

**BİYOLOJİK ÇALIŞMALARDA KULLANILAN
BAZI ÖNEMLİ BOYAR MADDELERİN
GENOTOKSİSİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Halime GENÇ

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalı
Doç. Dr. Özlem BARIŞ
2014
Her hakkı saklıdır**

**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BİYOLOJİK ÇALIŞMALARDA KULLANILAN BAZI ÖNEMLİ
BOYARMADDELERİN GENOTOKSİSİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Halime GENÇ

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Genel Biyoloji Bilim Dalı**

**ERZURUM
2014**

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**BİYOLOJİK ÇALIŞMALARDA KULLANILAN BAZI ÖNEMLİ
BOYARMADDELERİN GENOTOKSİSİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doç. Dr. Özlem BARIŞ danışmanlığında, Halime GENÇ tarafından hazırlanan bu çalışma 10/07/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı – Genel Biyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **oybirliği/oy çokluğu (3./3.)** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE

İmza :

Üye : Doç. Dr. Güzin KABAN

İmza :

Üye : Doç. Dr. Özlem BARIŞ

İmza :

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 17.07.2014 tarih ve 29.904 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BIYOLOJİK ÇALIŞMALARDA KULLANILAN BAZI ÖNEMLİ BOYARMADDELERİN GENOTOKSİSİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Halime GENÇ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özlem BARIŞ

Dünya çapında yıllık 800.000 tonun üzerinde boyarmadde üretilmekte ve bunların %60-70'ini azo boyarmaddeler oluşturmaktadır. Azo boyarmaddeler başta tekstil ve gıda endüstrisi olmak üzere birçok farklı endüstride önemli kullanım alanı bulmaktadırlar. Azo boyarmaddelerin kimyasal yapısına rağmen bu boyarmaddelerin mutajenite ve genotoksisite çalışmaları yetersiz kalmıştır.

Bu çalışmada, biyoloji laboratuvarlarında kullanılan Evans blue, Orange G ve Amido Black 10B azo boyarmaddelerinin mutajenik ve genotoksik özellikleri Ames/*Salmonella*, *E. coli* WP2 ve RAPD-PCR kısa zamanlı test sistemleri kullanılarak araştırılmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda boyarmaddelerin uygulanan konsantrasyonlarda sitotoksik ve mutajenik etki göstermediği ve biyoloji laboratuvarlarında kullanılmasında sakıncalarının olmadığı bulunmuştur.

2014, 93 sayfa

Anahtar Kelimeler: Mutasyon, Boyarmadde, *Salmonella*, RAPD Analizi.

ABSTRACT

Master Thesis

GENOTOXICITY EVALUATION OF SEVERAL IMPORTANT DYESTUFF USED IN BIOLOGICAL STUDIES

Halime GENÇ

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
Science of General Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem BARIŞ

Over 800,000 tons of dyestuffs are annually produced throughout the World, of which 60–70% are azo dyes. Besides of their primary usage in the textile and food industries, azo dyes are commonly found in many different industrial areas. Although chemical structures of azo dyes are well known, the knowledge about their mutagenicity and genotoxicity is insufficient.

In this study, mutagenic and genotoxic properties of Evans Blue, Orange G and Amido Black 10B azo dyes used in biology laboratories were investigated using Ames/*Salmonella*, *E. coli* WP2 and RAPD-PCR short-time test systems.

As a result, in application concentrations of tested dyes, cytotoxic, mutagenic and genotoxic effects have not been determined and according to the results, these dyes can be safely used in biology laboratories up to tested concentrations.

2014, 93 Pages

Keywords: Mutation, Dyestuff, *Salmonella*, RAPD Analysis.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum bu alıŐma Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Bakteriyoloji laboratuvarında yürütülmüŐtür.

AraŐtırmanın planlanmasından yürütülmesine ve sonuçlarının değerlendirilmesine kadar her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, tez danıŐmanım Sayın Doç. Dr. Özlem BARIŞ'a, danıŐmanımdan farklı görmediğim ve bana danıŐmanımdan farklı davranmayan Sayın Prof. Dr. Medine GÜLLÜCE'ye ve Biyoloji Bölüm BaŐkanım Sayın Prof. Dr. ÖkkeŐ ATICI'ya teŐekkürü bir borç bilirim.

