

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

**FORMİK ASİT'İN İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRÜNDE  
MİKRONÜKLEUS SIKLIĞI ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Ayşe ERCİYAS  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Danışman  
Doç. Dr. Süleyman GÜL**

**2009  
KARS**

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Ayşe ERCİYAS'ın yüksek lisans tezi olarak hazırladığı “**FORMİK ASİT’İN İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRÜNDE MİKRONÜKLEUS SIKLIĞI 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. Hasan Oral	.....

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 mikronükleus sıklığı 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, sayımlarda emeği geçen arkadaşlarım Seyyal Aras ve Ercan Ceben'e teşekkür ederim .

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
<b>ÖZET</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>iv</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	<b>v</b>
<b>ÇİZELGELER LİSTESİ</b>	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLERİN LİSTESİ</b>	<b>vii</b>
<b>RESİMLERİN LİSTESİ</b>	<b>viii</b>
<b>1.GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2.GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
2.1. Formik Asit	4
2.1.1. Metanol zehirlenme belirtileri	4
2.1.2. Formik asidin kullanıldığı yerler	5
2.1.3. Gıda katkı maddeleri	6
2.2. Mikronükleus Tekniği ve Kullanım Alanları	8
2.2.1. Mikronükleus	8
2.2.2. Mikronükleus tekniğinin gelişimi	11
2.2.3. Mikronükleus tekniğinin kullanım alanları	14
2.3. Analiz Yöntemleri	15
2.3.1. İnsan lenfositlerdeki standart sitokinez-blok mikronükleus analizi	15
2.3.2. İnsan lenfositleri için kan kültürü	15
2.3.3. Sitokinez-bloklü ve sitokinez-bloksuz hücredeki mikronükleus analizi	16
2.3.4. Mikronükleus ve non-disjunction'daki kromozom kaybını ölçmek için geliştirilen moleküler teknikler	17
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>18</b>
3.1. Gereçler	18
3.1.1. Demirbaş malzemeler	18
3.1.2. Sarf malzemeler	19
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddelerin eriyiklerinin hazırlanması	20
3.2. Yöntem	23
3.2.1. Çalışma grubu	23
3.2.2. Kan örneklerinin alınması	23
3.2.3. Kültür tekniği	23
3.2.4. Çıkarım işlemleri	23
3.2.5. Preperat hazırlama	24
3.2.6. Preperatların boyanması ve saklanması	24
3.2.7. Lamaların incelenmesi ve boyanması	24
3.2.8. Sitokinezi bloke edilmiş binükleer hücreleri tanıma kriterleri	25
3.2.9. Mikronükleus sayımı	26

	<u>Sayfa no</u>
3.2.10. Hücre sayısı ve istatistiksel değerlendirme	26
<b>4. BULGULAR</b>	<b>27</b>
<b>5.TARTIŞMA</b>	<b>36</b>
<b>6.KAYNAKLAR</b>	<b>41</b>
<b>7.ÖZ GEÇMİŞ</b>	<b>47</b>

## ÖZET

Formik asit, bitkiler, arılar, toprak, araçlar, gübre yanması ve fotokimyasal reaksiyonlar gibi çeşitli kaynaklarca üretilen ve çevrede yaygın bulunan kimyasal bir bileşimdir. İnsan periferik lenfositleri 20, 40, 60, 80 mM derişimde formik asitle 48 saat etkileşime sokuldu. Negatif kontrol ve pozitif kontrol olarak kullanılan mitomisin C (MMC, 0.5 µg/ml) ile karşılaştırıldığında formik asitin tüm dozları mikronükleus frekansını belirgin bir düzeyde artırmıştır. Mikronükleus frekansındaki bu artış doza bağımlı idi. Sonuçlar, formik asit dozu ile mikronükleus sıklığı ( $r=0.92$ ), nekrotik hücre oluşumu ( $r=0.95$ ) ve apoptotik hücre oluşumunun ( $r=0.91$ ) belirgin bir şekilde bağlantılı olduğunu göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** Formik asit, Mitomisin C (MMC), Lenfosit kültürü, sitokinezi engellenmiş hücrelerde mikroçekirdek analizi, nekrotik hücre, apoptotik hücre

### ABSTRACT

Formic acid is an ubiquitous chemical constituent in the environment, being produced by sources as diverse as vegetation, ants, soil, vehicles, biomass burning, and photochemical reactions. Human peripheral blood lymphocyte cells were treated with 20, 40, 60, 80 mM concentrations of formic acid for 48 h. A significant increase was observed for induction of micronucleus frequency in all treatments of formic acid concentrations for 48 h comparing with the negative control and mitomycin C (MMC, 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) which was used as positive control. This increase in the frequency of micronuclei has been dose dependent manner. The results showed that there were significant correlation between formic acid concentration and micronuclei frequency ( $r= 0.92$ ), necrotic cells ( $r= 0.95$ ), and apoptotic cells ( $r= 0.91$ ).

**Key words:** Formic acid, Mitomycin C (MMC), Lymphocyte cultures, cytokinesis-block micronucleus assay, necrotic cell, apoptotic cell

## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Kısaltmalar

- BN : Binükleer, iki çekirdekli  
CYT-B : Cytochalasin-B  
DNA : Deoksiribonükleik asit  
FISH : Flora İn situ hibridizasyon  
ISH : İn situ hibridizasyon  
NCBİ : Nükleer sitotoksik bölünme indeksi  
MMC : Mitomisin C  
MN : Mikronükleus  
KKD : Kardeş kromozomlarda kromatid değişimi



**ÇİZELGELER LİSTESİ**

	<u>Sayfa no</u>
Tablo 4.1. Formik asidin insan lenfositlerinde mikronükleus sıklığı, nükleer bölünme indeksi, nükleer sitotoksikbölünme indeksine etkileri	32
Tablo 4.2. Formik asidin insan lenfositlerinde oluşturduğu apoptotik ve nekrotik hücreler (2000 hücrede)	33
Çizelge 4.1. Formik asit doz-mikronükleus regresyon çizelgesi	33
Çizelge 4.2. Mikronükleus frekansı-apoptotik hücre regresyon çizelgesi	34
Çizelge 4.3. Mikronükleus frekansı-nekrotik hücre regresyon çizelgesi	34

**ŞEKİLLERİN LİSTESİ**

	<u>Sayfa no</u>
Şekil 2.1.Mikronükleus oluşumu	9
Şekil 2.2.Sitotoksik yada genotoksik ajanlarla karşılaşanbir hücrenin geçirebileceği değişimler	10

## RESİMLERİN LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Resim 2.1.Sitokinezi bloke edilmiş bir mikronükleusu bulunan hücre	12
Resim 2.2.Sitokinezi bloke edilmiş iki mikronükleus bulunan hücre	12
Resim 2.3.Mitoz bölünmede nükleusların dışında kalan mikronükleus oluşturmaya aday iki kromozom görülen hücre	13
Resim 4.1.Normal sitokinezi engellenmiş iki nükleuslu hücre	27
Resim 4.2.Sitokinezi engellenmiş iki nükleuslu ve bir mikronükleus içeren hücre	28
Resim 4.3.Sitokinezi engellenmiş bir nükleuslu ve iki mikronükleus içeren hücre	28
Resim 4.4.a.Sitokinezi engellenmiş iki nükleuslu ve iki mikronükleus içeren hücre	29
Resim 4.4.b.Sitokinezi engellenmiş iki nükleuslu ve iki mikronükleus içeren hücre	29
Resim 4.5.Sitokinezi engellenmiş üç nükleuslu ve bir mikronükleus içeren hücre	30
Resim 4.6.Sitokinezi engellenmiş birden fazla mikronükleus içeren ve apoptoza girmekte olan hücre	30
Resim 4.7.Apoptotik hücre	31
Resim 4.8.a.Solgun bir sitoplazmaya, çok sayıda küçük vakuollere ve bozulmuş yapıda sitoplazmik ve nükleer membrana sahip nekrotik hücre	31
Resim 4.8.b.Solgun bir sitoplazmaya, çok sayıda küçük vakuollere ve bozulmuş yapıda sitoplazmik ve nükleer membrana sahip nekrotik hücre	32

## 1. GİRİŞ

Canlı vücudunun başlıca yapı taşı hücredir. Bir insanın vücudunda trilyonlarca (70 kg'lık bir insan vücudunda ise 70 trilyondan fazla) hücre bulunmaktadır. Bu hücrelerin her birinin çekirdeğinin içinde bulunan DNA molekülü, kendi eksenini etrafında kıvrılarak yükselen bir çift spiral yapıdadır. Mesela, bir insan vücudundaki bütün DNA moleküllerini çözerek arka arkaya dizersek, dünya ile güneş arasında 400 defadan fazla gidip gelinebilmektedir. Bir organizmaya ait bütün bilgiler DNA moleküllerinde 4 özel nükleotidin (A, T, G ve C) diziliş sırasına göre kodlanmıştır. Bir insana ait DNA molekülünde yaklaşık 3,5 milyar nükleotid yani 3,5 milyar harf bulunmaktadır. Diğer bir deyişle 46 kromozomlu bir insan hücresindeki "DNA molekülleri" her cildi 20 000 sayfalık 46 cilt dev bir ansiklopediye" benzemektedir. DNA üzerindeki bu 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. Mesela, yine 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;

- 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 belirleyecektir [2].

Canlıların yaşamlarını sürdürdükleri sürece birbiri ile etkileşen en önemli iki unsur; türe ait genom ve onun çevresidir. Genetik karakteristik çevreden etkilenir ve bu etkileşim gelecek nesillere aktarılır. Çevre görece 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 durumdadır. Bununla birlikte pek çok veri, insanoğlunun son üç yüz yılında büyük bir çevresel kalıcı değişim ile karşılaştığını göstermektedir. Böylece insan çevre-gen uyumsuzluğu ortamında yaşamakta ve pek çok kronik hastalık (diyabet, hipertansiyon, kanser) ile karşılaşmaktadır. Bilimsel yönden bakıldığında da kaçınılmaz gibi görünen gen-çevre uyumsuzluğu ve sonuçları, toplumsal açıdan bakıldığında “uygarlık hastalıkları” olarak da adlandırılabilir [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 ) bozulabilir. Bu durumda DNA’ nın sentezlediği protein veya enzim bozulur. Böylece canlının, proteinden dolayı yapısı, enzimlerinden dolayı metabolizması değişebilir. Bir gen mutasyona uğradıktan sonra kararlı hale gelir ve tekrar eski haline dönmek için herhangi bir eğilim göstermez. Mutasyon terimi genel olarak, kromozom sayısının değişmesini ve genlerdeki değişiklikleri kapsar. Genetik maddenin miktarında, organizasyonunda ya da yapısındaki değişikliği ifade etmekte kullanılır. Genetik maddede gen rekombinasyonundan başka nedenlerle ve ani olarak oluşan değişikliklere mutasyon denilmektedir [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 bilinmektedir. Bu maddeler insanlarda tedavisi mümkün olan geçici rahatsızlıklar yapabildiği gibi, en önemlisi ve en tehlikelisi olan, ayrıca tedavisi de olmayan kalıtsal yapıda oluşturabilecekleri DNA

hasarları da ortaya çıkartabilirler. Kişinin DNA'sının zarar görmesi, kansere yatkınlığının artması demektir. Kimyasal maddelerin insan kromozomlarında oluşturduğu hasarlar kısa süreli genotoksidite testleri ile belirlenebilmektedir. Kanserojen ve mutajen maddelerin önemli özelliklerinden biri, çok düşük konsantrasyonlarda bile etkili olabilmeleridir. Mevcut kimyasal yöntemlerle dokularda bulunan bu tür maddelerin kimyasal yapılarının analitik şekilde tespiti mümkün değildir. Kimyasal yöntemlerle bu maddelerin tespit edilmesi mümkün olmadığı için, biyolojik yöntem indikatör canlıların dokularında kanserojen ve mutajen madde taraması esasına dayanan yöntemler önem kazanmıştır [6].

Bu çalışmanın amacı, insan lenfosit kültürü kullanılarak mikronükleus oluşum mekanizması yöntemi ile, formik asidin gen, kromozomlar ve hücre bölünme mekanizması üzerine yaptığı etkileri belirlemektir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. 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 [7].

Doymuş monokarboksilli asitlerin en küçük üyesidir. Bir değerli asit olup, aldehitlere benzer. Kimyasal indirgen özellik de gösterir. Formik asit, renksiz, keskin kokulu bir sıvı olup, yoğunluğu 1,22 gr/cm<sup>3</sup>dür. 100,7°C’de kaynar, 8,4°C’de donar. Suda, alkolde ve eterde her oranda çözünür. Deri ile temas ettiğinde yakar. 160°C’ye kadar ısıtılırsa, karbondioksit ve hidrojene ayrışır. Tabiatta, odun katranında ve ısırgan otunda, karıncalarda, terde, idrarda ve et suyunda serbest olarak bulunur [8].

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

#### **2.1.1. Metanol zehirlenme belirtileri**

Metil alkol, vücutta metabolizmaya uğramadığı zaman zararsız ve sadece sarhoş edici bir etkisi bulunmakla birlikte, vücutta dönüştüğü 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. Toksikite, oluşan 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 [9].

### **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 duyuusal özellikleri düzeltme gibi pek çok amaçla katılan maddelerdir [10]. Formik asit gazlı içecekler, meyve ve sebze konservelerinde koruyucu madde olarak kullanılmaktadır [11].

Gıda katkı maddelerinin kullanılması ile ilgili tarihsel gelişmeler incelendiğinde, M.Ö. 3 000 yıllarında et ürünlerini kürlenmede 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 [10].

