 µm arasında değişmektedir. Çapı ise; 0.2 ile 2 µm arasındadır. İnsan kromozomları genellikle 4-6 µm uzunluğundadır [16,19].

Diploid canlıların somatik hücrelerinde ve eşey hücrelerindeki kromozom sayıları birbirinden farklıdır. Somatik hücrelerde her kromozom çeşidinden bir çift bulunur. Gerek anadan gerek babadan gelen kromozomlar zigotta çiftler teşkil ederler. Bu çiftlere homolog kromozomlar denilir. Bu durumda eşey hücrelerinde “n” sayıda bulunan kromozomlar zigottan itibaren soma hücrelerinde “2n” sayıda olurlar. Bu sayı insan için 23 çift (46), *Ascaris* için 2 çift (4), *Drosophila melanogaster* için ise 4 çift (8) dir [18,20].Çizelge 3.1’de bazı türlere ait canlıların diploid kromozom sayıları görülmektedir.

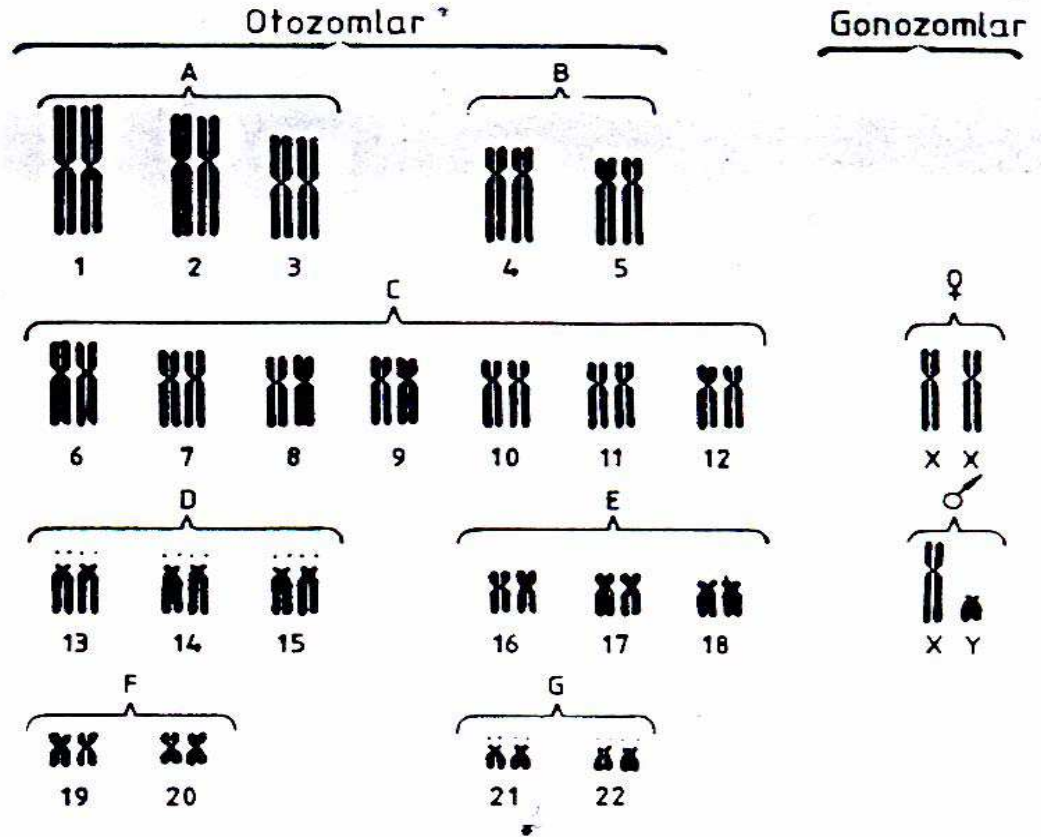
**Çizelge 2.2.1** Bazı türlerin diploid kromozom sayıları [18].

Çizelge.2.2..1. Bazı türlerin diploid kromozom sayıları (Bozcuk, 2000). <b>Denek Adı Tür adı Diploid No</b>	
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 aestivum</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
Bakla <i>Vicia faba</i>	12
Bira mayası <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16-32
<i>Aspergillus nidulans</i>	8
<i>Neurospora crassa</i>	7
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	16

Bir bireye ait kromozomların sayıları, biçim ve büyüklükleri o ferden karyotipini oluşturur. Farklı karyotiplerin karşılaştırılması amacı ile bir karyotipteki kromozomların uzunlukları, uzun ve kısa kolların birbirine oranı ve sentromerin yeri göz önüne alınarak çizilen şematik şekillerine idiogram denir [16]. (Çizelge2.2.2). İnsanın 22 çift olan otozomları 7 grupta toplanmaktadır

Çizelge:2.2.2 İnsanın idiogramı [16]

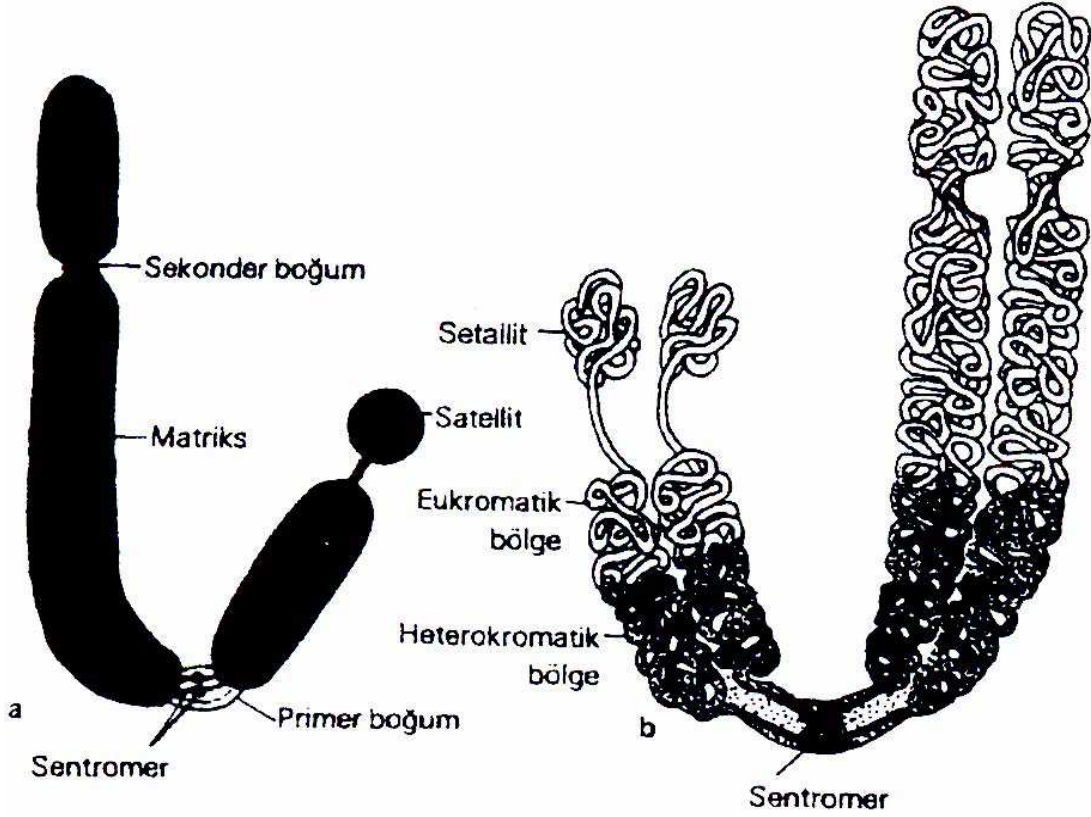


**Çizelge:2.2.3** İnsanda kromozom grupları [16]

Grup	Kromozomlar	Boy	Biçim
A	1-3	Büyük ~	Metasentrik
B	4-5	Büyük	Submetasentrik
C	6-12 ( ve X )	Orta	Submetasentrik
D	13-15	Orta	Akrosentrik
E	16-18	Orta -Küçük	Submetasentrik
F	19-20	Küçük	~Metasentrik
G	21-22 ( ve Y )	Çok küçük	Akrosentrik