ÇalıŐmalarımın farklı aşamalarında yardımlarını gördüğüm, Sayın ArŐ. Gör. Mehmet KARADAYI'ya, Sayın Biyolog Selin HÜNDÜR'e, ekip arkadaşlarıma ve Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü elemanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca akademik kariyer hayatımda destek ve teŐviklerini hiçbir zaman esirgemeyen dedem Mustafa GENÇ'e, anneannem Fatma GENÇ'e, babam Mahmut GENÇ'e, annem Ünzile GENÇ'e, kardeŐim Mustafa Mert GENÇ'e, teyzelerime, eniŐtelerime ve kuzenlerime teşekkür eder saygı ve sevgilerimi sunarım.

Halime GENÇ

Temmuz, 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	6
2.1. Boya ve Boyarmadde Kavramı	6
2.2. Boyarmaddelerin Özellikleri ve Sınıflandırılması	6
2.3. Azo Boyarmaddeler.....	7
2.4. Azo Boyarmaddeler ve Toksikoloji	9
2.5. Mutasyonlar	10
2.5.1. Kromozom mutasyonları	10
2.5.1.a. Kromozom yapı mutasyonları	10
2.5.1.b. Anöploidi.....	13
2.5.1.c. Poliploidi	14
2.5.2. Gen mutasyonları	14
2.6. Gen Mutasyonlarının Sebepleri.....	16
2.6.1. Kimyasal ve fiziksel mutajenler	17
2.6.1.a. Kimyasal mutajenler	18
2.6.1.b. Fiziksel mutajenler	19
2.7. Gen Mutasyonlarının Etkileri	20
2.7.1. Gen mutasyonlarının genomlar üzerine olan etkileri	20
2.7.2. Gen mutasyonlarının mikroorganizmalar üzerine olan etkileri.....	22
2.7.3. Gen mutasyonlarının gelişmiş organizmalar üzerine olan etkileri.....	23
2.8. Mutajenite Araştırmalarında Kullanılan Test Sistemleri.....	24
2.8.1. Sitogenetik yöntemler.....	25
2.8.1.a. Yapısal kromozom bozukluğu testi (CA: Chromosome Aberration).....	25

2.8.1.b. Kardeş kromatid değişimi testi (SCE: Sister Chromatid Exchange).....	25
2.8.1.c. Mikronükleus testi (MN).....	25
2.8.2. Mikrobiyal yöntemler.....	26
2.8.2.a. Maya delesyon testi (Yeast DEL Assay).....	26
2.8.2.b. Ames/ <i>Salmonella</i> test sistemi.....	27
2.8.2.c. <i>Escherichia coli</i> WP2 test sistemi.....	30
2.8.3. PCR (Polymerase Chain Reaction) temelli yöntemler.....	30
2.8.3.a. RAPD (random amplified polymorphic DNA).....	31
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	32
3.1. Materyal.....	32
3.1.1. Çalışmada kullanılan boyarmaddeler.....	32
3.1.2. Çalışmada kullanılan mutant bakteri suşları.....	32
3.1.3. Çalışmada kullanılan bitki tohumu.....	32
3.1.4. Pozitif mutajenler ve kimyasal maddeler.....	32
3.1.5. RAPD-PCR analizinde kullanılan primerler.....	34
3.1.6. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar.....	35
3.1.7. Çözeltiler ve besiyerleri.....	35
3.2. Yöntem.....	43
3.2.1. Mutajenite araştırmalarında kullanılan mutant bakterilerin genetik özelliklerinin kontrolü.....	43
3.2.1.a. Histidin/Biyotin gereksinimi.....	43
3.2.1.b. Triptofan gereksinimi.....	43
3.2.1.c. <i>uvrA</i> ve <i>uvrB</i> mutasyonları.....	44
3.2.1.d. <i>rfa</i> mutasyonu.....	44
3.2.2. Kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının belirlenmesi.....	44
3.2.3. Pozitif mutajenlerin ve test materyallerinin uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	45
3.2.4. Test suşlarının saklanması ve gecelik kültürlerin hazırlanması.....	46
3.2.5. Mutajenite deneyleri.....	47
3.2.6. Sonuçların değerlendirilmesi.....	47
3.2.7. RAPD-PCR yönteminde kullanılan bitki tohumlarının yüzey sterilizasyonu..	48
3.2.8. RAPD-PCR yönteminde kullanılan bitki tohumlarının çimlendirilmesi.....	48