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 gerçekleştirilebilir. 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 [10].

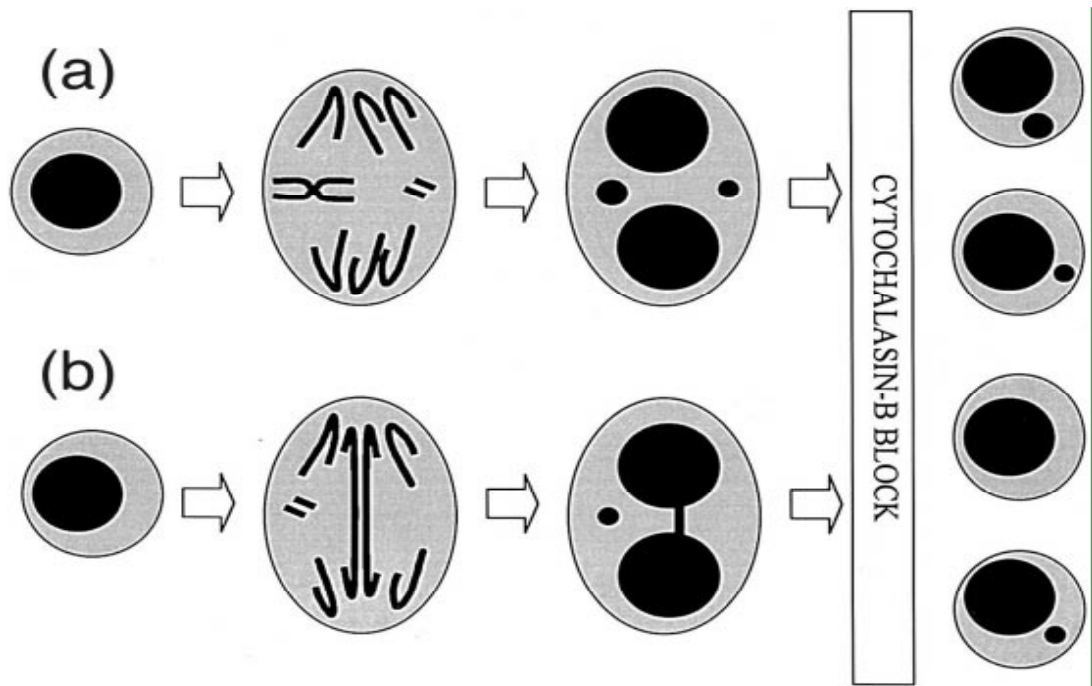
## **2.2. Mikronükleus Tekniği ve Kullanım Alanları**

Teknolojinin gelişimi, toplumların refah düzeyini artırmakla birlikte, insanın ve çevrenin maruz kaldığı fiziksel ve kimyasal mutajenlerin çeşitliliğini de artırmaktadır. Kişilerin içki, sigara, uyuşturucu, ilaç kullanımı ve beslenme alışkanlıkları, yaşanan bölgenin çevresel kirlilik ve doğal radyoaktivite düzeyi, ailesel genetik eğilim gibi ilk anda akla gelen farklılıklar biyolojik hasarların sebeplerinin ve düzeylerinin tespitini zorlaştırmaktadır [12]. Son yıllarda biyolojik hasarların tespitinde en yaygın şekilde kullanılan iki analiz yönteminden 1.'si iyonizasyon radyasyonlara has kromozom hasarlarının tayini ile biyolojik dozunun hesaplanmasına imkan veren Kromozom Aberasyon Analizi (CA),2.'si ise, maruz kalma şartlarına göre fiziksel ve kimyasal mutajenlerin ayrı ayrı veya bir aradaki biyolojik hasarlarının tespitine imkan veren Mikronükleus Analizi (MN) yöntemidir [13]. Mikronükleus testi, kromozomal kırığın kalitatif tayininin hızla yapılmasını sağlamaktadır ve kimyasalların mutajenliğini aksettiren bir metod olup kolay başarılmış ve sitoplazmada daimidir. Mikronükleusun tanınması teknik olarak çok kolaydır ve bu teknik metafazdaki kromozomların direk gösterilmesinden 15 defa daha hızlıdır. Mikronükleus sayımı kromozomal aberasyon tespitine göre daha az teknik malzeme gerektirdiğinden ve daha hızlı olduğundan dolayı bu teste nazaran daha fazla tercih edilmektedir. [14].

### **2.2.1. Mikronükleus**

MN'lar, mitoz sırasında kutuplara gidemeyen tüm kromozomlar yada sentromeri olmayan kromozom kırıklarını içeren bölünen hücrelerde görülebilir. Anafazda, geri kalan kromozomlar ve parçaları etrafında nükleer bir zar oluşur ve bu yapı hücrenin ana çekirdeğinden daha küçük olduğundan "mikronükleus (MN)" olarak adlandırılır (Şekil 2.1). Bundan dolayı, MN'lar hem kromozom kırılması hem de kromozom kaybının uygun ve güvenilir ölçümünü sağlar. MN'lar çekirdek bölünmesi tamamlandıktan sonra oluştuğu için, hücre döngüsünün binükleer (iki çekirdekli,

BN) safhasında ideal olarak ölçülür. Bazen binükleer hücrelerde nükleuslar arasında nükleoplazmik köprüler gözlenmektedir. Bunlar olasılıkla disentrik kromozomlar olabilir. İki sentromer hücrenin karşı kutbuna çekilmekte ve DNA oluşan köprü sonucunda nükleer zarla etrafı çevrenmektedir (Sekil 2.1). Böylece binükleer hücrelerde nükleoplazmik köprüler mikronükleus hesaplanması yanı sıra kromozom yeniden düzenlenmesinin tamamlayıcı ölçümüne olanak sağlar. Bu analiz, bölünmeyen ya da hücre bölünme kinetiği tam olarak anlaşılammış ve kontrol edilemeyen bölünen hücre gruplarında etkili ve kantitatif olarak kullanılamayabilir. Sonuç olarak bir hücre popülasyonunda bölünmeyen ve mitoz geçiren hücreleri ayırt etmek için bir metodun geliştirilmesi gerekmektedir. Üstelik bir yada daha fazla nükleer bölünmeden sonra MN'ların akıbeti belirsiz olduğundan, bir nükleer bölünmeyi tamamlayan hücrelerin tanımlanması çok önemlidir [15,16].

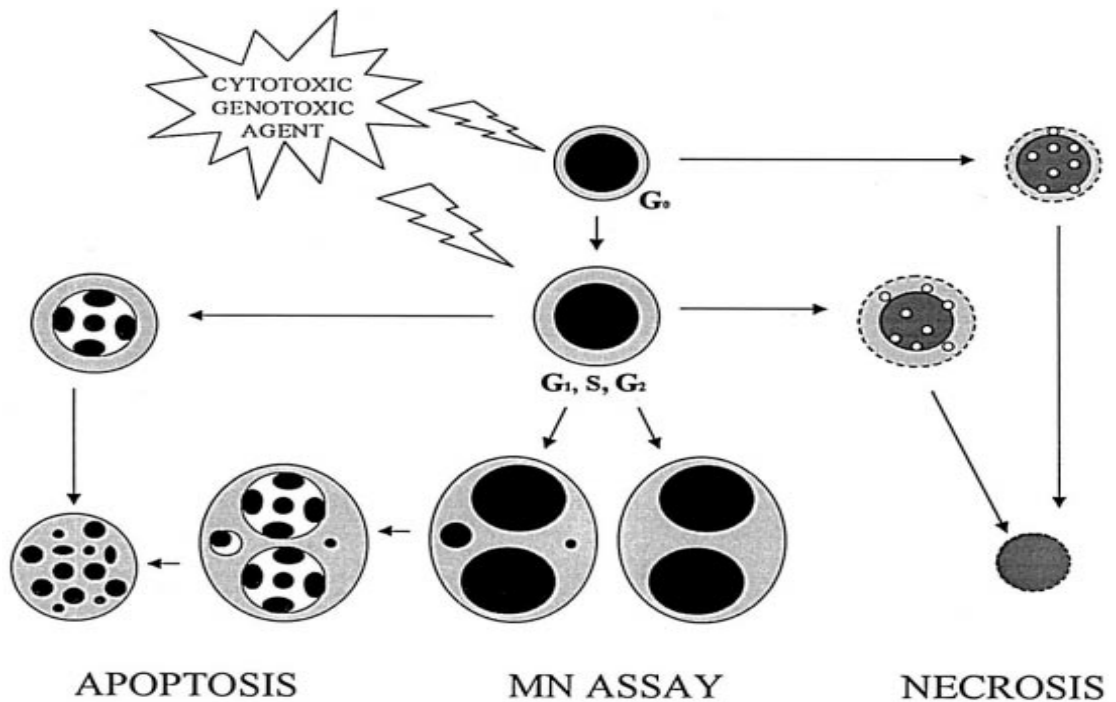


Şekil 2.1. Mikronükleus oluşumu. (a) Mikronükleuslar, anafazda geri kalan kromozomlar ve asentrik kromozom parçalarından orjin alır. (b) Sentromerleri ile hücrenin karşı kutuplarına çekilen disentrik kromozomlardan nükleoplazmik köprü oluşumu ve asentrik kromozom parçasından eş zamanlı olarak mikronükleusun oluşumu. Sitokalazin-B (Cyt-B), binükleer evrede hücre bölünmesini bloke eder. Bu şema, sadece 2 çift kromozomlu bir hipotetik hücre örneğini gösterir.

Stathmokinetik, flow sitometrik ve DNA etiketleme esasına dayanan birkaç metot önerilmiştir. Ancak kolaylığından dolayı sitokinez-bloklu mikronükleus (CBMN) metodu tercih edilmiştir [15-17].

Mikronükleuslar (MN) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır. MN sayısındaki yükseliş, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Anöploidiyi uyaran ajanlar, sentromer bölünme hatalarına ve iğ iplikçiklerinde fonksiyon bozukluklarına yol açarak; klastojenler ise kromozom kırıkları oluşturarak MN oluşumuna katkıda bulunmaktadır [18-21].

MN sayısındaki artış sitotoksik veya genotoksik ajanların hücrede oluşturduğu sayısal ve yapısal değişikliklerin göstergesidir(Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Sitotoksik ya da genotoksik ajanlarla karşılaşan bir hücrenin geçirebileceği değişimler [22].

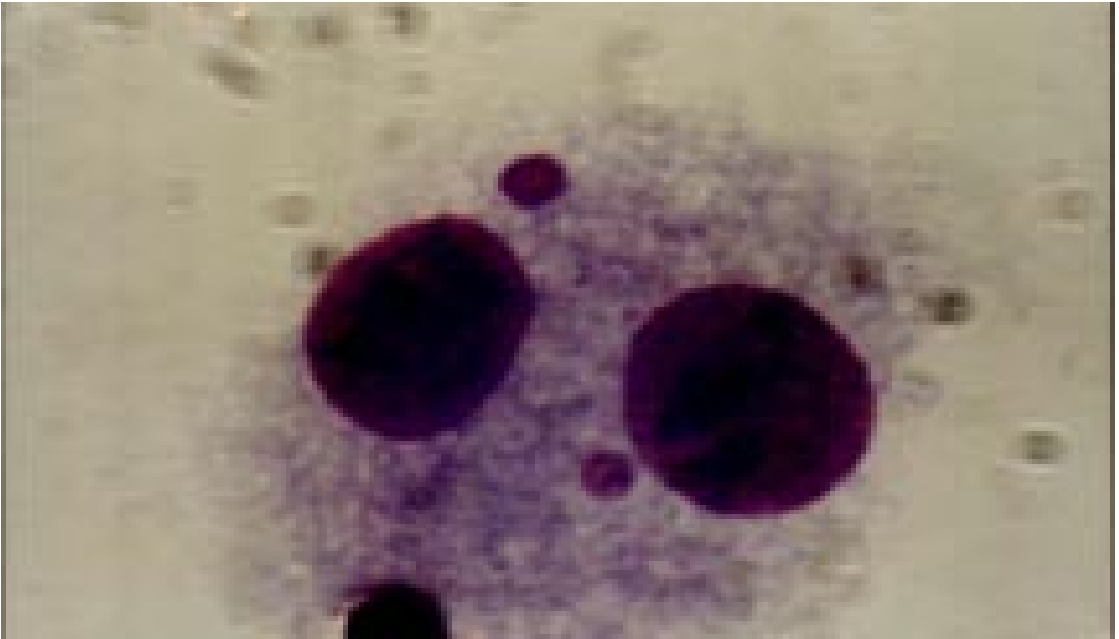
### 2.2.2. Mikronükleus tekniğinin gelişimi

MN testi 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde [22,23] ve daha sonra Haddle ve arkadaşları tarafından kültüre edilmiş [24] insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bazı araştırmacılar [25-27] geliştirdikleri modifiye metotlarla anöploidiye yol açan ajanlar ile klastojenleri birbirinden ayırmada MN büyüklük farkından yararlanmışlar; klastojenlerce uyarılan MN'ların asentrik kromozomal fragmanlar içeren küçük, anojenlerce uyarılan MN'ların tam kromozomlar içeren daha büyük ebatlı olduğunu göstermişlerdir. Eastmond ve Tucker [28] aynı amaçla antikinetokor antikorumları kullanarak kinetokor pozitif MN'ların tam bir kromozom, kinetokor negatif MN'ların ise asentrik kromozom fragmanı içerdiğini ve bu yöntemin anöploidi uyaran ajanları klastojenlerden ayırmada daha kesin bir yol olduğunu vurgulamışlardır. Daha sonraları Fenech ve Morley [15,17] tarafından geliştirilen Sitokinezi-Blok (Cytokinesis-Blocked) Metodu, bazı kinetik problemlerin ortadan kalkmasını ve tekniğin uygulanmasındaki güvenilirliğin artmasını sağlamıştır. Bu metot, küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan Cytochalasin-B(Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanmaktadır. Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B ilavesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir. İncelenen alanda, kültür süresi içinde ikinci bölünmesini tamamlamış 4 çekirdekli hücrelere de rastlanmaktadır, ancak MN sayımında Heddle ve Countryman'ın [26] kriterleri kullanıldığından bu hücrelerde görülen MN'lar değerlendirme dışı bırakılmaktadır. Heddle ve Countryman'ın [26] kriterlerine göre:

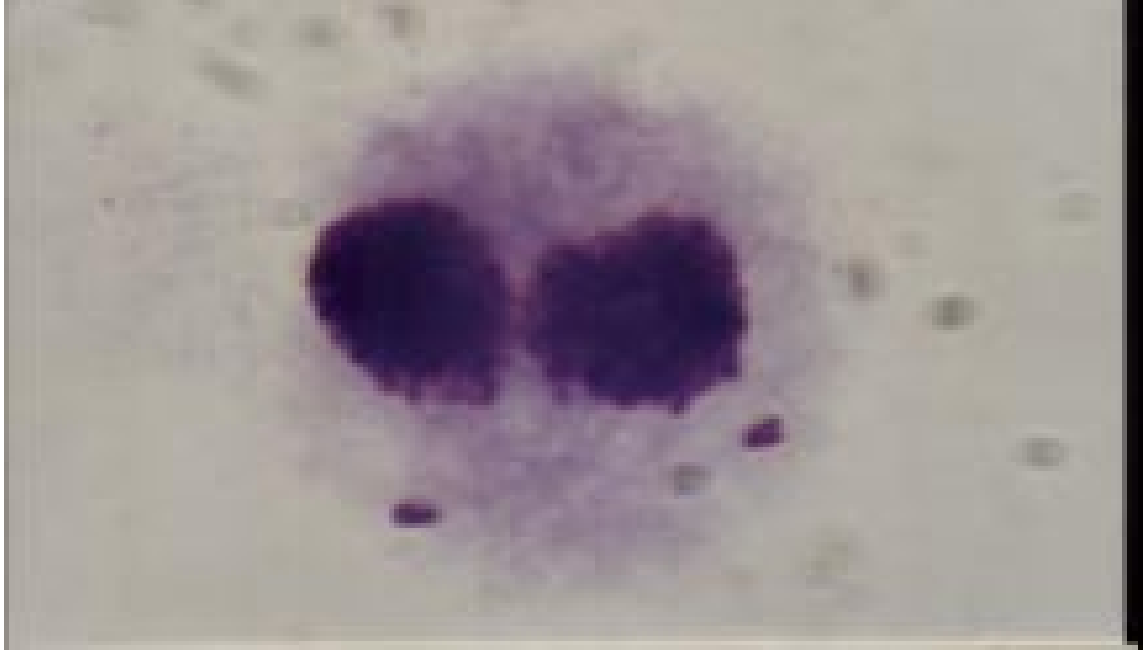
1. MN çapının esas çekirdeğin 1/3'ünden küçük olması;
2. Boya alma yoğunluğunun esas çekirdek ile aynı olması;
3. Sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MN'ların sayılması esas alınmaktadır (Resim2.1,2.2 ve 2.3).



Resim 2.1. Sitokinezi bloke edilmiş bir mikronükleusu bulunan hücre



Resim 2.2. Sitokinezi bloke edilmiş iki mikronükleus bulunan hücre



Resim 2.3. Mitoz bölünmede nükleusların dışında kalan ve mikronükleus oluşturmaya aday iki kromozom görülen hücre

Lenfosit kültürlerindeki çalışmalara paralel olarak MN tekniği, ekfoliyatif hücrelere 1982 yılında ilk defa Stich ve arkadaşları [29] tarafından uygulanmıştır. Bu teknik sayesinde ağız, burun, bronş ve ürotelyal ekfoliyatif hücrelerde kimyasalların ve enfeksiyonların etkilerini değerlendirmek mümkün olmuştur [30,31]. Hızla çoğalan bu epitelyal dokular çevreleriyle sürekli temas halindedir ve epitelin yüzeysel tabakasını oluşturan ekfoliyatif hücreler kolaylıkla elde edilebilmekte, dolayısıyla uğradıkları genotoksik hasar da kolaylıkla gösterilebilmektedir. Böylece bu hücreler ait oldukları dokularda meydana gelen morfoloji bozukluğunu, kromozom kırıklarını, premalign değişiklikleri ve kanseri gösterebildiklerinden bir biyomarker olarak değerlendirilebilmekte ve karsinojenlere maruz kalmış bireylerde artmış kanser riskini göstermek amacıyla kullanılabilir [31-33]. Ekfoliyatif hücrelerde uygulanan MN tekniğinde Fuelgen-Fast Gren boyama yöntemi kullanılmakta, hücrenin çekirdeği parlak pembe, sitoplazması ise açık yeşil boyanmaktadır. MN araştırmalarında in situ hibridizasyon (ISH) tekniği, ilk defa kromozomların sentromerini tanımlamak için Norppa ve arkadaşları [34] tarafından uygulanmıştır; bu çalışmada kullanılan proplar, 1989 yılında Meyne ve arkadaşları [35] tarafından hazırlanmış insan kromozomlarının her biriyle hibridize olabilen sentromere spesifik



oligonükleotidlerdir. Daha sonra, floresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniği ile MN oluşturan kromozomların her birinin kimliğini belirleyebilecek teknolojik gelişmeler sağlanmıştır [36].

### 2.2.3. Mikronükleus tekniğinin kullanım alanları

Mavournin ve arkadaşları [37] 1990 yılına kadar kimyasalların canlılar üzerindeki etkilerini belirleyebilmek için yapılan tüm MN test sonuçlarını toplayarak, ABD Çevre Koruma Grubunun Gen-toks Programı dahilinde değerlendirmeye aldılar. Memelilerin kan ve kemik iliğinde in vivo çalışılmış olan 414 bileşiğin sadece 220'sinin kriterlere uygun test edilebildiği ortaya çıktı. Uygun test edilen kimyasallar arasında karsinojenlerin oranı % 91 olarak saptandı; ancak negatif testlerin azlığı ciddi bir eksiklik olarak bildirildi. Ayrıca bu çalışmalarda esas alınan ve yıllar önce Schmid [38] tarafından tanımlanan MN test protokolünün modifikasyonuna ihtiyaç duyulduğu ve daha fazla çalışmanın gerekli olduğu vurgulandı. Fiziksel ajanların etkileri deneysel MN çalışmaları yanında, 13 Eylül 1987' de Goiânia'da (Brezilya) meydana gelen radyolojik kazanın genetik materyalde oluşturduğu hasarı belirlemek için kullanıldı. MN sıklığında iyonizan radyasyonun dozuna bağlı çok anlamlı bir artış gözlemlendi ve MN testinin biyolojik dozimetre olarak kullanılması önerildi. Ayrıca Goiânia kazasına maruz kalan insanlardaki sitogenetik değişiklikler iyonizan radyasyon ile yaş ve hayat tarzı (alkol tüketimi, sigara kullanımı) gibi faktörlerin etkisi birlikte ele alınarak değerlendirildi [39]. Daha sonra bu konuda yapılan çeşitli araştırmalar iyonizan radyasyonun ve mikro dalga ışınların klastojenik etkisini açıkça ortaya koydu ve ayrıca mikro dalga ışınların, anöploidi uyaran bazı kimyasalların, karakteristik mutajen özelliklerine de sahip olduğu gösterildi [22,40-43]. Yeni doğan bebeklerde ve 18-25 yaş grubu bireylerde yapılan iki ayrı çalışmada [44,45] MN frekansının erkek ve dişi cinsiyete bağlı bir farklılık göstermediği saptanmıştır. Ancak yaşlılarda yapılan bir diğer çalışmada [36] kadınlarda MN sıklığının yaşlanma ile artış gösterdiği anlaşılmış; ayrıca FISH tekniği ile MN oluşturan kromozomların kimliği belirlenerek; yaşlı kadınlarda X kromozomlarının otozomal kromozomlardan daha sık olarak MN oluşumuna katıldığı gösterilmiştir. X kromozom kaybı, aynı zamanda monozomik hücrelerde karyotip analizleriyle de doğrulanmıştır. Sonuç

olarak; sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilen MN testi, organizmayı etkileyen çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların sitogenetik etkilerini belirlemek için yapılabilecek büyük çaplı tarama çalışmalarında güvenle kullanılabilir.

### **2.3. Analiz Yöntemleri**

#### **2.3.1. İnsan lenfositlerindeki standart sitokinez-blok mikronükleus analizi**

Bu metod, küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan CytochalasinB (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanmaktadır. Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B ilavesiyle, ilk nükleus bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş binükleuslu (BN) hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir [16]. İnsan hücrelerinde ' mikronükleus indeksi ' genetik toksikoloji araştırılmasında kullanılan standart sitogenetik testlerinden biri olmuştur [46]. Cyt-B, ilk mitotik bölünmeden önce eklenmelidir ve Cyt-B ile sitokinez bloke edildikten sonra BN hücreler oluşmaktadır [47].

#### **2.3.2. İnsan lenfositleri için kan kültürü**

İnsan lenfositlerinde, CBMN analizi tam kan kültürü kullanarak da gerçekleştirilebilir. 0.4-0.5 ml tam kan, fetal kalf serum, Lglutamin, antibiyotik ve PHA ile desteklenmiş 4.5 ml kültür ortamına eklenir. Cyt-B, PHA stimulasyondan sonra 44. saatte eklenir. Binükleer hücrelerinin biriktiği Cyt-B' nin en uygun konsantrasyonu, tam kan kültüründe 6 µg/ml' dir [47]. Binükleer lenfositler, Cyt-B eklendikten 28 saat sonra, kırmızı kan hücrelerini parçalamak için 0.075 M KCl ile muamele edilir ve lama aktarmadan ve boyanmadan önce metanol: asetik asit ile fikse edilir (smear hücrelerinde lamlar kuruduktan sonra fikse edilir). Alternatif olarak, Ficoll gradienti kullanılarak tam kan kültüründen binükleer lenfositleri izole etmek mümkündür. İzole edilen hücreler daha sonra sitosantrifugasyon ile lamlara transfer edilir. Sonra hücreler fikse edilir ve boyanır.

### 2.3.3.Sitokinez-bloklu ve sitokinez-bloksuz hücrelerdeki mikronükleus analizi

Binükleer hücreleri elde etmek için kullanılan Cyt-B'nin MN oluşumunda bazı karışıklıklara sebep olduğu ile ilgili bazı tartışmalar vardır [48]. Normal hücrelerle yapılan çalışmalarda Cyt-B'nin MN'ları indüklediği veya sitokinezde hücreleri bloke etmek için kullanılan dozlardaki binükleer hücrelerde MN frekansı ile Cyt-B'nin doza bağlı etkisi olmadığı gösterilmiştir [16,49-51]. Son bir çalışmada sitokinez-bloke edilen binükleer hücrelerde iğ ipliği zehirleri tarafından indüklenen MN oluşumunun beklenenden daha az olduğu öne sürülmüştür, çünkü kutuplar arası mesafenin kısılması geri kalan kromozom parçaları ya da tam kromozomların nükleusa geri katılma olasılığını artırabilir. Fakat bu CBMN analizinin etkinliğini azaltmaz [52]. Hücre bölünme kinetiğinin yetersiz kontrollerinden dolayı yanlış negatif sonuçlardan kaçınmak ve Cyt-B'nin olası etkisini en aza indirmek için Cyt-B kullanmadan in vitro MN analiziyle ilgili araştırmalara ilgi artmıştır. Normal hücrelerde CBMN analiziyle elde edilen hatalı bir pozitif sonucun kanıtı olmamasına karşın, zaten Cyt-B kullanılan insan lenfosit kültürlerindeki MN indüksiyonu ile ilgili MN analizi için yeterli kanıt vardır [16,17,53]. Yine de; Cyt-B'li veya Cyt-B'siz karşılaştırmalı son MN çalışmaları, eğer iyi büyüyen hücreler kullanılırsa kültür ve çekirdek bölünme koşulları en iyi seviyede olursa, güçlü klastojenler test edildiği zaman Cyt-B'li ve Cyt-B'siz MN analizleri arasındaki sonuçlarını karşılaştırmanın mümkün olduğunu göstermiştir [54,55]. MN oluşumunun matematiksel modeli, 1. BN hücrelerdeki MN sayımı mikronükleus frekansının belirlenmesinde güvenilir bir yoldur ve 2. sitokinez-blok olmadan yapılan kültürlerdeki mononükleer (tek çekirdekli) hücrelerde MN sayımı, test edilen kimyasal çekirdek bölünmesini inhibe ettiğinde veya kültür koşulları optimal sayıda hücre bölünmesine izin vermediğinde yanlış negatif sonuçlar ortaya çıkarabilir [56]. Sonuç olarak, Cyt-B'siz kültürlerdeki mononükleer hücrelerdeki mikronükleusların sayılmasıyla elde edilen mikronükleus frekansı sonuçları, yanlış negatif sonuçlardan dolayı CBMN analizi kullanılarak doğrulanmalıdır.