### 2.2.1 Kromozom Morfolojisi

Hücre bölünmesinin metafaz evresi kromozomların en iyi gözleendiği ve incelendiği evredir. Metafaz evresinde silindir şeklinde görülen kromozomlar en kısa ve en kalın hallerinde olurlar ve tipik şekillerini gösterirler. Bu safhadaki bir kromozomda genel olarak sentromer, primer boğum, sekonder boğum, telomer ve satellit kısımları ayırt edilebilir [21-22 ].



Şekil 2.2.1.1. Kromozomların yapısı, a) Dıştan görünüşü, b) İçten görünüşü [21].

**2.2.2 Sentromer:** Primer boğumda yer alan ve kinetokor denilen küçük bir granül içeren parlak açık bölgeye sentromer denir. Sentromer kromozomların iğ ipliklerine bağlanmasında ve kutuplara çekilmesinde görev alır. Sentromeri bulunmayan kromozomlar hücre bölünmesine katılamazlar ve yok olurlar [23].

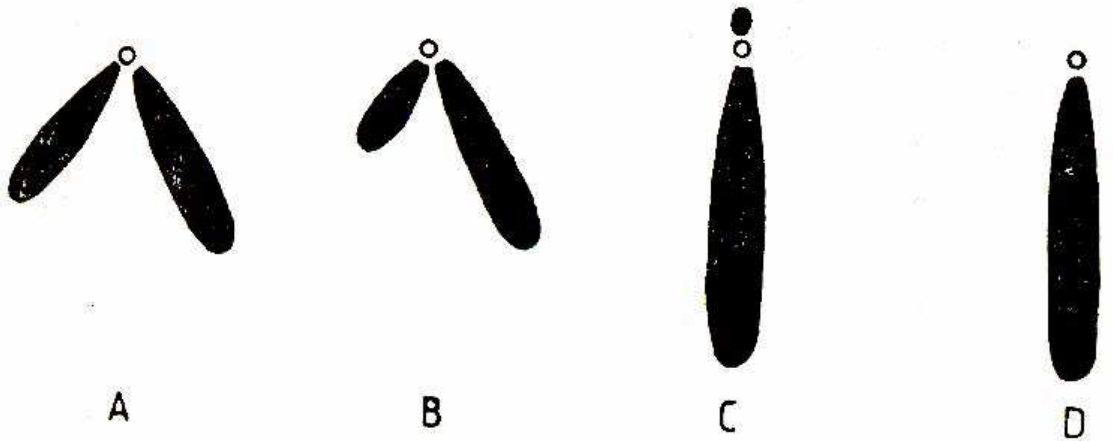
Çoğunlukla kromozomlar bir tane sentromer içerirler ve monosentriktirler. Bununla beraber iki (disentrik) veya daha fazla sayıda (polisentrik) sentromer içeren kromozomlar olduğu gibi sentromeri bütün kromozom boyunca yayılmış halde (diffüz-holosentrik) olan kromozomlara da rastlanmaktadır. Bu tip kromozomlar sopa şeklinde olurlar ve kromozomun uzun eksenini iğ ipliğinin uzun eksenine dik olarak, kromozomlar ise birbirine paralel olarak düzenlenirler ve kutuplara bu şekilde çekilirler. Bazı böceklerde (Hemiptera), Luzula adı verilen bitkide bu şekilde belirli bir yeri olan sentromerler bulunmaz [20,21].



Her kromozomdaki sentromerin yeri, kromozoma onun karakteristik şeklini vermekte ve bu da spesifik genlerin yerini tarif etmeye yardımcı olmaktadır [24].

Kromozomlar sentromerlerinin bulunduğu yere göre 4 farklı şekilde görünürler (Şekil 3.2):

- a) Sentromeri ortada olan ve iki kolu birbirine eşit uzunlukta olan kromozomlara metasentrik kromozomlar denir. Hücre bölünmesinin metafaz safhasında V harfi şeklinde görünürler.
- b) Sentromeri bir uca daha yakın olan ve bu nedenle iki kolunun uzunluğu birbirine eşit olmayan kromozomlara submetasentrik kromozomlar denir. Hücre bölünmesinin metafaz safhasında L harfi şeklinde görünürler.
- c) Sentromeri bir uca çok yakın olan ve kollarından biri diğerinden çok küçük olan kromozomlara akrosentrik kromozomlar denir.
- d) Sentromerleri uçta bulunan ve çubuksu bir yapı gösteren kromozomlara telosentrik kromozomlar denir [16,22].



Şekil 2.2.2.1. Sentromerin yerine göre kromozom tipleri, A) Metasentrik, B) Submetasentrik, C) Akrosentrik, D) Telosentrik [16].

**2.2.3 Primer Boğum:** Kromozomlarda sentromerin bulunduğu daralma bölgesine **primer** boğum (birinci boğum) denir. Primer boğum; kromozom kollarının açılması ile sekonder boğumlardan ayrılır [21, 25].

Bazı kromozomlarda primer boğum dışında ikinci bir boğum daha bulunmaktadır. Bu bölgeye sekonder boğum denir. Sekonder boğumlar, r-RNA'ların ve çekirdekçiklerin oluşumu ile ilgilidir. Bu nedenle sekonder boğumlara nukleoler bölge de denilmektedir. Genellikle her hücrede sekonder boğum taşıyan en fazla iki kromozom bulunur. Bu kromozomlara nukleoler kromozomlar denilmektedir [20].

**2.2.4 Telomer:** Kromozom kollarının uc kısmına telomer adı verilir. Telomerlerin en önemli işlevi; diğer kromozomlar ile etkileştiğinde kromozom uçlarının bozulmadan kalmasını sağlayarak kromozoma kararlılık vermektir. Çeşitli kimyasal maddeler, X-ışınları veya ultraviyole ışınlarının etkisiyle kromozomlarda kopmalar meydana gelir. Bu kopan parçalar koptukları yere veya başka bir kromozomun kopmuş kısmına yapışabilmelerine rağmen, kesinlikle bir kromozomun telomer kısmına yapışamazlar. Bu durum telomerlerin bir polariteye (kutuplaşma) sahip olmalarından ve bu nedenle kopan parçaların kendisine yapışmasını önlemesinden kaynaklanmaktadır [22,25 ].