3.2.9. RAPD-PCR yönteminde kullanılan bitki köklerinin DNA izolasyonu.....	49
3.2.10. Bitki köklerinden elde edilen DNA'ların RAPD-PCR Analizleri.....	49
3.2.10.a. RAPD-PCR bileşenleri ve koşulları	49
3.2.10.b. RAPD-PCR analizinde kullanılan primerlerin hazırlanması.....	50
3.2.10.c. RAPD-PCR ürünlerinin görüntülenmesi	50
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	51
4.1. Mutajenite Araştırmalarında Kullanılan Mutant Bakterilerin Genetik Özelliklerinin Kontrolü	51
4.1.1. Histidin/Biyotin gereksinimi	51
4.1.2. Triptofan gereksinimi	51
4.1.3. <i>uvrA</i> ve <i>uvrB</i> mutasyonları.....	52
4.1.4. <i>rfa</i> mutasyonu.....	53
4.2. Kendiliğinden Geri Dönen Koloni Sayılarının Belirlenmesi	53
4.3. Pozitif Mutajenlerin ve Test Materyallerinin Uygulama Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	54
4.4. Boyarmadde Çözeltilerinin Mutajenik Özellikleri	54
4.5. Boyarmaddelerin Çimlenme Üzerine Etkileri	56
4.6. Boyarmaddelerin RAPD profilleri	74
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	81
KAYNAKLAR	86
ÖZGEÇMİŞ	94

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Derece (Sıcaklık)
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre (10 ⁻⁶)
µM	Mikromolar
5-bU	5-Bromourasil
A	Adenin
AB	Amido Black 10B
C	Sitozin
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleotik asit
EB	Evans Blue
EMS	Etil metan sülfonat
g	Gram
G	Guanin
L	Litre
M	Molar
MGA	Minimal glukoz agar
ml	Mililitre (10 ⁻³)
mM	Milimolar
MNNG	<i>N</i> -Metil- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin
NA	Nutrient agar
NaN ₃	Sodyum azid
NB	Nutrient broth
OG	Orange G
RNA	Ribonükleik asit
T	Timin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kromozom yapı mutasyonları çeşitlerinin gösterilmesi	13
Şekil 2.2. Transversiyon ve transisyon tipi baz değişimi mutasyonları.....	15
Şekil 2.3. Replikasyon hataları sonucunda bir gen mutasyonunun ortaya çıkışı.....	16
Şekil 2.4. Mutajen maddelerin DNA molekülü ile etkileşimi sonucunda bir gen mutasyonunun ortaya çıkışı.....	17
Şekil 2.5. 5-Bromourasil maddesinin tautomerik formları arasındaki farklı eşleşme potansiyeli ve baz değişimi nokta mutasyonu oluşturma mekanizması.....	19
Şekil 2.6. Baz değişimi nokta mutasyonlarının genom üzerine olan etkileri.....	21
Şekil 2.7. İnsersiyon/Delesyon tipi gen mutasyonlarının genom üzerine olan etkileri ..	22
Şekil 4.1. <i>S. typhimurium</i> TA1535 ve TA1537 suşlarında üreme için histidin/ biotin gereksiniminin gösterilmesi	51
Şekil 4.2. <i>E. coli</i> WP2 <u>uvrA</u> suşunda üreme için triptofan gereksiniminin gösterilmesi	52
Şekil 4.3. Test suşlarının <i>uvrA</i> ve <i>uvrB</i> mutasyonlarını taşıdıklarının gösterilmesi.....	52
Şekil 4.4. <i>S. typhimurium</i> TA1535 ve TA1537 suşlarında <i>rfa</i> mutasyonunun gösterilmesi	53
Şekil 4.5. AB, OG ve EB boyarmaddelerinin <i>S. typhimurium</i> TA1535 bakteri suşu üzerine olan mutajenik etkileri (Pozitif kontrol: 1 µg/petri NaN ₃ ve Negatif kontrol: 50 µl/petri DMSO).	55
Şekil 4.6. AB, OG ve EB boyarmaddelerinin <i>S. typhimurium</i> TA1537 bakteri suşu üzerine olan mutajenik etkileri (Pozitif kontrol: 1 µg/petri NaN ₃ ve Negatif kontrol: 50 µl/petri DMSO).	55
Şekil 4.7. AB, OG ve EB boyarmaddelerinin <i>E. coli</i> WP2 <u>uvrA</u> bakteri suşu üzerine olan mutajenik etkileri (Pozitif kontrol: 1 µg/petri NaN ₃ ve Negatif kontrol: 50 µl/petri DMSO).	56
Şekil 4.8. Mısır tohumlarının negatif kontrolü (1 günlük).....	56
Şekil 4.9. Mısır tohumlarının pozitif kontrolü 1 (1 günlük)	57
Şekil 4.10. Mısır tohumlarının pozitif kontrolü 2 (1 günlük)	57
Şekil 4.11. OG'ye maruz kalmış mısır tohumları 1 (1 günlük)	58