### **2.3.4. Mikronükleus ve non-disjunction'daki kromozom kaybını ölçmek için geliştirilen moleküler teknikler**

CBMN analizinde, MN'ların tam kromozomlardan mı yoksa asentrik parçalardan mı köken aldığını ayırt etmek, sentromerik DNA propları ya da kinetokor proteinlerine (aktif kromozomların sentromerik bölgesinde toplanan) bağlanan antibadiler kullanarak mümkündür. İnsan hücrelerinde veya diğer hücre tiplerinde kromozom büyüklükleri heterojen olduğundan ve küçük bir MN ya büyük bir kromozomun parçasını ya da küçük bir kromozomun tümünü içerebildiğinden, MN büyüklüğü bu ayırım için kullanılamaz. Kullanım açısından anti-kinetokor antibadi metodu en basit ve ucuz bir tekniktir [57], ancak bu yaklaşımla tek olan kromozomlar arasında ayırım yapılamaz ve inaktif sentromerler üzerinde kinetokorların olmamasından dolayı kromozom kaybı belirlenemeyebilir [58]. Sentromerik bölgeleri tanımlamak için kullanılan in situ hibridizasyon (ISH) yöntemi çok pahalı ve zahmetlidir, ancak daha spesifiklik sağlar. Örneğin, tek kromozomlar için sentromerik proplar kullanılabilir, bu proplar BN hücrelerde non-disjunctional (ayrılmama) olayların (yavru nükleuslarda homolog kromozomların eşit dağılmaması gibi) belirlenmesine olanak sağlar [59].

### **3.GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. Gereçler**

##### **3.1.1. Demirbaş malzemeler**

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. Foto mikroskop (Olympus BH-2,Nikon Coolpix 8800)
9. Su banyosu
10. 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**

1. Cytochalasin-B (Sigma, C-6762)
2. Heparin
3. Giemsa (Merck, 5400512)
4. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (merck, 9021622)
5. Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>H<sub>2</sub>0 (Merck, K1 690176)
6. Glasial asetik asit (Merck, 247K18855556)
7. Metanol (Merck, 502K05275408)
8. Ksilol (Merck, 207K037553)
9. Entellan® (Merck, 640171987)
10. İmmersiyon yağı® (Merck, 09403569)
11. KCL (Merck, 340TA611835)
12. Alkol
13. Formik asit (Merck)( % 98-100 )
14. Distile su

15. Tüplük
16. Çeşitli cam malzemeler
17. Konik tabanlı 10ml'lik steril kültür tüpü
18. Enjektör
19. Çeşitli ebatlarda puarlar
20. 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 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 [1].

#### **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 [60].

### **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 [60].

**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.

**Cytochalsin-B:** CBMN analizinde, bir nükleer bölünmeyi tamamlayan hücreler, sitokalazin-B (Cyt-B) kullanılarak sitokinez bloke edilir ve bu hücreler binükleer hücreler olarak tanımlanırlar. Cyt-B, sitokinez esnasında kardeş nükleuslar arasındaki sitoplazmayı daraltan mikrofilament halkanın oluşması için gerekli olan aktin polimerizasyonun bir inhibitörüdür [61]. Kültür tüplerine 44. saatte 6 µg/ml eklenerek kullanılmıştır.

**Hipotonik eriyik:** Hipotonik eriyik olarak % 0, 4'lk 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 glasiyal asetik asit' in 3 kısım metanol (1/3: glasiyal 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'lik boya eriyiği kullanılmıştır.

## **3.2. Yöntem**

### **3.2.1. Çalışma grubu**

Sigara içmeyen, 23-24 yaşlarında sağlıklı, 3 erkek ve 3 bayan toplam 6 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, 44. saatte Cyt-B eklemek koşuluyla 72 saat kültüre edildi.

### **3.2.4. Çıkarım işlemleri**

Umegaki ve arkadaşlarının MN elde etmek için çalışmasında kullanılan Balasem ve Ali metoduna göre çıkarım işlemleri yapıldı [62, 63].

1. 72 saat inkubasyondan sonra kültür tüpleri etüvden çıkartılarak 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı.
2. Dipte 0.6-0.7 ml kalıncaya kadar üstteki supernatantlar atıldı.
3. Daha sonra hücrelere laboratuvar ısısında beklemiş, olan % 0.4'lük hipotonik solüsyonundan 6 ml eklenerek 15 dakika laboratuvar ısısında bekletildi.
4. Hücreler hipotonik solüsyonunda bekletildikten sonra 10 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi.

5. Süpernatantları atılıp üzerine taze hazırlanmış soğuk fiksatiften 6 ml (3:1, metanol: glasial asetik asit) yavaşça damla damla ilave edilip bekletmeden 10 dakika 1000 rpm'de santrifüj yapıldı.

6. Süpernatantların tekrar atılıp üzerine aynı fiksatiften 6 ml ilave edilip, 10 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi. Bu işlem üç kez tekrarlandı.

### **3.2.5. Preparat hazırlama**

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

### **3.2.6. Preparatların boyanması ve saklanması**

Sorenson boya tamponu (pH=7.0):Sorenson boya tamponu 5.26 g  $\text{KH}_2\text{P}_0_4$  ve 8.65 g  $\text{Na}_2\text{HP}_0_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  tartılıp distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. 90 ml Sorenson boya tamponu üzerine 10 ml giemsa boyası eklenerek giemsa boyası hazırlandı.

Kurumuş olan preparatlar yeni hazırlanan % 10'luk giemsa 15dakika boyandıktan hemen sonra 2 kez distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar ksilolden geçirildikten sonra kanada balsamı (entellan) damlatılarak lamelle kapatıldı.

### **3.2.7. Lamların incelenmesi ve MN sıklığının değerlendirilmesi**

En iyi görüntü 1000X'lik büyütmede sağlandı. Lamlar analizden önce numaralandırılmalıdır. Her bir duplike kültürden alınan lamlar için bir skor elde edilmelidir. Her bir preparat aşağıdaki bilgileri içeriyordu [46].

1. MN'ların sayısı, en azından 1000 BN hücrede sayılmalıdır ve 1000 BN hücre başına MN frekansı hesaplanmalıdır. BN hücrede MN'ların sayılmasında kullanılan kriterler detaylı bir şekilde aşağıda açıklanmıştır.
2. Sıfır, bir veya daha fazla MN içeren BN hücre dağılımı; tek bir BN hücrede MN sayısı normalde sağlıklı bireylerin lenfositlerinde 0 ila 3 arasında değişmektedir ancak maruz kalınan genotoksine ve yaşa bağlı olarak 3'den fazla olabilir.
3. Mikronükleuslu BN hücrelerinin frekansı, en azından 1000 BN hücrede bulunmalıdır.
4. 1000 BN hücresinde nükleoplazmik köprü frekansı hesaplanmalıdır.
5. 500 hücre başına tek çekirdekli (mononükleer), iki çekirdekli (binükleer), üç çekirdekli (trinükleer) ve dört çekirdekli (tetranükleer) hücrelerin oranı hesaplanmalıdır. Bu bilgiye dayanarak çekirdek bölünme indeksi oluşturulabilir.
6. Canlı ya da apoptoz veya nekrozdan dolayı ölen hücrelerin sayısı, aynı preparat üzerinde 500 hücre başına tek-, iki- ve çok- çekirdekli hücreler sayılırken sayılabilir. Hücreler sayılırken, hücre tanımlanamadığında skorlanan hücrelere dahil edilmez.

### **3.2.8. Sitokinezi bloke edilmiş binükleer hücreleri tanımlama kriterleri:**

MN frekansı değerlendirilecek olan sitokinezi bloke edilmiş hücreler aşağıdaki kriterleri içermek zorundadır [46].

1. Hücreler binükleer (iki çekirdekli) olmalıdır.
2. Binükleer hücredeki iki çekirdeğin boyutu yaklaşık olarak aynı olmalı ve yoğun boyanmalıdır.
3. Binükleer hücredeki iki çekirdek nükleoplazmik bir köprü ile bağlanabilir. Bu nükleoplazmik köprü çekirdek çapının 1/4' ünden büyük olmamalıdır.

4. Binükleer hücredeki iki çekirdek birbirine temas edebilir, ancak ideal olarak birbirinin üzerine çıkmamış olmalıdır. İki çekirdeği üst üste çıkmış olan bir hücre eğer her bir çekirdeğin çekirdek sınırları ayırt edilebiliyorsa sayılmalıdır.

5. Binükleer hücrenin sitoplazmik sınırı ya da zar yapısı bozulmamış olmalı ve komşu hücrelerin sitoplazmik sınırından açıkça ayırt edilebilmelidir.

### 3.2.9. Mikronükleus sayımı

Sayılan çekirdeklerin tekrar sayılmaması için ışık mikroskopunda 400X büyütmede sitoplazması dağılmayıp sınırları belli olan çekirdekler belirlendi ve sadece bunlar sayıldı. Kontrol kişiler için duplike olarak yapılan kültürlerden hazırlanan preparatlarda 2000 BN hücre sayıldı ve mikronükleuslar kaydedildi. Aynı zamanda, her bir kişi için, 500 mononükleer (tek çekirdekli) hücre başına binükleer (iki çekirdekli), trinükleer (üç çekirdekli) ve tetranükleer (dört çekirdekli) hücrelerin sayısı da kaydedildi ve çekirdek bölünme indeksi (NDI) hesaplandı [46].

Nükleer bölünme indeksi (NBİ) =  $(M_1 + 2(M_2) + 3(M_3) + 4(M_4)) / N$  formülüne göre hesaplanmıştır Burada M1- M4 hücre ve içindeki çekirdek sayısını, N ise sayılan toplam hücre sayısını göstermektedir [28].

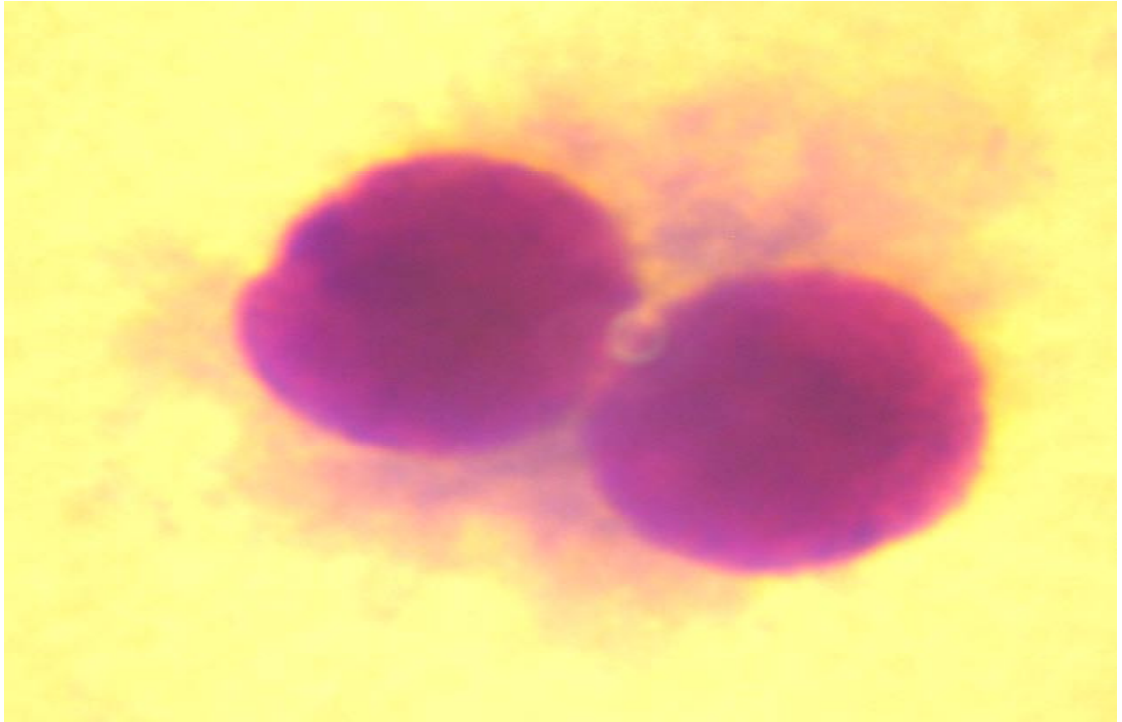
Apoptotik ve nekrotik hücreler ışık mikroskopunda çekirdeğin yapısına bakılarak belirlenmiştir. Apoptotik hücrelerde nükleus küçük parçalara ayrılmıştır ve hücre zarının yapısı kısmen bozulmuştur. Nekrotik hücrelerde ise solgun bir çekirdek yapısı vardır ve içleri boşluklarla doludur. Nekrotik hücrelerin sitoplazmasının yapısı da bozulmuştur [64]. NCBİ: Nükleer sitotoksik bölünme indeksi:  $(Ap+Nec + M_1 + 2(M_2) + 3(M_3) + 4(M_4)) / N$  formülü yardımı ile hesaplanmıştır.