**2.2.5 Satelit:** Bazı kromozomlarda, bir uçta yer alan ince bir filament ile kromozoma bağlanmış yuvarlak veya silindirik biçiminde bir yapı bulunmaktadır. Bu yapıya satelit denir. Satelitinin çapı kromozomun çapına eşittir. Satelit bulunduran kromozomlara SAT-kromozom adı verilmektedir. Satelitinin görevi belli olmamakla birlikte DNA'dan yapılmış olduğu ve 10 kadar baz çifti taşıdığı anlaşılmıştır [22,25].

### 2.3 Mutasyonlar

Kalıtsal materyalin miktarında, organizasyonunda veya içeriğinde meydana gelen değişikliklere mutasyon denir. Bir başka ifade ile mutasyon; kromozomlarda veya genlerde meydana gelen değişimler olarak da nitelendirilebilir [16,26].

Mutasyonlar genel olarak üç grupta toplanabilir:

- Gen mutasyonları,

- Kromozom mutasyonları
- Genom mutasyonları.

### 2.3.1 Gen Mutasyonları

DNA molekülünde gen düzeyinde ortaya çıkan değişikliklere gen mutasyonu denir. DNA'da gözlenen mutasyonlar genel olarak dört gruba ayrılır [26].

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

**b) Nokta Mutasyonları:** Bir gende tek bir nükleotidin değişmesi sonucu meydana gelen mutasyonlardır. Nokta mutasyonları DNA seviyesinde veya protein seviyesinde kodonlar üzerinde etkili olabilir.

**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.

### 2.3.2. Kromozom Mutasyonları (Kromozom Yapı Değişiklikleri)

Kendiliğinden veya çevresel mutajenler nedeniyle meydana gelen kromozom mutasyonları; kromatid ve kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, halka kromozomu, kardeş kromatidlerin birleşmesi, translokasyon, inversiyon, izokromozom, homolog kromozomlar arasında kromatidler arası değişim ve endoreduplikasyon şeklinde gözlenmektedir [16,22,26].

**a) Kromatid Kırığı:** Bir kromozomun iki kromatidinden yalnızca birinde kırılma olur ve anafazda kromatidlerin kutuplara çekilmesi sonucu hücrelerden biri defisyensli 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 plağında 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) İnverson:** Bir kromozomun içinden kopan parçanın ters dönerek aynı yere yapışmasıdır. İnverson 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:** Bazı durumlarda bölünmeyen hücrelerin DNA'sı tekrar replike olur. Bunun sonucunda önceki kromozomun her bir kromatidinden iki kromatidli birer kromozom meydana gelir. Fakat bu kromozomlar birbirinden ayrılmayıp bir arada kalırlar. Metafaz plağında ise bunların iki kromozom ve dört kromatidten oluşmuş yapılar şeklinde görülmelerine endoreduplikasyon adı verilir.

Kromozom mutasyonları ve ilişkili olaylar, insanlarda birçok genetik hastalığın sebebidir. İn vivo ve in vitro mutajenite testlerinin amacı, hücrelerde yapısal kromozom hatalarına sebep olan amillerin belirlenmesidir. Onkogenlerde ve vücut hücrelerinde tümör supressör genlerinde değişmeler sonucu oluşan kromozom mutasyonlarının ve ilişkili olayların insanlar ve deney hayvanlarında kanser oluşumuna sebep olduğu hakkında birçok delil vardır [27-30].

DNA molekülünün her canlıda benzer şekilde olması sebebiyle, canlı organizmaların bir grubu için genotoksik olan bir madde, diğer gruplar içinde genotoksiktir [31-34].

### 2.3.3 Genom Mutasyonları (Kromozom Sayı Mutasyonları)

Genom mutasyonları; öploid ve anöploid olmak üzere iki gruba ayrılır:

**a) Öploid:** Organizmada tek bir takım kromozom bulunması veya kromozomların hepsinin birden sayılarının tam katlar halinde yükselmesi durumuna denir.

Canlılar içerisinde bazı bireylerin somatik hücrelerinde sadece bir takım (n) kromozomun bulunması durumuna monoploidi, böyle bireylere de monoploid denir. Monoploidler genellikle döllenmemiş yumurtanın gelişmesiyle oluşurlar. Bir takımdaki kromozomların sayısının hepsinin birden, ikiden fazla kata yükselmesi ise poliploidi olarak adlandırılmaktadır. Eğer poliploidi, bireyin somatik hücrelerinde oluşursa endopoliploidi adını alır. Bu olay endomitoz sonucu oluşur. Endomitoz ise farklılaşmış ve bölünme yeteneği kaybolmuş hücrelerde bazen çekirdek zarı kaybolmadığı halde genetik materyalin replike olmasıdır. Sonuçta 3n, 4n, 5n ve daha yüksek katsayılı kromozomlara sahip bireyler meydana gelir. Bu bireylere de triploid, tetraploid, pentaploid gibi isimler verilir [16,26].

**b) Anöploidi:** Bir takımdaki kromozomlardan bir veya birkaçının sayısının değişmesine denir. Bu değişimler hipoploidi ve hiperploidi olmak üzere iki grupta incelenir:

Hipoploidi; genomdaki kromozom sayısının azalması durumuna denir. Bu azalma monosomi ve nullisomi olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşir. Monosomi diploid bir bireyde sadece bir kromozomun eksik olması durumudur ( $2n-1$ ). Monosomik bir birey non-disjunction nedeniyle bir kromozomu eksik olan bir gametin normal bir gametle birleşmesi sonucu meydana gelir. Nullisomi ise canlıda, bir kromozomun homoloğuyla beraber eksik olmasından dolayı bir kromozom çeşidinin hiç bulunmamasıdır ( $2n-2$ ). Nullisomik bireyler tesadüfen aynı çeşit kromozomunu kaybetmiş iki gametin birleşmesi ile oluşur [16,20].

Hiperploidi veya polisomi; bir takımdaki kromozomlardan birinin veya bir kaçının artmasıdır. Trisomi ve tetrasomi olmak üzere iki alt gruba ayrılır. Trisomi diploid bir canlıda bir kromozomun fazla bulunmasıdır ( $2n+1$ ). Eğer iki ayrı kromozom çeşidinden birer kromozom fazla bulunuyorsa buna çift trisomi denir ( $2n+1+1$ ). Trisomik bireyler bir kromozom çeşidine ait iki homoloğu birden taşıyan bir anöploid gametle normal bir gametin birleşmesi sonucu meydana gelir. Tetrasomi ise bir canlıda, takımdaki kromozomlardan birinin 4 tane olmasıdır ( $2n+2$ ). Tetrasomik bireyler, aynı iki trisomik gamet hücrelerinin birleşmesi sonucu oluşur [16,20 ].

## 2.4 Mutajen Etkenler

Mutasyonlar belli bir tür içinde meydana gelen ve o türün sınırları dışına çıkmayan değişimler olarak nitelendirilebilir. Çoğu zaman meydana gelebilecek mutasyon canlının ölümüne neden olabilmektedir [35].