Şekil 4.12. OG'ye maruz kalmış mısır tohumları 2 (1 günlük).....	58
Şekil 4.13. OG'ye maruz kalmış mısır tohumları 3 (1 günlük)	59
Şekil 4.14. OG'ye maruz kalmış mısır tohumları 4 (1 günlük)	59
Şekil 4.15. OG'ye maruz kalmış mısır tohumları 5 (1 günlük)	60
Şekil 4.16. AB'ye maruz kalmış mısır tohumları 1 (1 günlük)	60
Şekil 4.17. AB'ye maruz kalmış mısır tohumları 2 (1 günlük)	61
Şekil 4.18. AB'ye maruz kalmış mısır tohumları 3 (1 günlük)	61
Şekil 4.19. AB'ye maruz kalmış mısır tohumları 4 (1 günlük)	62
Şekil 4.20. AB'ye maruz kalmış mısır tohumları 5 (1 günlük)	62
Şekil 4.21. EB'ye maruz kalmış mısır tohumları 1 (1 günlük).....	63
Şekil 4.22. EB'ye maruz kalmış mısır tohumları 2 (1 günlük).....	63
Şekil 4.23. EB'ye maruz kalmış mısır tohumları 3 (1 günlük).....	64
Şekil 4.24. EB'ye maruz kalmış mısır tohumları 4 (1 günlük).....	64
Şekil 4.25. EB'ye maruz kalmış mısır tohumları 5 (1 günlük).....	65
Şekil 4.26. Mısır tohumlarının negatif kontrolü (5 günlük).....	65
Şekil 4.27. Mısır tohumlarının pozitif kontrolü 1 (5 günlük)	66
Şekil 4.28. Mısır tohumlarının pozitif kontrolü 2 (5 günlük)	66
Şekil 4.29. OG'ye maruz kalmış mısır tohumları 1 (5 günlük)	67
Şekil 4.30. OG'ye maruz kalmış mısır tohumları 2 (5 günlük).....	67
Şekil 4.31. OG'ye maruz kalmış mısır tohumları 3 (5 günlük)	68
Şekil 4.32. OG'ye maruz kalmış mısır tohumları 4 (5 günlük)	68
Şekil 4.33. OG'ye maruz kalmış mısır tohumları 5 (5 günlük)	69
Şekil 4.34. AB'ye maruz kalmış mısır tohumları 1 (5 günlük)	69
Şekil 4.35. AB'ye maruz kalmış mısır tohumları 2 (5 günlük)	70
Şekil 4.36. AB'ye maruz kalmış mısır tohumları 3 (5 günlük)	70
Şekil 4.37. AB'ye maruz kalmış mısır tohumları 4 (5 günlük)	71
Şekil 4.38. AB'ye maruz kalmış mısır tohumları 5 (5 günlük)	71
Şekil 4.39. EB'ye maruz kalmış mısır tohumları 1 (5 günlük).....	72
Şekil 4.40. EB'ye maruz kalmış mısır tohumları 2 (5 günlük).....	72
Şekil 4.41. EB'ye maruz kalmış mısır tohumları 3 (5 günlük).....	73
Şekil 4.42. EB'ye maruz kalmış mısır tohumları 4 (5 günlük).....	73
Şekil 4.43. EB'ye maruz kalmış mısır tohumları 5 (5 günlük).....	74