### 3.2.10. Hücre sayısı ve istatistiksel değerlendirme

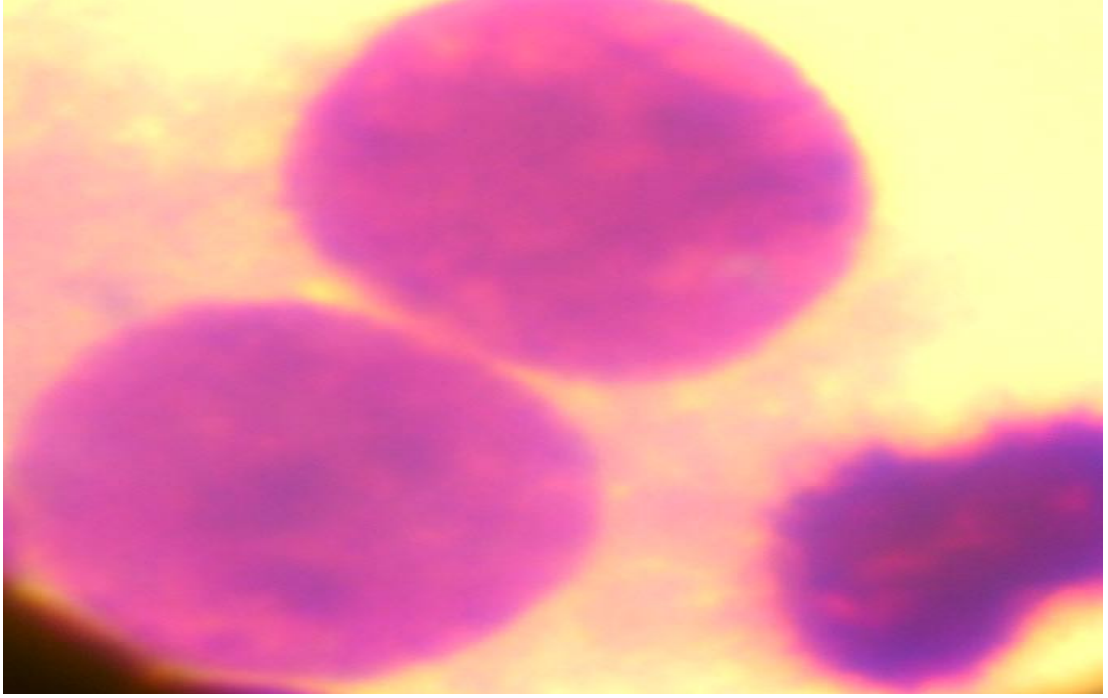
İstatistiksel analiz “GraphPad InStat version 3.05 for Windows 95 (GraphPad Software, San Diego California USA)” programıyla yapılmıştır. Kültürde bulunan hücrelerdeki mikronükleus sıklığındaki artış Dunnett’s *t*-test ile hesaplanmıştır [65].

#### 4.BULGULAR

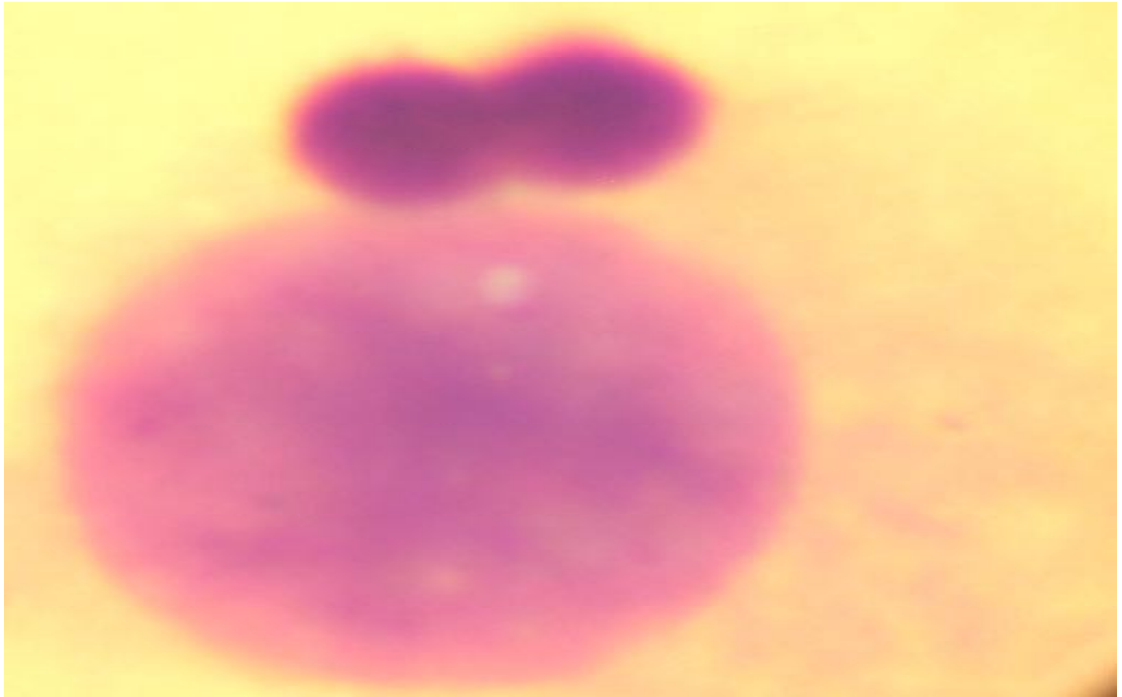
Formik asidin 4 farklı dozu (20, 40, 60, 80 *mM*) insan periferel kanının kullanıldığı lenfosit kültürüne 24. saatte eklenmiştir. Sitokinez olayı sitokalsin-B ile engellenerek mikronükleus sıklığı ve hücre ölümü (apoptoz ve nekroz) incelenmiştir. İnsan hücrelerine formik asidin yaptığı etki tablo 4.1’de gösterilmiştir. Formik asit tüm dozlarda kontrollere göre mikronükleus sıklığını ve hücre ölümünü istatistiksel olarak artırmıştır. 48 saat süresinde MN sıklığındaki artış doza bağımlıdır ( $r= 0.92$ ). Çekirdek bölünme indeksi hücrelerde bulunan çekirdek sayısına göre hesaplanmıştır ve Tablo 4.1’de verilmiştir.



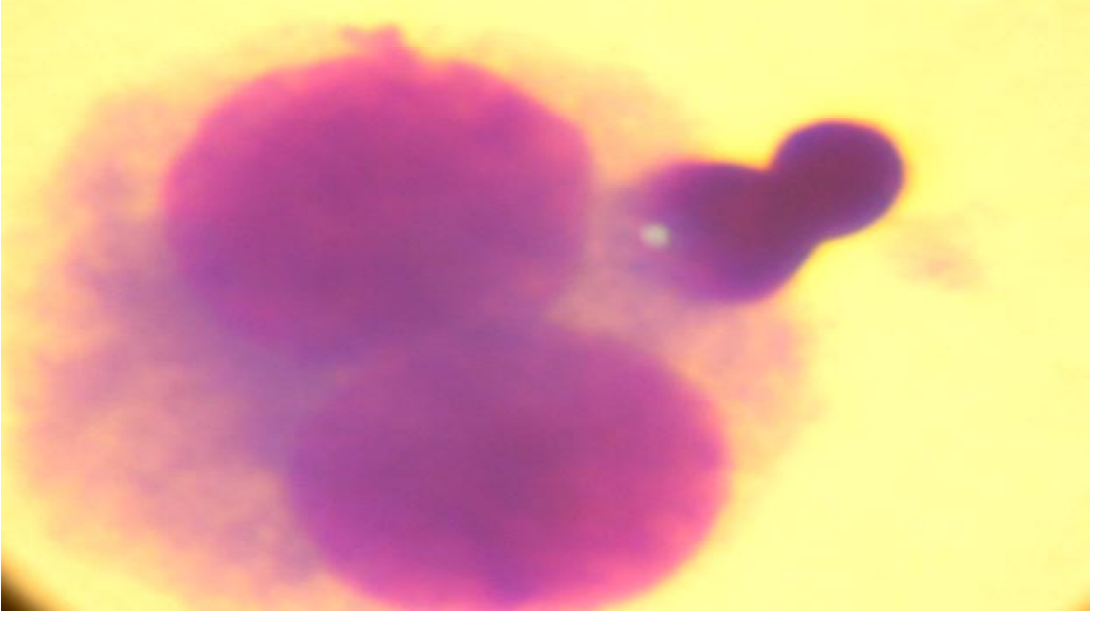
Resim 4.1. Normal sitokinezi engellenmiş iki nükleuslu hücre.



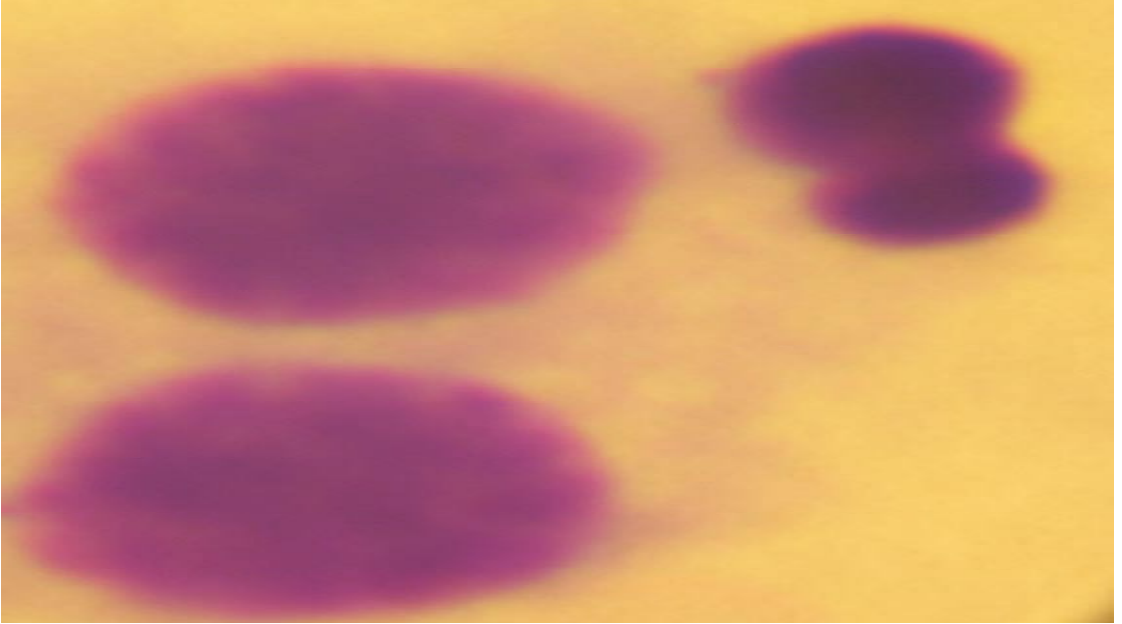
Resim 4.2. Sitokinezi engellenmiş iki nükleuslu ve bir mikronükleus içeren hücre.



Resim 4.3. Sitokinezi engellenmiş bir nükleuslu ve iki mikronükleus içeren hücre.

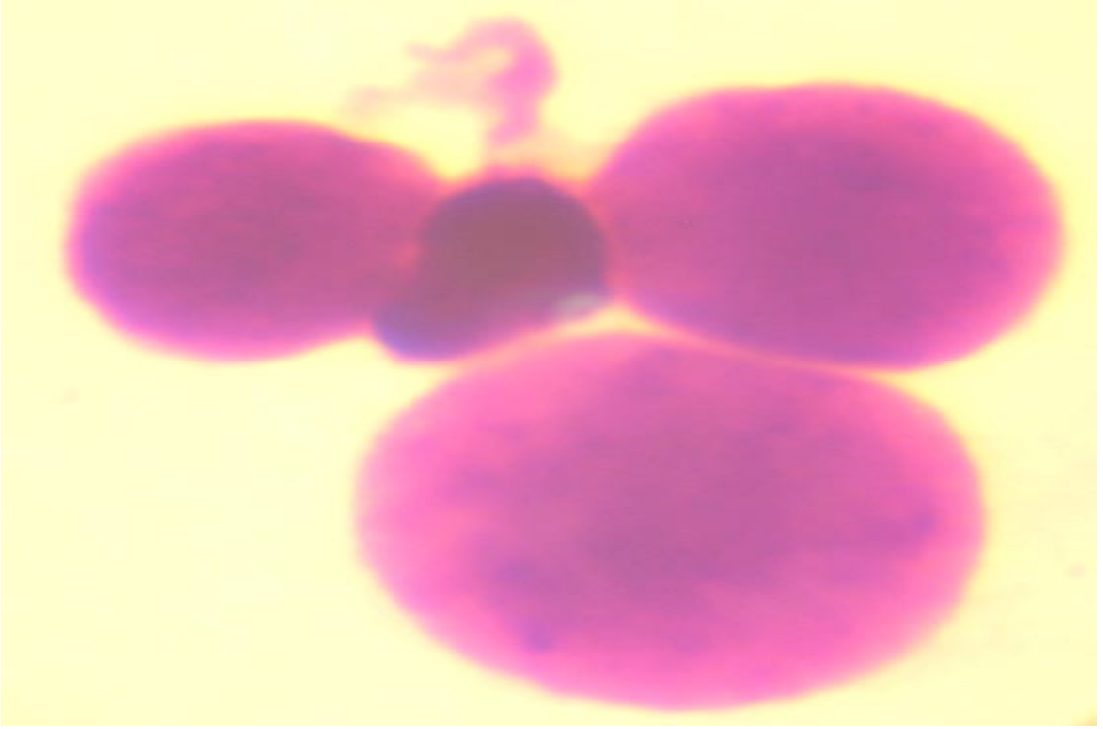


Resim 4.4.a. Sitokinezi engellenmiş iki nükleuslu ve iki mikronükleus içeren hücre.