Mutasyonlar çok düşük bir oranda da olsa ( $10^{-5}$  -  $10^{-10}$ ) kendiliğinden oluşabildiği gibi mutajen adı verilen çeşitli çevresel faktörler sonucu da oluşabilir. Bu çevresel etkenler ise fiziksel mutajenler ve kimyasal mutajenler olmak üzere iki grupta toplanır [16].

Fiziksel mutajenler (S fazına bağı olmayan klastojenler); sıcaklık, manyetik ve elektriksel alan, UV, X,  $\gamma$ , proton ve nötron ışınlarıdır. Bunların etkileri genellikle bir baz çiftinin yerini başka bir baz çiftinin alması şeklinde görülür [16].

Kimyasal mutajenlerin (S fazına bağı olan klastojenler) etkisi ise daimi değişiklikler şeklindedir. Bunların da; bazların kimyasal yapısını değiştiren kimyasal mutajenler (nitroz asidi-HNO<sub>2</sub>, hidroksilamin-NH<sub>2</sub>OH, alkilleyici maddeler), çerçeve kaymasına yol açan kimyasal mutajenler (akridin boyaları) ve baz analogları olan kimyasal mutajenler olmak üzere üç çeşidi vardır [16].

Kromozomların mikroskop altında incelendiği bilim dalına "Sitogenetik" adı verilir. Bu şekilde kromozom sayısında (ör. Down sendromunda 47, Turner sendromunda 45) veya yapısındaki (delesyon veya translokasyon vb.) değişiklikler bu şekilde saptanabilir. Ancak kromozomlardaki bir değişikliğin mikroskopta görülebilmesi için en az 3 milyon nükleotitlik bir kısmın değişmesi gerekir, daha küçük değişiklikler ancak moleküler genetik yöntemlerle incelenebilir [36].

## **2.5. Analiz Yöntemleri**

### **2.5.1 Kromozom Tipi Hataların Belirlenmesi**

Yapısal kromozom hatalarının iki tipini (kromozom tipi ve kromotit tipi) kapsamaktadır. Poliploidlikteki bir artış, kimyasal maddenin sayısal hatalarda oluşturma potansiyeline sahip olacağını gösterir. Kimyasal mutajenlerin çoğu, kromotit tip hatalar oluşturur. Ancak kromozom tipi hatalar meydana gelebilir.

Kromozom mutasyonları ve ilişkili olaylar birçok genetik hastalığın sebebini oluşturur. Ayrıca "onkogen" lerde ve tümör engelleyici genlerde değişikliklere yol açan kromozom mutasyonları ve ilgili olayların insanlarda deneysel hayvanlarda kanser oluşmasına sebep olduğu hususunda çok önemli deliller bulunmaktadır. Kromozom hatası testleri in vivo ve in vitro olarak iki tarzda gerçekleştirilebilir [37].

### **2.5.1.1 İn-Vivo Kromozom Hatası Testi**

İn-vivo kromozom hatası testi, türler arasında ve dokular arasında değişiklik göstermekle birlikte, özellikle in vivo metabolizma, farmakinetik ve DNA eşleme işlemi ile ilgili faktörlerin önem kazandığı mutajenik riski tayin etmek için uygulanır. Ayrıca, bir in vitro test yardımıyla belirlenmiş mutajenik bir etkinin daha fazla araştırılması içinde kullanışlıdır. Ancak, ulaşamayacağı test maddesinin veya bir reaktif bir metabolitenin hedef (kullanılacak) dokuya uzanamayacağı hususunda delil varsa, bu testi kullanmak doğru değildir. Böyle bir teste kullanılacak doku, kolaylıkla izole edilebilen ve işleme tabi tutulabilen ve hızlı hücre döngüsüne sahip hücrelerden oluşması gerekir.

Bu metot hayvanların uygun bir yol ve süre ile test maddesine maruz bırakılmasına ve bu sürenin sonunda öldürülerek hücrelerinin kromozomal hasar yönünden incelenmesi prensibine dayanır. Ancak, öldürmeden önce hayvanlar metafazda durdurma amili (örneğin; kolşisin ve kolsemid) ile muamele edilirler. Daha sonra kromozom preparasyonları yapılır, boyanır ve kromozom hatası olup olmadığını belirlemek amacıyla metafaz hücreleri analiz edilir [37].

### **2.5.1.2 İn-Vitro Kromozom Hatası Testi**

İn-vivo'da olduğu gibi, in vitro kromozom hatası testinde, kültürü yapılan hücrelerde yapısal kromozom hatalarına sebep olan amili tespit etmek amacıyla yapılır. Bu testin prensibi, hücre kültürlerinin metabolik aktivasyonlu ya da aktivasyonsuz test maddesine maruz bırakılmasına, önceden belirlenen aralıklarda metafazda durdurulmasıdır.

İn-vitro kromozom hatası testinde, oluşturulmuş hücre hatları, hücre soyları veya primer hücre kültürlerinin kültürlerini kullanılabilir. Kullanılacak hücreler; kültürde büyütülebilirliği, karyotip kararlılığı, kromozom sayısı, kromozom farklılığı ve kromozom hatalarının kendiliğinden olan frekansı gibi özellikler dikkate alınarak seçilir [37].



### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1 Gereçler**

##### **3.1.1 Demirbaş malzemeler**

Etüv (Elektro-mag M420 Bp)

Vorteks (Yellowline)

Mikroskop (Olympus model CHK)

Santrifüj (Elektro-mag)

Derin dondurucu

Buzdolabı

Otomatik pipet

Foto mikroskop (Olympus BH-2,Nikon Coolpix 8800)

Su banyosu

Hassas terazi

##### **Hassas terazi**

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

##### **Santrifüj**

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

### **Mikroskop**

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

### **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.

### **3.1.2 Sarf malzemeler**

Heparin

Giemsa (Merck, 5400512)

KH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub> (merck, 9021622)

Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>H<sub>2</sub>0 (Merck, KI 690176)

Glasiyal asetik asit (Merck, 247K18855556)

Metanol (Merck, 502K05275408)

Ksilol (Merck, 207K037553)

Entellan® (Merck, 640171987)

İmmersiyon yağı® (Merck, 09403569)

KCL (Merck, 340TA611835)

Alkol

Formik asit (Merck)( % 98-100 )

Distile su

Tüplük

Çeşitli cam malzemeler

Konik tabanlı 10ml'lik steril kültür tüpü

Enjektör

Çeşitli ebatlarda puarlar

Pastör pipeti

21.Lam

22.Lamel

### **3.1.3 Kullanılan kimyasal maddelerin eriyiklerinin hazırlanması**

**Sorenson Fosfat Tampon Çözeltisi:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  çözeltisinden 60 ml. ve  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  çözeltisinden 30 ml. alınarak şaleye konular 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.

#### **Çözelti 1:**

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ ..... 9.1 gr.

Bidistile su.....1000 ml.

#### **Çözelti 2:**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .....11.9 gr.

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.

**Mitomisin C (MMC) Eriyiğinin Hazırlanması:** 2 mg mitomisin-C bulunan ortama 2 ml steril bidistile su ilave edilerek MMC eritilmiştir. Sonra bu eriyikten 4 ml'lik kültür ortamına ilave edilerek MMC ile hücreler 48 saat muamele edilmiştir.