Şekil 4.44. AB boyarmaddesinin OPA2 primeri için RAPD görüntüsü.....	74
Şekil 4.45. AB boyarmaddesinin OPA3 primeri için RAPD görüntüsü.....	75
Şekil 4.46. AB boyarmaddesinin OPA6 primeri için RAPD görüntüsü.....	75
Şekil 4.47. AB boyarmaddesinin OPB4 primeri için RAPD görüntüsü.....	76
Şekil 4.48. EB boyarmaddesinin OPA2 primeri için RAPD görüntüsü	76
Şekil 4.49. EB boyarmaddesinin OPA3 primeri için RAPD görüntüsü	77
Şekil 4.50. EB boyarmaddesinin OPA6 primeri için RAPD görüntüsü	77
Şekil 4.51. EB boyarmaddesinin OPB4 primeri için RAPD görüntüsü	78
Şekil 4.52. OG boyarmaddesinin OPA2 primeri için RAPD görüntüsü	78
Şekil 4.53. OG boyarmaddesinin OPA3 primeri için RAPD görüntüsü	79
Şekil 4.54. OG boyarmaddesinin OPA6 primeri için RAPD görüntüsü	79
Şekil 4.55. OG boyarmaddesinin OPB4 primeri için RAPD görüntüsü.....	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Ames/ <i>Salmonella</i> test sisteminde yaygın olarak kullanılan histidin oksotrofu mutant bakterilerin genetiksel özellikleri	29
Çizelge 3.1. RAPD-PCR analizinde kullanılan primerler	34
Çizelge 4.1. Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden geriye dönen koloni sayıları	54

1. GİRİŞ

İnsanoğlu eski çağlardan günümüze kadar çeşitli alanlarda boyarmaddelerini kullanmış, gerek yaşadıkları ortamı, gerek giysilerini, gerekse kullandıkları aletleri renklendirme insanoğlu için önemli bir ihtiyaç ve kültür olmuştur. Renklendirme işlemi için farklı zaman dilimlerinde farklı kaynaklar kullanılmıştır. Renklendirme işlemlerinin ilk kaynağı renkli topraklar olmuştur. M.. bazı uygarlıklarda duvarlara çizilen resimlerin bu renkli topraklarla yapıldığı düşünülmektedir (Koçak 2011). Daha sonra bitkisel ve hayvansal kaynaklı doğal boyarmaddeler elde edilmiştir. Bu doğal boyarmaddeler ilk olarak baharat ve sebze özlerinden elde edilerek milattan 5000 yıl önce Mısır'da sa ve deri, milattan 1500 yıl önce ise Hindistan ve in'de deri boyamak için kullanılmıştır (İzbırak vd 1989; Newsome 1990; ncl 2009). Orta ağda Türkler kök boya bitkisinden (*Rubia tinctorum*) Türk kırmızısı adlı boyarmaddeyi elde ederek başarılı bir Şekilde ipek boyamacılığında kullanmışlardır (ztrk 1999; Dean 2003). 1700'l yıllarda boyarmaddeler gıda ürünlerinde kullanılmaya başlanmıştır. 1800'l yıllarda doğal yollarla elde edilemeyen renklerin eldesi için sentetik boyarmaddelerin üretilmesi için çalışmalar başlatılmıştır (ncl 2009). Sir William Henry Perkins 1856 yılında siyah anilinden ilk sentetik boyarmaddeyi elde etmiştir (Newsome 1990; ncl 2009). Boyarmaddeler günümüzde tekstil, gıda, deri, kozmetik, kâğıt ve matbaa endüstrilerinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Chequer *et al.* 2011; Xu *et al.* 2013). Bu kadar yaygın kullanıma sahip olan boyarmaddelerin doğal olarak sınıflandırılmasına ve kimyasal karakterizasyonunun yapılmasına ihtiyaç duyulmuştur.

Boyarmaddeler temel olarak doğal boyarmaddeler ve sentetik boyarmaddeler olmak üzere ikiye ayrılmaktadırlar. Doğal ve sentetik boyarmaddeler karşılaştırıldıklarında her ikisinde birbirleri üzerine avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Sentetik boyarmaddeler doğal boyarmaddelere göre ısıl işleme daha dayanıklı, renk aralığı daha geniş, renkleri daha parlak, üretimleri daha ucuz ve iyi çözünmektedirler (Demirağ ve Altuğ 1990; ncl 2009). Doğal boyarmaddeler sentetik boyarmaddelere göre daha az toksik ve daha az alerjeniktirler (Ali vd 2007). Ayrıca doğal boyarmaddelerin renklerinde belli bir stabilite olmadığı gözlemlenmiştir. Öyle ki doğal boyarmaddelerin,

üretildiği bitki türü, bitkinin yetiştiği coğrafik alan ve mevsimsel değişikliklere göre farklı tonda renkler oluşturduğu bulunmuştur (Öncül 2009).