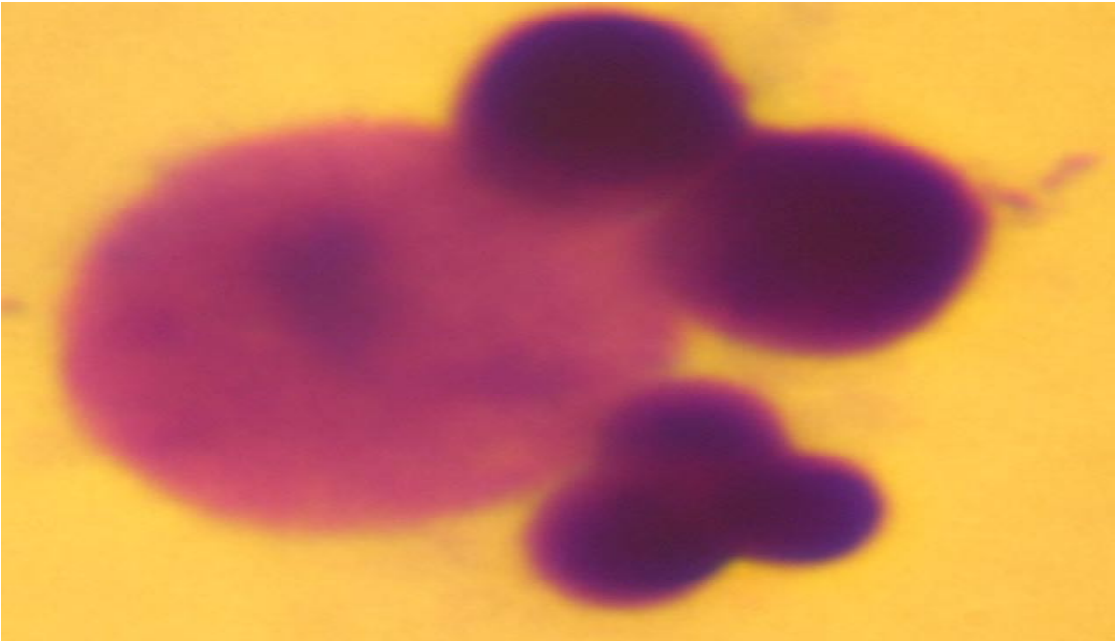


Resim 4.4.b. Sitokinezi engellenmiş iki nükleuslu ve iki mikronükleus içeren hücre.

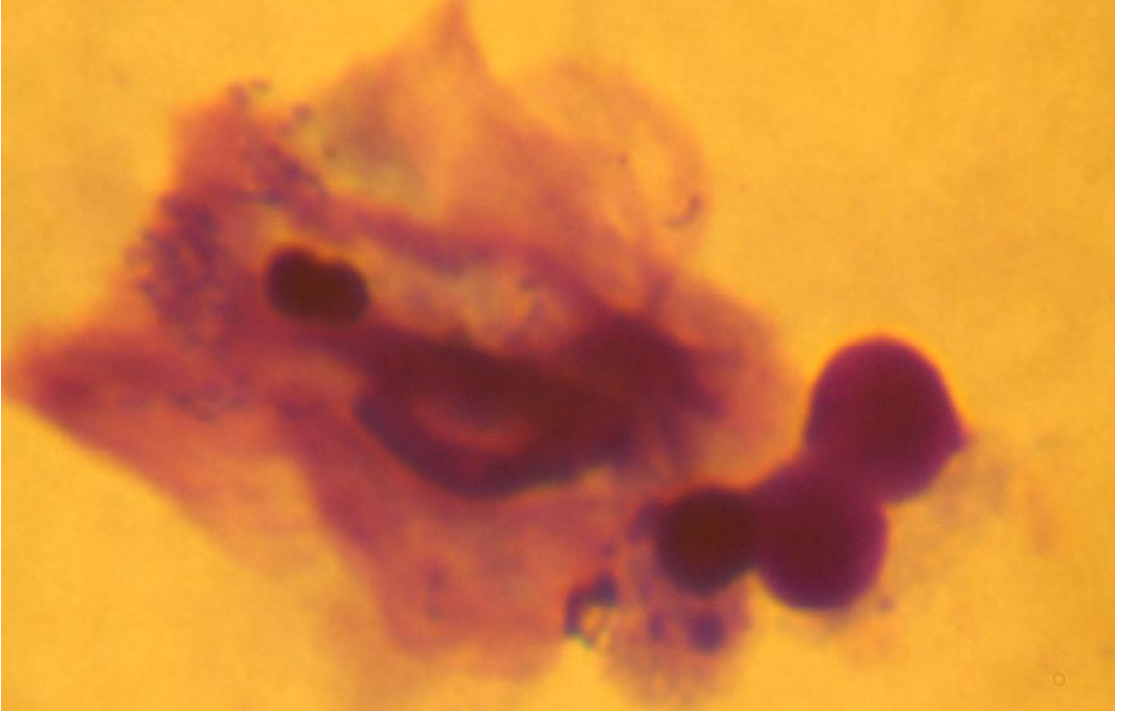




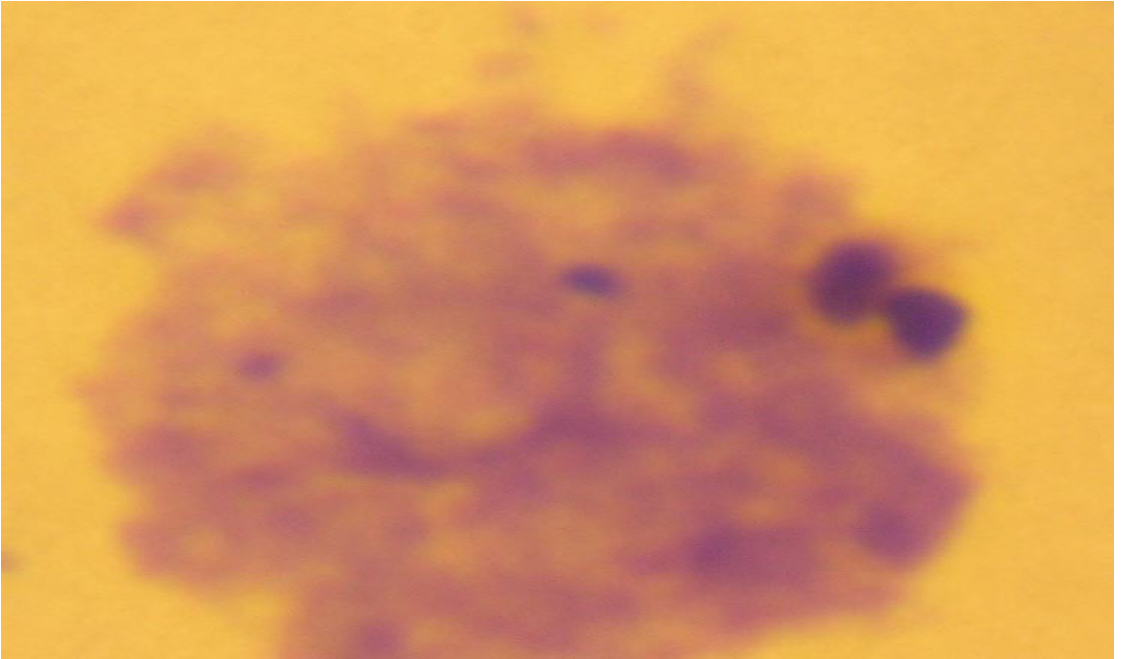
Resim 4.5. Sitokinezi engellenmiş üç nükleuslu ve bir mikronükleus içeren hücre.



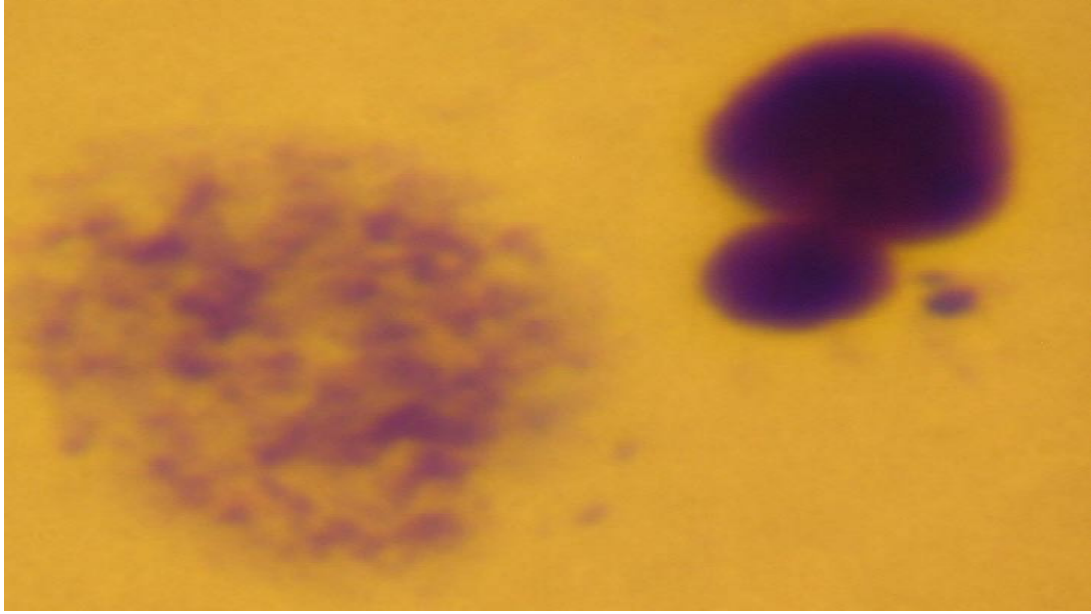
Resim 4.6. Sitokinezi engellenmiş birden fazla mikronükleus içeren ve apoptoza gitmekte olan bir hücre.



Resim 4.7. Apoptotik bir hücre.



Resim 4.8.a. Solgun bir sitoplazmaya, çok sayıda küçük vakuollere ve bozulmuş yapıda stoplazmik ve nükleer membrana sahip nekrotik hücre



Resim 4.8.b. Solgun bir sitoplazmaya, çok sayıda küçük vakuollere ve bozulmuş yapıda stoplazmik ve nükleer membrana sahip nekrotik hücre.

Tablo 4.1. Formik asidin insan lenfositlerinde mikronükleus sıklığı, nükleer bölünme indeksi, nükleer sitotoksik bölünme indeksine etkileri

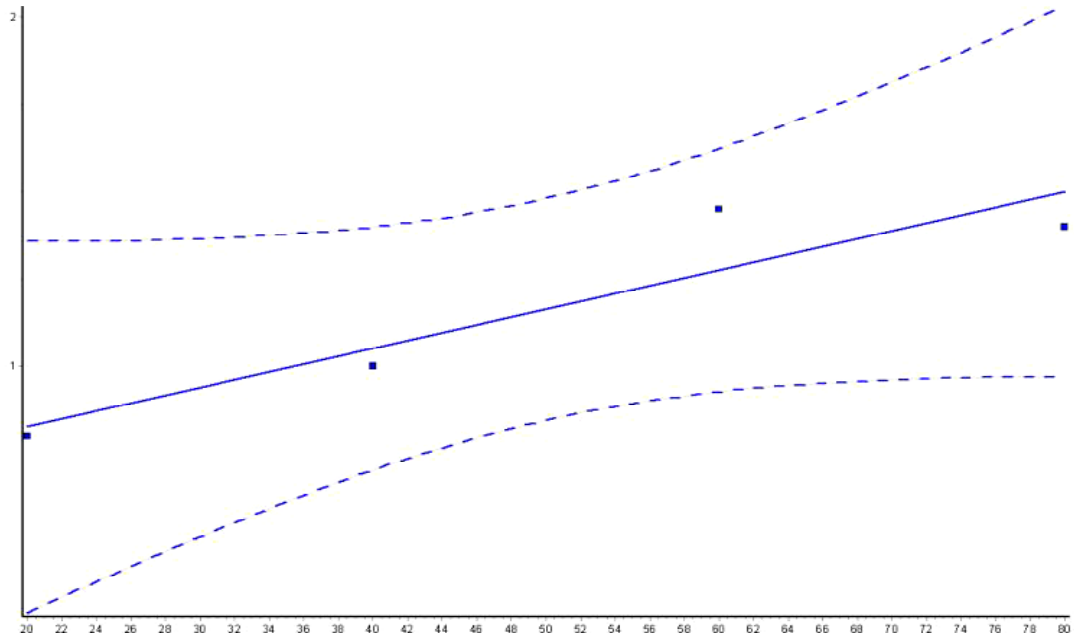
	Uygulama		Sayılan Hücre Sayısı	MN sayısının Binükleer hücelere dağılımı				MN/hücre (%) $\pm$ SH	NBİ	NSBİ
	Süre (s)	Doz		1	2	3	4			
Negatif Kontrol	-	-	2000	1	0	0	0	0.05 $\pm$ 0.01	1.981 $\pm$ 0.34	1.981 $\pm$ 0.25
PK (MMC)	48	0.5 $\mu$ g/ml	2000	150	16	1	0	9.25 $\pm$ 1.32	1.332 $\pm$ 0.83	1.359 $\pm$ 1.10
Formik Asit	48	20 mM	2000	7	1	1	1	0.8 $\pm$ 0.12*	1.713 $\pm$ 0.38	1.731 $\pm$ 0.48
	48	40 mM	2000	7	1	1	2	1.0 $\pm$ 0.35*	1.678 $\pm$ 0.55	1.697 $\pm$ 0.76
	48	60 mM	2000	9	3	2	2	1.45 $\pm$ 0.28*	1.626 $\pm$ 0.68	1.667 $\pm$ 0.47
	48	80 mM	2000	17	2	1	1	1.40 $\pm$ 0.38*	1.592 $\pm$ 0.78	1.625 $\pm$ 0.55

\*Belirgin bir şekilde negatif kontrolden farklı  $P < 0.0001$  (Dunnett's  $t$ -test). NBİ: Nükleer Bölünme indeksi. NSBİ: Nükleer sitotoksik bölünme indeksi. PK: Pozitif Kontrol. SH: Standart Hata

Tablo 4.2. Formik asit'in insan lenfositlerinde oluşturduğu apoptotik ve nekrotik hücreler (2000 hücrede)