### **Mitomisin C (MMC)(Sigma)**

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan, Mitomisin C (MMC) mavi-menekşe renkte, kristal şeklinde ve suda çözünebilen bir maddedir. Suda çözünen (pH=6-9) eriyik, ışıktan korunduğu ve 5°C altındaki buzdolabında saklandığı zaman yedi gün özelliğini korumaktadır.

Mitomisin C 2 mg ve 10 mg'lık şişelerde toz şeklinde bulunur. MMC antinoplastik (urların büyümesini önleyen) ve geniş spektrumlu bir sitostatik (hücre bölünmesini durduran) ajandır [38].

### **Mitomisin C(MMC)'nin Kullanım Alanları**

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

Mitomisin C (MMC) çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılan alkilleyici bir ajandır. MMC'nin kullanıldığı kanser türleri aşağıda verilmiştir.

Mide kanseri

Anüs ve kalın barsak kanserleri

Göğüs kanseri

Küçük hücreli akciğer kanseri

Baş ve boyun kanserleri

Küçük mesane papillomalan

Pankreas kanseri

Rahim kanseri [38].

**Kromozom Medyumu:** Dateks firmasının ürettiği (Cat. No.04-001-1B) Chromosome Medyum B, hücre kültürü için kullanılmıştır. Bu maddeden kültür tüplerine steril ortamda 4'er ml eklenerek kullanılmıştır.

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

<b>Kapalı formülü</b>	: $C_{22}H_{25}NO_6$
<b>Molekül ağırlığı</b>	: 399.4
<b>Etil asetat içeriği</b>	: %3.4
<b>Kloroform içeriği</b>	: < %0.1
<b>Sigma no</b>	: C-9754

**Hipotonik Eriyik:** Hipotonik eriyik olarak % 0, 4'lük KC1 (Merck) kullanılmıştır. Bidestile su içinde stok halinde hazırlanan eriyik ağzı kapalı cam bir kaptaki buzdolabında (+4 °C) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık 1 saat önce yeterli miktarda alınıp 37°C'deki inkübatörde ısıtılıp kullanılmıştır.

**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.

**Giemsa:** Giemsa boyası Merck firmasından (Cat. No. 9204) temin edilmiş olup, deneylerimizde Sorensen tamponu içinde hazırlanmış, %10'lık boya eriyiği kullanılmıştır.

### **3.2 Yöntem:**

#### **3.2.1 Çalışma Grubu**

Sigara içmeyen, 23-24 yaşlarında sağlıklı, 7 erkek ve 7 bayan toplam 14 üniversite öğrencilerinden periferik kan örnekleri alınmıştır. Her deney bir kez tekrarlanmıştır.

#### **3.2.2 Kan Örneklerinin Alınması**

Kontrol kişilerden, 5 ml'lik steril ve 0.1-0.2 cc heparin içeren enjektörler kullanılarak periferik kan örnekleri alındı. Daha sonra kan örneklerinin bekletilmeden kültür ortamlarına ekimi yapıldı.

#### **3.2.3 Kültür Tekniği**

Önceden 37 °C'ye getirilmiş olan 4 ml 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 kontrol kişilerinin adı yazıldı ve her bir kişi için 2 tüpe ekim yapıldı. Tüpler hafifçe karıştırılarak 37 °C'lik etüvde 24. saatte formik asit eriyiği, 70. saatte kolşisin eklemek koşuluyla 72 saat kültüre edildi.

### **3.4 Kromozom Anormalliklerini (Chromosomal Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması**

#### **3.4.1 Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması**

Sağlıklı ve sigara içmeyen yaşlan 22-25 olan kişiden alınan, heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumlarına (5 ml) steril şartlarda 13-14 damla (0.2 ml) ekilmiştir. Hücre kültürü inkübatörde 37 °C' de 72 saat inkübe edilmiştir. formik asitin insan kromozomları üzerine etkisini incelemek için kültür süresinin bitimine 24 saat kala son konsantrasyonu mikropipetle çekilerek kültür tüplerine ilave edilmiştir.

Pozitif kontrol amacıyla kullanılan MMC steril bidestile suda çözülmüştür. MMC'nin insan kromozomları üzerine etkisini incelemek için kültür bitimine 24 saat kala son konsantrasyonu 0.3 µg/ml MMC kültür tüplerine ilave edilmiştir. Negatif kontrol olarak ise distile su (%1) kullanılmıştır [39].

Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (yani kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan Kolsişin eriyiğinden 35 µl (0.06 µg Kolsişin/ml) ilave edilmiş ve tüpler hafifçe sallanarak iyice karıştırılmıştır. Hücreler 2 saat süresince (37°C'de) Kolsişin ile ön muameleye tabi tutulmuştur.

Kültür süresi olan 72. saatin bitiminde kültür tüpleri, 2000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, etüvde 37 °C'de tutulan hipotonik eriyik ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve karıştırılarak yapılmış olup hücre süspansiyonu pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Her tüpe 7 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatöre konmuştur. Hücreler 30 dk. hipotonik eriyikte 37°C'de muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 10 dk. 2000 rpm'de santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Hipotonik çözelti ilavesi gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk. fiksatif ile muamele edilen hücreler 2000 rpm'de (170 x g) 10 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem 3 kere tekrarlanmıştır. 3. fiksatifle muamele sonunda tüpte kalan sıvı tamamen berraklaştığı görülmüştür. Her fiksatif ilavesinden sonra tüpler santrifüj edilerek üstteki sıvı atılmıştır. Son santrifüjden sonra dipte 0, 5 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra yayma yapılmıştır.

Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Pasteur pipetine 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekilmiştir. Özel olarak hazırlanmış düzeneğe tutturulan pasteur pipetinden daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanan farklı alanlara l'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 3-4 damla) hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Hücre

süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlalann üst üste düşmemesine dikkat edilmiştir.

Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

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

### **3.5 Mikroskopik İnceleme**

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

Muamele edilmiş ve kontrol kültürlerde her bir kişiden hazırlanan, iyi dağılmış kromozomlara sahip preparatlardan, her bir doz için, 400 metafaz incelenerek kırık ve diğer anomaliler sayılmıştır. Bu hücreler içinde gözlediğimiz kromozom yapı anormallikleri kromozomlara göre ayrı ayrı kaydedilmiştir. İncelenen 100 hücre içerisinde kromozom kırığı bulunan anormal hücrelerin sayısı saptanmış ve bundan da anormal hücre yüzdesi bulunmuştur.

### **3.6 İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi**

İstatistiksel analiz “GraphPad InStat version 3.05 for Windows 95 (GraphPad Software, San Diego California USA)” programıyla yapılmıştır. Kültürde bulunan hücrelerdeki kromozom anormallikleri “*Fisher's exact test*” i ile hesaplanmıştır.

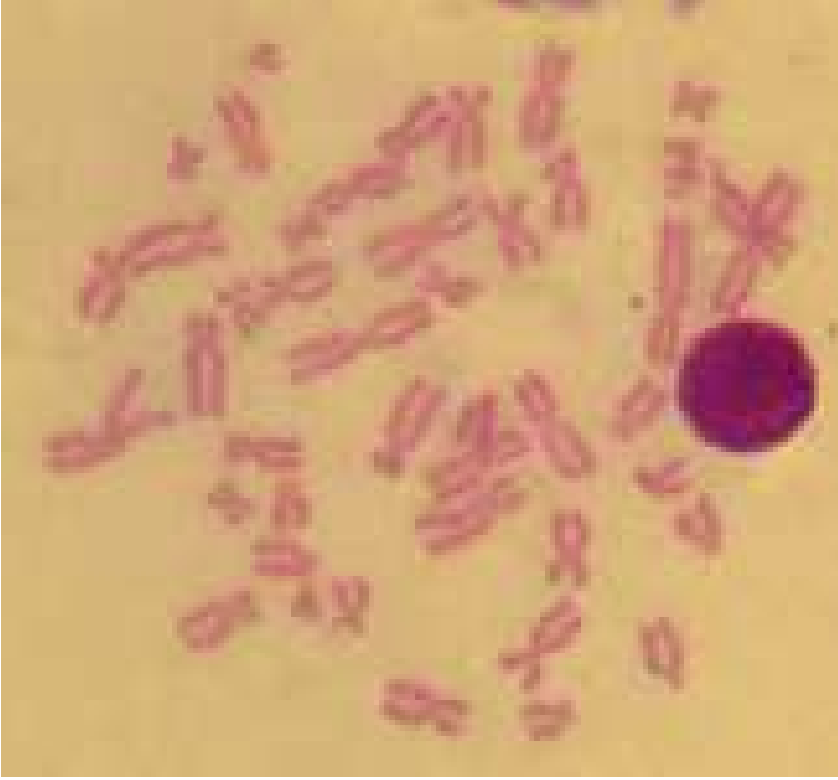


#### 4. BULGULAR

Normal insan kromozomları sağlıklı ve sigara, alkol kullanmayan üniversite öğrencilerinden tam kan olarak vena'dan alınmıştır. Şekil 4.1 'de normal bireye ait laboratuvarımızda elde edilmiş metafazlar görölmektedir



**Resim 4.1- Normal bireye ait bir metafaz**



**Resim 4.2- Anamolili bir metafaz**

Resim 4.2’de de görüldüğü gibi 20 $\mu$ g’da çok sayıda kromozom aberasyonu görülmektedir. Bu dozda sentromerlerin çoğu erimiş olup kromotidlerde kırıklar vardır. Saat 2 yönünde kromozom birleşmesi ,9 yönünde kromotid kırığı, 5 yönünde kromotid birleşmesi net şekilde görülmektedir.



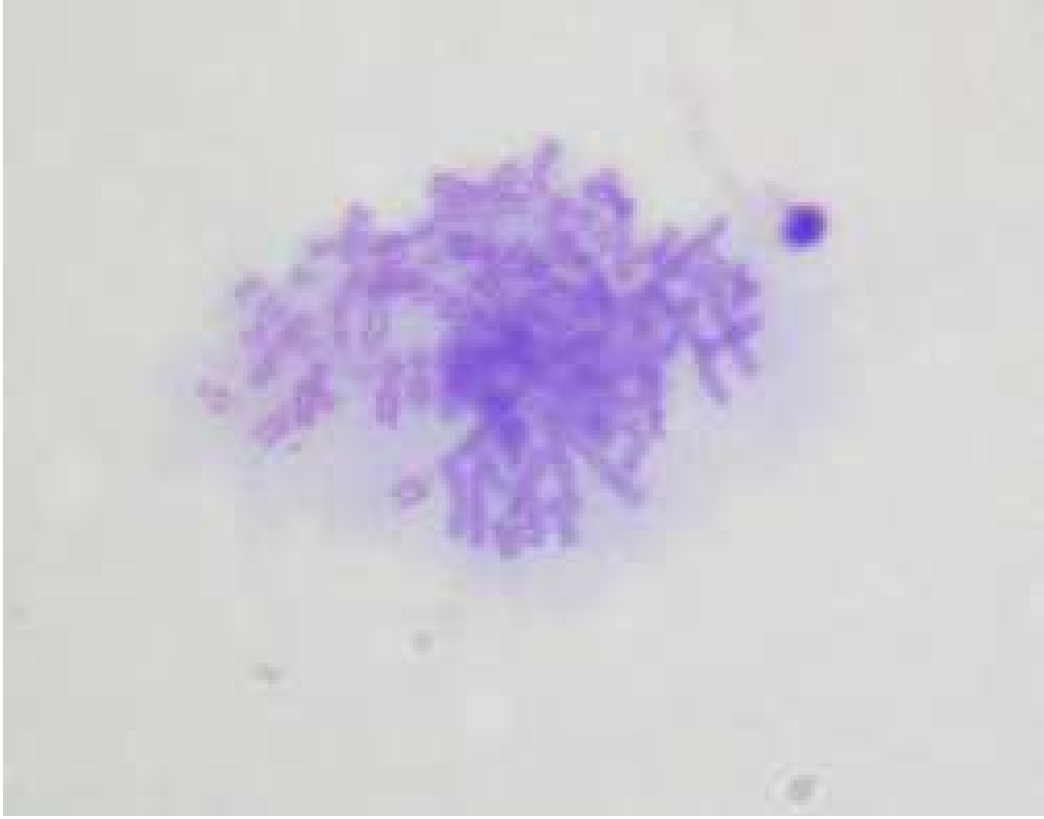
**Resim 4.3-** 40  $\mu\text{g}$  formik asit verilen metafaz görüntüsü

Resim 4.3'te de görüldüğü gibi 40  $\mu\text{g}$ 'da metafaz sayısı çok az olup kromozomlar ipliksi formdadır. Formik asit mitotik indeksi azaltmakla kalmamış aynı zamanda kromozomların şişmesi için kullandığımız hipotoniğin etkisini de azaltmıştır.



**Resim 4.4- 25 µg formik asit verilen metafaz**

25 µg verdiğimiz metafazlarda bantlaşmalar olup kromozom birleşmelerini Resim.4'te net bir şekilde görebilmekteyiz.Saat 2 yönünde kromozom birleşmesi, saat 6 yönünde ortaya yakın kromotid değişmesi, saat 1 yönünde kromozom kırığı görülmektedir.



**Resim 4.5- Poliploidi**

#### **4.1 Formik Asitin İnsan Kromozomlarına Etkisi**

Formik asit besiyerine 40  $\mu\text{g}$  gelecek şekilde verilmiş ve bu dozun alt değerleri sırasıyla kullanılmıştır. (3.5-40 $\mu\text{g}$  ). 40  $\mu\text{g}$ 'lik dozda besiyerinde üremenin tamamen durduğu ve metafaz sayısının çok az olduğu gözlenmiştir. Yapılan denemeler sonrası 24 saat etkileştirme süresinin uygun olduğu daha fazla sürenin mitoz bölünmeyi engellediği saptanmıştır. Görülen metafazlar ipliksi görünümde ve bantlaşmış şekildedir. 25 $\mu\text{g}$ 'lik dozda yine aynı baskılanma devam etmiştir ancak metafazlardaki kromozom anomalileri daha iyi şekilde görülebilmektedir. 20 $\mu\text{g}$ 'lik dozda mitozun baskılandığı ancak kromozomların bantlandığı ve çok sayıda kırığın olduğu gözlenmiştir. 15  $\mu\text{g}$  da ise aynı etki devam etmiş olup bantlaşmada azalmalar görülmüştür. Dozlar azaldıkça metafazlar daha net ve anomaliler daha da azalmaktadır. 3.5  $\mu\text{g}$  en alt dozumuz olup bu dozda negatif kontrole yakın sonuçlar çıkmıştır.