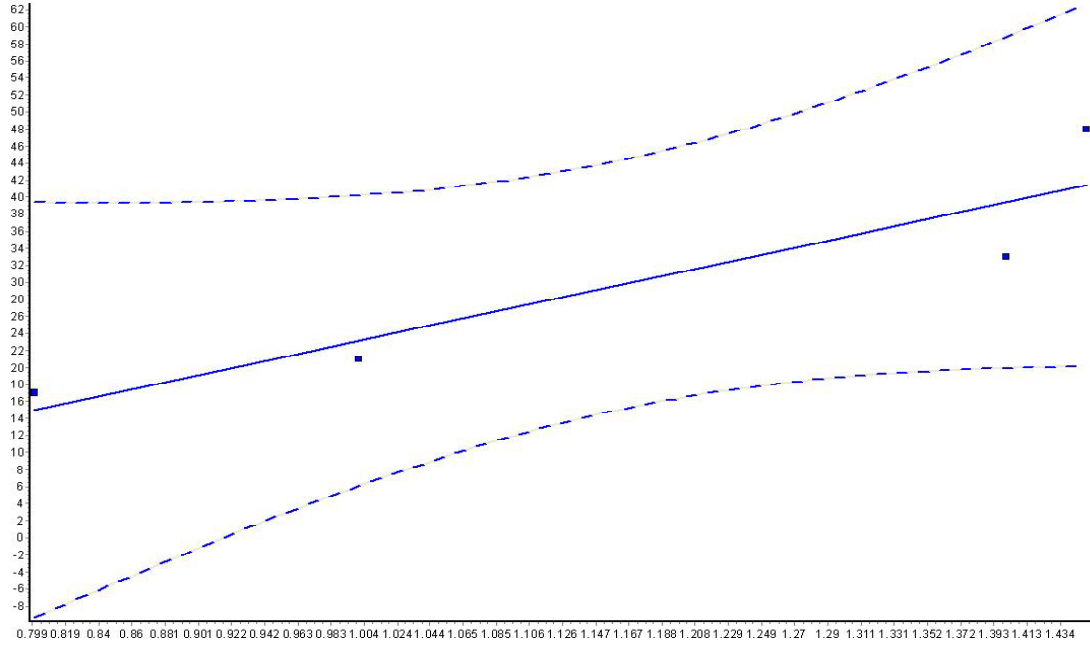
Doz	Apoptotik Hücre/SH	Nekrotik Hücre/SH
20 m M	17.16±0.37	19.24±3.75
40 mM	21.22±0.86	18.01±2.83
60 mM	48.45±5.33	34.23±5.85
80 mM	33.46±2.15	34.27±6.30

Çizelge 4.1. Formik asit doz-mikronükleus regressyon çizelgesi.



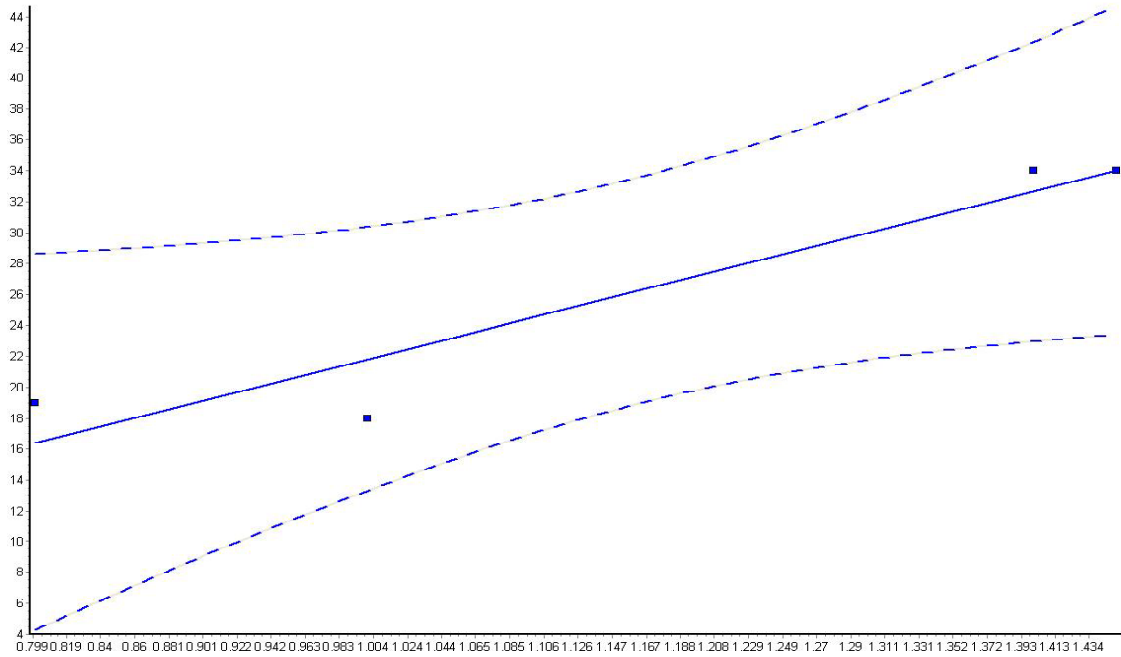
MN frekansı ile apoptotik hücre sayısı arasında pozitif bir korelasyon vardır ( $r=0.91$ ). Bu korelasyon çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. MN frekansı-apoptotik hücre regressyon çizelgesi.



Nekrotik hücrelerle MN frekansı arasındada pozitif bir korelasyon ( $r= 0.95$ ) vardır ve bu ilişki çizelge 4.3'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.3. Mikronükleus frekansı- nekrotik hücre regressyon çizelgesi



Tablo ve çizelgelerden de görülebileceği gibi formik asit MN frekansını artırmakta, bölünme indeksini düşürmekte, apoptoz ve nekroza sebep olmaktadır.

## 5. TARTIŞMA

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

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 genetoksik olmayan kanserojen olduğu görüşü yaygındır. Uluslar arası kanser araştırmaları ajansının (I.A.R.C.) değerlendirmesinde insan için kanserojenik olmayan bir madde olarak varsayıлып 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.

Bir hücre herhangi bir mutajen madde ile karşılaştığında çeşitli yollarla bu etkiden kurtulmaya çalışır. Mikronükleus oluşumu da bu yollardan birisidir. Eğer savunma yolları başarısız olursa hücre ölümü denilen apoptoz ve nekroz yolları devreye girer.

MN'lar, mitoz sırasında kutuplara gidemeyen tüm kromozomlar yada sentromeri olmayan kromozom kırıklarını içeren bölünen hücrelerde görülebilir. Anafazda, geri kalan kromozomlar ve parçaları etrafında nükleer bir zar oluşur ve bu yapı hücrenin ana çekirdeğinden daha küçük olduğundan "mikronükleus (MN)" olarak adlandırılır. Bundan dolayı, MN'lar hem kromozom kırılması hem de kromozom kaybının uygun ve güvenilir ölçümünü sağlar. MN'lar çekirdek bölünmesi tamamlandıktan sonra oluştuğu için, hücre döngüsünün binükleer (iki çekirdekli, BN) safhasında ideal olarak ölçülür [15,16]. Bazen binükleer hücrelerde nükleuslar arasında nükleoplazmik köprüler gözlenmektedir. Bunlar olasılıkla disentrik kromozomlar olabilir. İki sentromer hücrenin karşı kutbuna çekilmekte ve DNA oluşan köprü sonucunda nükleer zarla etrafı çevrelenmektedir. Böylece binükleer hücrelerde nükleoplazmik köprüler mikronükleus hesaplanması yanısıra kromozom yeniden düzenlenmesinin tamamlayıcı ölçümüne olanak sağlar. Bu analiz, bölünmeyen ya da hücre bölünme kinetiği tam olarak anlaşılammış ve kontrol edilemeyen bölünen hücre gruplarında etkili ve kantitatif olarak kullanılamayabilir. Sonuç olarak bir hücre popülasyonunda bölünmeyen ve mitoz geçiren hücreleri ayırt etmek için bir metodun geliştirilmesi gerekmektedir. Üstelik bir yada daha fazla nükleer bölünmeden sonra MN' ların akıbeti belirsiz olduğundan, bir nükleer bölünmeyi tamamlayan hücrelerin tanımlanması çok önemlidir.



Sentromerik DNA propları ya da kinetokor proteinlerine (aktif kromozomların sentromerik bölgesinde toplanan) bağlanan antibadiler kullanarak, CBMN analizinde, MN'ların tam kromozomlardan mı yoksa asentrik parçalardan mı köken aldığını ayırt etmek, mümkündür. Çalışmamızda böyle bir kriter denenmemiştir bu da başka bir çalışmanın konusu olabilir. İnsan hücrelerinde veya diğer hücre tiplerinde kromozom büyüklükleri heterojen olduğundan ve küçük bir MN ya büyük bir kromozomun parçasını ya da küçük bir kromozomun tümünü içerebildiğinden, MN büyüklüğü bu ayırım için kullanılamaz.

Uzun, Sodyum hipoklorit üretilen ortamda çalışan kişiler üzerinde araştırma yapmış DNA ya da kromozom seviyesindeki hasarların göstergesi olarak önerilen mikronükleus (MN) testi kullanılarak, mesleki olarak sodyum hipoklorite maruz kalmış 7 kişi ve 7 sağlıklı kontrol kişi üzerinde gerçekleştirmiştir. Sodyum hipoklorite maruz kalmış ve sağlıklı kontrol kişilerden periferal kan örnekleri alınıp kültüre edilmiş. Kültürlere sitokinezi durdurmak amacıyla 44. saatte 3µg/ml son konsantrasyonda sitokalazin B (Cyt-B) eklendi ve 72. Saatte kültürler sonlandırılmıştır.

Sodyum hipoklorite maruz kalmış kişilerin kültüre edilmiş lenfositlerindeki MN değerleri  $1.70 \pm 0.33$  (ortalama  $\pm$  SS) ve kontrol kişilerin MN değerleri  $0.75 \pm 0.27$  bulunmuş. Kontrol kişilerle karşılaştırıldığında sodyum hipoklorite maruz kalmış kişilerin MN değerlerinin istatistiksel (Mann-Whitney U test) olarak kontrollerin MN değerlerinden daha yüksek olduğu bulunmuştur ( $p=0.002$ ). Sonuçlar, sodyum hipoklorite maruz kalmış kişilerin lenfositlerinde kromozomal hasarın varlığına işaret etmektedir [66].

Pınar AKSU ve arkadaşları inci balığı (*Achantalburnus microlepis*) üzerine çalışmışlar ve *Acanthalburnus microlepis* suyun her litresinde sodyum hipokloritin 0.05, 0.10, 0.25, 0.37, 0.50, 0.75 ve 1 mg/lt bulunan konsantrasyonlarına akvaryumda 6 gün maruz bırakmışlardır. Her bir konsantrasyonun bulunduğu denemelerde 10 balık kullanılmıştır. Etkileşime bırakılan her bir konsantrasyon düzeyinde mikronükleus oluşum frekansını saptanmıştır. Kontrol gruplarının, pozitif ve negatif grupla karşılaştırılmasıyla mikronükleus oluşum frekansının arttığını tespit

etmişlerdir. Sodyum hipokloritin LC 50 değerini 0,6343 mg/lt olarak hesaplamışlardır. Sonuçlar, sodyum hipokloritin *Acanthalburnus microlepis*'de genotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir [67].

Dumlupınar Coşgun, insan periferik kan lenfositleri üzerinde mikotoksin sitrininin (CTN) genotoksik ve sitotoksik etkileri çalışmıştır. Altı sağlıklı sigara içmeyen bireyden (3 erkek ve 3 kadın) periferik kan örnekleri alınmış ve kültüre edilmiştir. Lenfosit kültürleri son 48 saat 10 mM, 20 mM, 40 mM, 60 mM, 80 mM, 100 mM konsantrasyonlarda CTN, 0.1 mM konsantrasyonda mitomisin c (pozitif kontrol) ve absolu etanol ile muamele edilmiştir. Sitokinezi durdurmak için, kültürler 44. saatte 3 µg/ml son konsantrasyonda sitokalaz B (Cyt-B) eklenmiş ve 72. saatte kültürler sonlandırılmıştır. CTN, insan lenfositlerinde doza bağlı olarak mikronükleus (MN) frekansında önemli bir artışa ve doza bağlı olarak mitotik indeks (MI) oranlarında önemli bir azalmaya sebep olmuştur. CTN'in, sitokinezi bloke edilmiş lenfositlerde 60 mM, 80 mM, 100 mM konsantrasyonlarda MN oluşumunu artırdığı bulunmuştur (p=0.014). Tüm CTN konsantrasyonları, binükleer hücrelerin oranlarında ve MI değerlerinde açık bir azalmaya yol açmıştır (p=0.014). Bu sonuçlar, kültüre edilmiş insan lenfositlerinde yüksek konsantrasyonlardaki CTN'in genotoksik ve sitotoksik olduğuna işaret etmektedir [68].