**Tablo 4. 1.** Formik asit'in değişik dozları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültürü kromozomlarında kromozom aberasyonu sıklığı

Test maddesi	Uygulama		Yapısal kromozom bozuklukları				Sayısal bozukluklar	Kromozom bozukluklarının sıklığı/hücre±SH(%)
	Süre (s)	Dozlar (µg /ml)	ctb	csb	scu	cu	p	
NK	24	1	1	-	-	-	-	0.2± 0.2
MMC	24	0.3	19	2	3	7	1	6.2± 3.3
Formik asit	24	3,5	2	-	-	2	-	0.8± 0.4
		5	3	-	1	4	1	1.8± 0.7
		10	4	1	2	7	-	2.8± 1.2
		15	7	1	2	13	-	4.6± 2.4
		20	11	2	1	15	-	5.8± 3.0
		25	12	4	3	18	-	7.4± 3.3
		40	ipliksi	ipliksi	1	0	1	

ctb: kromatid kırığı, csb: kromozom kırığı, cu: kromatid birleşmesi, scu: kardeş kromatid birleşmesi, nk: negatif kontrol (% 1 distilled water), p: poliploidi, MMC: (0.3 µg/ml mitomycine-C (24 saat).

\* p < 0.05 kontrolle karşılaştırıldı. (Fisher's Exact Test)

## 5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Mutasyon kalıtsal bilgide oluşan kalıcı değişimlere denilir. Çevresel etkenlerin mutasyona sebep olabildikleri üzerine pek çok çalışma vardır. Bu etkenler gen mutasyonundan kromozom kırıklarına ve diğer anormalliklere sebep olabilmektedirler. İnsanda DNA sentezinde nokta mutasyonları bile önemli anomalilere sebep olabilir. Ultraviyole ışınları, iyonize radyasyon, nitrozaminler, Benzopiren, kromium, Hidrazin, vinil klorür ve aflatoxin'ler çevresel mutajenlere örnek olarak verilebilir. Bu etkenler, alkilasyon, arilasyon, interkalasyon, baz analogu girişi, deaminasyon, enzim inhibisyonu ve metafaz etkileyici olarak işlev görürler. Bu mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkan kanser olaylarının % 2 sini çevresel mutajenler başlatmaktadır [8].

Birleşik Devletler, Ulusal Toksikoloji Programı (U.S. N.T.P.). Mikroçekirdek denemelerini başka bir in vitro kısa süreli test olan Salmonella Testi (Ames Testi] ile birlikte yapılmasını ya da değerlendirilmesini önermektedir. 29 Kanserojen ve 17 kanserojen olmayan madde Salmonella denemelerinde ve fare kemik iliğinde mikro çekirdeğe yol açıp açmadığını tespit etmek için test edilmiştir. Her iki denemede pozitif tepki veren 13 kimyasal maddenin kanserojen olduğu saptanmıştır. Salmonella denemelerinde negatif sonuç veren, fakat fare kemik iliğinde test sonucu pozitif olan 8 kimyasal madde arasından 6 sının kanserojen olduğu belirlenmiştir. Bu noktada "in vivo" testinin Salmonella denemesinde gözden kaçan 6 kanserojeni tanıdığı sadece 21 taneden 2 tanesinde yanlış pozitif tepki verdiği bildirilmektedir. Her iki testte de negatif sonuç veren 10 kimyasal madde arasında 4 kanserojenin olduğu tespit edilmiştir. Ancak bunlarında gerçek genetik olmayan kanserojen olduğu görüşü yaygındır. Uluslar arası kanser araştırmaları ajansının (I.A.R.C.) değerlendirmesinde insan için kanserojenik olmayan bir madde olarak varsayılp sınıflandırılmıştır. Bu konuda Birleşik Devletler Ulusal Toksikoloji Programı ve Uluslararası Çevre Örgütü (U.S. N.T.P. ve E.P.A) önemli sonuçlara ulaşmıştır. Bunlardan birincisi, Salmonella Testinin tek başına genotoksinleri fark edemeyeceği yönündedir. İkincisi ise, "in vivo" bulgusundaki negatif yeterlilik ve uygunluk,

pozitif “in vitro” sonuçlarına baskın değildir. Bu düşüncelerden anlaşılacağı üzere in vivo testler ve buna bağlı mikroçekirdek testi, kanserojenlerin belirlenmesinde daha çok güvenilir görünmekle birlikte, diğer kısa süreli testlerle beraber alınan sonuçlarında dikkate alınması yerinde olacaktır. Aslında mikroçekirdek testini bu derece ve bu açıdan önemli kılan: in vivo çalışmalar için doğrudan ya da metabolize edildikten sonra etki gösteren mutajenlerin, memelilerde oluşturduğu genetik zararları belirlemede çok uygun olmasındandır. Bu test mutajenlerin hücre döngüsünün özgül zamanları üzerindeki etkilerini ve kemik iliği hücrelerinin çoğalma durumları hakkında bilgi verir. Tatlandırıcı olarak aspartam içeren ürünler kullanıldığında aspartam; ilk bileşenleri olan fenilalanin, aspartat ve metanole ayrışır. Bu bileşenlerde metanolün oranı yaklaşık %10 dur. Metanol tek başına zararlı değildir fakat, karaciğerdeki enzimler tarafından çok toksik iki bileşene ayrışır.

İlk enzim reaksiyonunda, metanol **formaldehite** ayrışır. Formaldehit, proteindeki amino asitlerle tepkimeye girer. Eşsiz yapılar oluşturmak için sarılmış amino asit zincirleri proteinleri oluşturur. Bu zincirlerin sarılış şekli proteine uygun şekli ve diğer moleküllerle etkileşebilmesi için gereken esnekliği verir. Formaldehit doku ve hücrelere yayılarak farklı amino asitler arasında çapraz bağlar oluşturur. Protein olduğu biçimde katılaşır ve daha fazla reaksiyon taşıyamaz hale gelir. Bu özellik, formaldehiti bazı kimyasal proseslerin belirli durumlarında kullanışlı kılar. Buna bazı örnekler:

- mumyalamak
- deri tabaklama
- korozyon önleme
- ahşab son şekillendirme

Formaldehit insanlarda kansere de neden olabilir, ancak bu uzun süreli maruz kalma gerektirir. Formaldehit vücutta uzun süre kalmaz çünkü metabolik yol içinde ikinci enzim reaksiyonu tarafından çabucak **formik aside** metabolize edilir. Formik asit te insan sağlığı açısından son derece toksiktir. Hücrelerin mitokondri fonksiyonunu bozar. Mitokondri; bir hücrede “elektrik santrali” görevi görür ve onun fonksiyonunu bozmak bir nükleer reaktörü aniden kapatmaya benzer. Enerji eksikliğinden hücresel



prosesler durmakla kalmaz, enerji üretimiyle ilgili büyük miktardaki farklı molekül tarafından hücreler patlatılıp parçalanır. Optik siniri oluşturan hücreler formik aside karşı oldukça duyarlıdır, bu yüzden de körlükle metanol zehirlenmesi çok yakın bağdaştırılır [40]. Temas olması durumunda temas edilen yer bol suyla iyice yıkanmalıdır [41].

Morita ve arkadaşları, çin hamsteri ovaryum hücrelerinde laktik asit, formik asit ve asedik asitin kromozomal aberasyona sebep olduğunu ve bu etkinin pH düzeyi ile yakın ilişkili olduğunu saptamışlardır [14].

Erciyas ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise formik asitin hücre bölünme mekanizmalarını bozarak mikronükleusa ve hücre ölümüne (apoptoz ve nekroz) sebep olduğu insan lenfosit hücreleri kullanılarak gösterilmiştir (42).

Bizde çalışmamızla formik asit'in insan lenfosit kromozomları üzerinde mutajenik ve anojenik olduğunu gösterdik.

## 6. KAYNAKLAR

1. Ulupınar, M., Alaş, A., “Balık Sitogenetiği ve Laboratuar Teknikleri Kitabı”, I Baskı, s. 10 (2002).
2. Angelier,N.,et.All, “Scanning electron Microscopy of Lambbrush chromosomes”, *Choromosome*,89:243-53 (1984).
3. Nesse, R. M., Wiliams, G. C., “Why we get sick: The new science of Darwinian medicine” , New York ,*Times Boks*,1994.kitabı:3, (1997).
4. Boaz, N. T., “Evolving health:the origins of illness and how the modern world is making us sick”, New York, *Willey&Sons*, Inc, (2002).
5. Agüloğlu, S. ve Ortakaya, C., “Eritromycin’in İnsan Kromozomları Üzerine In vitro Etkileri”, *XI.Ulusal Biyoloji Kongresi*, Edirne. 208-216 (1992).
6. 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 Heidel berg.NATO.ASI.Series,Vol.H 90 pp:567-589(1995)
7. [http://tr.wikipedia.org/wiki/Formik\\_asit](http://tr.wikipedia.org/wiki/Formik_asit) (23.12.2009)
8. <http://www.kimyasanal.net/konugoster.php?yazi=nejjf3nt7q> (21.092009)

9. [http://en.wikipedia.org/wiki/Formic\\_acid](http://en.wikipedia.org/wiki/Formic_acid) (23 12 2009)
10. <http://www.nedirbilelim.com/dizin2/formik-asit.html> (17 09 2009)
11. <http://www.technologyreview.com/energy20778> (19 12 2009)
12. <http://www.alkokimya.com/urunler.php>
13. Altuğ, T., “Gıda Katkı Maddeleri”, *Hekim ve Yaşam Dergisi*, Haziran 99, 29- 31 (1999).
14. 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).
15. Yakar, 1987 Kuru ve Gözükara, 2001.
16. Temizkan, G., 1994. Genetik (Temel Genetik). İ.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 276 s.
17. Kuru, M., Gözükara, S.E. 2001. Genetik. Palme Yayıncılık, Ankara, 360 s.
18. Bozcuk, A. N. 2000. Genetik. Palme Yayıncılık, Ankara, 320 s.
19. Ozban, N., 1994. Hücre Sitolojisi. İ.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 250 s.
20. Karol, S., 1998. Hücre Biyolojisi. A.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, Ankara, 451 s.
21. Demirsoy, A. 1991. Yaşamın Temel Kuralları. Meteksan Matbaacılık ve Teknik Sanayi Tic. Ltd. Şti., Ankara, 560 s.
22. Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E. 1995. Sitogenetik. Ç.Ü. Fen Fakültesi, Adana, 182 s.

23. Suludere, Z., 1995. Hücre Biyolojisi. A.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, Ankara, 458 s.
24. <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/basics/chromosome> (18 12 2009)
25. Akman, Y. 1998. Bitki Biyolojisine Giriş, Botanik. Palme Yayıncılık, Ankara, 220 s.
26. Solak, M. 2000. Moleküler Genetik ve Rekombinant DNA Teknolojisi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Yayın No:5, Afyon.
27. World Health Organization (WHO), 1996. Revision of the WHO Guidelines for Drinking Water Quality, Geneva, Switzerland,
28. Boorman GA, Dellarco V, Dunnik JK, Chapin RE, Huntr S, Hauchman F, Gardner H, Cox M, Sills RC., 1999. Drinking water disinfection by-products: review and approach to toxicity evaluation. Environ Health Perspect 107 (1): 207–217.
29. Soffritti M, Belpoggi F, Lenzi A, Maltoni C., 1997. Results of long term carcinogenicity studies of chlorine in rats. Ann. NY Acad. Sci, 26: 189–208.
30. Koivusalo M, Pukkala E, Vartiainen T, Jaakkola JJ, Hakulinen T., 1997. Drinking water chlorination and cancer—a historical cohort study in Finland. Cancer Causes Control, 8: 192–200.
31. 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.
32. 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).

- 33.**Fimognari, C., Nusse, M., Cesari, R., Cantenelli-Forti, G., Hrelia, P., (2001). Micronuclei induction, cell cycle delay and apoptosis as markers of cellular stress caused by ursodeoxycholic acid in human lymphocytes. *Mutat Res*, 495(1-2):1-9.
- 34.**Monarca, S., Zani, C., Susan, D., Richardson, D., Thruston, Jr., Massimo, M., Donatella, F., Milena, V., 2004. A new approach to evaluating the toxicity and genotoxicity of disinfected drinking water, *Water Research*, 38, 3809–3819.
- 35.** Gözükarar, E.M. 1990. *Biyokimya*. Ofset Repronat Ltd. Şti., Ankara, 1104 s.
- 36.** <http://tr.wikipedia.org/wiki/Kromozom>
- 37.** Soffritti M, Belpoggi F, Lenzi A, Maltoni C., 1997. Results of long term carcinogenicity studies of chlorine in rats. *Ann. NY Acad. Sci*, 26: 189–208
- 38.** Budak Diler, S. Ethil metansulfonat (EMS) ve mitomisin C (MMC)'ye insan kromozomlarının hassasiyeti. (Doktora Tezi),Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Adana, 2006.
- 39.** Rencüzoğulları, E. and Topaktaş, M., 1991. 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.
- 40.** <http://recipes.howstuffworks.com/question536.htm>
- 41.** <http://lifesciences.byu.edu/Portals/6/docs/FormicAcid.pdf>
- 42.** Erciyas A, Gül S. “insam lenfosit kültüründe formik asitin genotolsisitesinin araştırılması” 2009

## 7. ÖZGEÇMİŞ

Zeynep TAYFA , 1983 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta , lise eğitimini İstanbul'da tamamladı. Kafkas Üniversitesi Biyoloji Bölümünden 2007 yılında mezun oldu. 2008 yılında Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisansa başladı. Şuan yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.