Yavuz Kocaman tezinde tarımda artan bir hızla insektisid olarak kullanılan acetamiprid (Acm) ve alpha-cypermethrin (A-cyp)'in tek başına ve karışım halinde kullanıldıklarında insanlar için genotoksik risk oluşturup oluşturmadıklarını, insan periferik lenfositlerinde in vitro kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom anormalliği (KA) ve mikronükleus (MN) testleri ile araştırmıştır. Hücreler, 25, 30, 35, 40 µg/ml Acm'le; 5, 10, 15, 20 µg/ml A-cyp'le; tek başlarına ve bu konsantrasyonların yarısı kadar konsantrasyonlarda bir araya getirilerek karışım (Acm+A-cyp) halinde 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Bu çalışmada, Acm'in bütün süre ve dozlarda KKD'ni, KA'ni, yüksek üç dozda MN oluşumunu istatistiksel olarak önemli derecede arttırdığı; mitotik indeksi (MI) ve nükleus bölünme indeksini (NBI) her iki süre ve tüm dozlarda, proliferasyon indeksini (PI) 24 saatlik muamele için 35, 40 µg/ml'de, 48 saatlik muamele için 40 µg/ml'de önemli derecede

düşürdüğü saptanmıştır. A-cyp'nin bütün süre ve konsantrasyonlarda KKD'ni, KA'ni ve düşük iki konsantrasyonda (15 ve 20 µg/ml A-cyp dozlarında yeterli iki nükleuslu hücre bulunamamıştır) ise MN oluşumunu önemli derecede artırdığı; tüm konsantrasyonlarda MI'i, NBI'ni ve yüksek üç konsantrasyonda PI'ni önemli derecede düşürdüğü saptanmıştır. Acm+A-cyp karışım halinin ise insanlar için ya insektisidlerin tek başlarına muamele edilen kadar ya da daha fazla genotoksik olduğu saptanmıştır [69].

Yapılan çalışmalardan da anlaşılacağı gibi Formik asit üzerine yapılan çalışmalar sınırlıdır. İlerde yapılacak çalışmalar bu madde ile çalışmak zorunda kalan ya da besin katkılarıyla bu maddeye maruz kalan kişilerde in-vivo olarak yapılmalıdır.

Bu çalışma ile formik asitin hücre bölünme mekanizmalarını bozarak mikronükleusa ve hücre ölümüne (apoptoz ve nekroz) sebep olduğu insan lenfosit hücreleri kullanılarak gösterilmiştir.

## 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”, *Chromosoma*, 89:243-53 (1984).
3. Nesse, R. M., Williams, 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. Ağuloğlu, 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 Heidelberg. NATO.ASI.Series, Vol.H 90 pp:567-589(1995)
7. <http://www.kimyasanal.net/konugoster.php?yazi=nejjf3nt7q> (08.05.2009)
8. <http://www.nedirbilelim.com/dizin2/formik-asit.html> (08.04.2009)
9. <http://www.alkokimya.com/urunler.php> (08.04.09)
10. Altuğ, T., “Gıda Katkı Maddeleri”, *Hekim ve Yaşam Dergisi*, Haziran 99, 29- 31 (1999).
11. Morita, T., Takeda, K. and Okumura, K., “Evaluation of clastogenicity of formic acid, acetic acid and lactic acid on cultured mammalian cells”, *Mutat Res*, (1990).
12. Clarkson, T. W., “Principles of risk assessment”, *Adv .Dent.Res.*, 6:22-27 (1992).
13. Paillole, N., Voison, P., “Is micronüklei yeild variability a problem for overexposure dose assessment to ionizing radiation”, *Mutat Res*, 413:47-56 (1998).
14. Suralles, J., Xamena, N., Creus, A., Cataian, J., Norppa, H. and Marcos, R., “İnduction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whoie-blood and isolated human lymphocyte cultures”, *Mutat Res*, 413:47-56
15. Fenech, M., Morley, A. A., “Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay”, *Cytobios*, 43: 233-246 (1985).
16. Fenech, M., Morley, A. A., “Measurement of micronucleus method in human lymphocytes”, *Mutat Res*, 147: 29-36 (1985).

17. Fenech, M., Morley A. A., "Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low-dose x-irradiation", *Mutat Res*, 161: 193-198 (1986).
18. Zijno, A., Marcon, F., Leopardi, P., Salvatore, G., Carere, A., Crebelli, R., "An assessment of the in vivo clastogenicity of erythrosine", *Food Chem Toxic*, 32:159-63 (1994).
19. Vanparys, P., Vermeiren, F., Sysmans, M., Temmerman, R., "The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity", *Mutat Res*, 244:95-103 (1990).
20. Labay, K., Ould-Elhkim, M., Kles, V., Guffroy, M., Poul, J. M., Sanders, P., "Effects of griseofulvin in medium-term liver carcinogenesis assay and peripheral blood micronucleus test in rat", *Teratog Carcinog Mutagen*, 21:441 (2001).
21. Naccarati, A., Molinu, S., Mancuso, M., Siciliano, G., Migliore, L., "Cytogenetic damage in peripheral lymphocytes of mitochondrial disease patients", *Neurol Sci*, 21:963-5 (2000).
22. Widel, M., Kolosza, Z., Jedrus, S., Lukaszczyk, B., Raczek- Zwierzycka, K., Swierniak, A., "Micronucleus assay in vivo provides significant prognostic information in human cervical carcinoma: The updated analysis", *Int J Radiat Biol*, 77:631-6 (2001).
23. Jagetia, G. C., Jayakrishnan, A., Fernandes, D., Vidyasagar, M. S., "Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment", *Mutat Res*, 491:9-16 (2001).
24. Schmid, W., "The micronucleus test", *Mutat Res*, 31:9-15 (1975).
25. Von Ledebur, M. M., Schmid, W., "The micronucleus test: Methodological aspects", *Mutat Res*, 19:109-17 (1973).
26. Heddle, J. A., Countryman, R. I., "The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes", *Mutat Res*, 41:321-32 (1976).
27. Högstedt, B., Karlsson, A., "The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used", *Mutat Res*, 156:229-32 (1985).
28. Eastmond, D. A., Tucker, J. D., "Identification aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody", *Environ Mol Mutagen*, 13:34-43 (1989).
29. Stich, H. F., Stich, W., Parida, B. B., "Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer: Betel quid chewers", *Cancer Lett*, 17:125-34 (1982).

30. Rosin, M. P., Gilbert, A. M., "Modulation of genotoxic effects in humans: Mutation and the environment", Part E, New York, *Wiley-Liss*, 51-9 (1990).
31. Stich, H. F., Rosin, M. P., "Micronuclei in exfoliated human cells as a tool for studies in cancer risk and intervention", *Cancer Lett*, 22:241-53 (1984).
32. Lehucker-Michel, M. P., DiGiorgio, C., Amara Lehucke –Michel, M. P., Amara, Y. A., Laget, M., "The micronucleus assay in human exfoliated urothelial cells: Effects of smoking", *Mutagenesis*, 10:329-32 (1995).
33. Moore, L. E., Warner, M. L., Smith, A. H., Kalman, D., Smith, M. T., "Use of fluorescent micronucleus assay to detect the genotoxic effects of radiation and arsenic exposure in exfoliated human epithelial cells", *Envir Mol Mutagen*, 27:176-84 (1996).
34. Norppa, H., Renzi, L., Lindholm, C., "Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis- blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization", *Mutagenesis*, 8:519-25 (1993).
35. Meyne, J., Littlefield, L. G., Moyzis, R. K., "Labelling of human centromeres using an alphoid DNA consensus sequence: Application to the scoring of chromosome aberrations", *Mutat Res*, 226:75-9 (1989).
36. Richard, F., Muleris, M., Dutrillaux, B., "The frequency of micronuclei with X chromosome increases with age in human females", *Mutat Res*, 316:1-7 (1994).
37. Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F., Heddle, J. A., "The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program", *Mutat Res*, 239:29-80 (1990).
38. Schmid, W., "The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: Hollaender A., ed. Chemical Mutagens, principles and methods for their detection", Vol.4, New York, *Plenum pres*, pp. 31-53 (1976).
39. Cruz, A. D., McArthur, A. G., Silva, C. C., Curado, M. P., Glickman, B. W., "Human micronucleus counts are correlated with age, smoking, and cesium-137 dose in the Goiania (Brazil radiological accident)", *Mutat Res*, 313:57-68 (1994).
40. Yoshida, K., Yamazaki, H., Ozeki, S., Inoue, T., Yoshioka, Y., Yoneda, M., et al., "Mitochondrial genotype and radiation induced micronucleus formation in human osteosarcoma cells in vitro", *Oncol Rep*, 3:615-9 (2001).
41. Oliveira, N. G., Castro, M., Rodrigues, A. S., Goncalves, I. C., Cassapo, R., Fernandes, A. P., et al., "Evaluation of the genotoxic effects of the boron neutron capture reaction in human melanoma cells using the cytokinesis block micronucleus assay". *Mutagenesis*, 16:369-75 (2001).

42. Fucic, A., Garaj-Vrhovac, V., Skara, M., Dimitrovic, B., “X-Rays, microwaves and vinyl chloride monomer; Their clastogenic and aneugenic activity, using the micronucleus assay on human lymphocytes”, *Mutat Res*, 282:265-71 (1992).
43. Jagetia, G. C., Jacob P. S., “The influence of vinblastine treatment on the formation of radiation-induced micronuclei in Mouse bone marrow”, *Hereditas*, 120:51-9 (1994).
44. Çora, T., Demirel, S., Acar, A., Erkul, İ. “Yenidoğan periferel kan lenfosit kültürlerinde fototerapinin uyardığı mikronukleuslar”, *S Ü Tıp Fak Derg*, 8:345 -51 (1992).
45. Acar A., Durakbaşı, H. G., Paydak, F., “Alüminyum sülfatın insan periferel kan lenfosit kültürlerinde mikronukleus uyarımı üzerine etkileri”, *S Ü Tıp Fak Derg*, 11:139-44 (1995).
46. Fenech, M., “The in vitro micronucleus technique”, *Mutat Res*, 455: 81-95 (2000).
47. Surralles, J., Carbonell, E., Marcos, R., Degrassi, F., Antoccia A., Tanzarella, C. A., “Collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes”, *Mutagenesis*, 7 (6): 407-410 (1992).
48. Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardeme, M., et al., “Report from the in vitro micronucleus assay working group”, *Environ Mol Mutagen*, 35:167-172 (2000).
49. Wakata, A., Sasaki, M. S., “Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells: comparison with types and rates of chromosome aberrations”, *Mutat Res*, 190: 51-57(1987).
50. Prosser, J. S., Moquet, J. E., Lloyd, D. C., Edwards, A. A., “Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes”, *Mutat Res*, 199: 37-45 (1988).
51. Lindholm, C., Norpa, H., Hayashi, M., Sorsa, M., “Induction of micronuclei and anaphase aberrations by cytochalasin-B in human lymphocyte cultures”, *Mutat Res*, 260: 369-375 (1991).
52. Minissi, S., Gustavino, B., Degrassi, F., Tanzarella, C., Rizzoni, M., “Effect of cytochalasin-B on the induction of chromosome missegregation by colchicine at low concentrations in human lymphocytes”, *Mutagenesis*, 14: 43-49 (1999).
53. Fenech, M., “The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method”, *Mutat Res*, 392: 11-18 (1997).
54. Kalweit, S., Utesch, D., Hude W.Vonder, Madle, S. “Chemically induced micronucleus formation in V79 cells-comparison of three different test procedures”, *Mutat Res*, 439(2): 183-190 (1999).

55. Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M., Miura, K. F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K., Sofuni, T., “Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU)”, *Mutagenesis*, 14(6):569-580 (1999).
56. Fenech, M., “Mathematical model of the in vitro micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not scored specifically in binucleated cells or cells that have completed one nuclear division”, *Mutagenesis*, 15 (4): 329-336 (2000).
57. Vig, B. K., Swearngin, S. E., “Sequence of centromere separation: kinetochore formation in induced laggards and micronuclei”, *Mutagenesis*, 1: 464-465 (1986).
58. Earnshaw, W. C., Migeon, B. R., “Three related centromere proteins are absent from the inactive centromere of a stable dicentric chromosome”, *Chromosoma*, 92: 290-296 (1985).
59. Farooqi, Z., Darroudi, F., Natarajan, A. T., “Use of fluorescence in situ hybridisation for the detection of aneuploids in cytokinesis-blocked mouse splenocytes”, *Mutagenesis*, 8:329-334 (1993).
60. 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).
61. Carter, S. B. “Effects of cytochalasins on mammalian cells”, *Nature*, 213: 261-264 (1967).
62. Umegaki, K., Ikegami, S., Inoue, K., et al., “Beta – carotene prevents X – ray induction of micronuclei in human lymphocytes”, *Am Clinl Nutr*, 59: 409-412 (1994)
63. Balasem, A. N. and Ali, A. S., “Establishment of dose-response relationships between doses of CS-317 7-rays and frequencies of micronuclei in human peripheral blood”, *Mutat Res*, 259: 133-138 (1991).
64. Fenech, M., Crott, J., Turner, J., Brown, S., “Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide”, *Mutagenesis*, 14(6):605-612 (1999).
65. GraphPad Software, InStat guide to choosing and interpreting statistical tests, GraphPad Software, Inc., San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com) (1998).
66. 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).



67. Aksu, P., Gül, S., Özkan, O., Nur, G., Kaya, T.Ö., “Evaluation of the acute toxicity and genotoxicity of NaOCl on blackbrow bleak (*Acanthalburnus microlepis* De Filippi, 1863)”, *Fresenius Environmental Bulletin*, 17(3):298-302. (2008)
68. Dumlupınar Coşgun, G., “İnsan kan lenfositlerinde sitrinin mikronükleus sıklığı ve mitotik indeks üzerine etkilerinin araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı*, Kayseri, (2006).
69. Yavuz Kocaman, A., “Acetamiprid 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).

## 7. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ayşe ERCİYAS.

Doğum Yeri : Yozgat

Doğum Tarihi : 04.08.1982

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Kayabayazıtöğlu Lisesi–2000(Ankara)

Lisans : Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü–2007

Yüksek Lisans: Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü–2009