Ancak gerek doğal gerekse sentetik boyarmaddelerin insan sağlığına olan etkileri tam olarak belirlenmemiştir. Özellikle gıda ve tekstil boyarmaddeleri üzerine yapılan çalışmalar son zamanlarda artmış olsa da insan hayatını doğrudan etkileyen birçok boyarmaddenin etkileri yeterince araştırılmamıştır. Bu belirsizlik kullanımı sınırlandırmakta veya yanlış kullanıma yol açabilmektedir (Khera and Munro 1979; Ha *et al.* 2013). Geçmişten günümüze kullandığımız bazı boyarmaddelerin insan sağlığına mutajenik ve genotoksik etkilerinin olduğu bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar bazı kimyasal gruplara sahip boyarmaddelerin insan sağlığı üzerine olumsuz etkiler yaptığını göstermiştir. Birçok alanda kullanılan bu boyarmaddeler arasında azo grubu (-N=N-) içerenler büyük önem taşımaktadır (Toker 2005; Ertem 2007).

Dünya çapında her yıl 800 bin tondan fazla boyarmadde üretilmektedir. Bunların %60-80 ini azo boyarmaddeler oluşturmaktadır (Combes and Haveland-Smith 1982; Chequer *et al.* 2011). 1990'lı yıllarda en az 3000 azo boyarmaddesi deri, tekstil, kâğıt, matbaa, gıda ve kozmetik endüstrileri tarafından ürün üretiminde renk sağlamak amacıyla kullanılmıştır (Nam and Renganathan 2000; Moutaouakkil *et al.* 2003; Mansour *et al.* 2007; Chequer *et al.* 2011).

Azo boyarmaddeleri genel olarak tekstil endüstrisinde kullanılmasına rağmen biyolojik çalışmalarda da kullanımları yüksek oranlardadır (Toker 2005). Biyolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılan azo boyarmaddelere bordo kırmızısı, brillant sarısı -S, krisoidin -Y, fast sarısı, janus yeşili -B, metil oranj, metil kırmızısı, oranj -II, Sudan -R, Sudan -II, kongo kırmızısı, orange g, amido black 10B, evans blue örnek verilebilir (Sabnis 2010). Laboratuvar çalışanları biyolojik çalışmalarda kullanılan ve toksik etkileri bilinmeyen bu boyarmaddelerle doğrudan etkileşim içinde bulunmaktadır.

Azo boyarmaddelerin sentezinde aromatik amin olarak genellikle anilin kullanılmaktadır (Toker 2005). Anilin etkisini ağız, solunum veya deri temasıyla

göstermekte ve insanlar için önemli bir protein olan hemoglobinin aktivitesini baskılamaktadır. Anilinin insanlar üzerine etkilerinin araştırılması eksik kalmış, fakat hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar anilinin dalak kanserine neden olduğunu ortaya koymuştur. Toksik Maddeler ve Hastalık Kayıt Ajansı (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR)) ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (The International Agency for Research on Cancer (IARC))'na göre anilin kanserojen bir madde olarak kabul edilmemektedir. Çevre Koruma Ajansı (Environmental Protection Agency (EPA))'na göre ise kanserojen olması muhtemel maddeler arasındadır.

Bazı azo boyarmaddelerin yapısına naftalen ve türevleri de katılmaktadır. Bu maddelerin insanlar üzerinde kanserojen etki gösterdiğine dair bir kanıt bulunmamaktadır. Ancak naftalene maruz kalmış hayvanlarda akciğer ve burun kanserlerinin geliştiği görülmüştür. Bazı dişi farelere günlük belli zaman dilimlerinde naftalen buharı koklatılmış ve bunun sonucunda farelerde akciğer kanserinin geliştiği görülmüştür. Bir diğer çalışmada ise erkek ve dişi ratlara aynı şekilde naftalen uygulandığında burun kanserinin geliştiği görülmüştür. Hayvan çalışmalarının sonuçlarına dayanarak Sağlık ve İnsan Hizmetleri Bölümü (Department of Health and Human Services (DHHS)), EPA ve IARC naftalenin insanlar için muhtemel kanserojen madde olduğunu düşünmektedir.

Azo boyarmaddelerin yapısına katılan bir diğer madde de fenoldür. Ağız ya da solunum yoluyla vücuda alınan fenolün çoğu kan dolaşımına katılmaktadır. Eğer deri yoluyla vücuda alınırsa kan dolaşımına girme miktarı daha az olmaktadır. Kısa süre havadaki fenole maruz kalmak solunum organlarının tahrişine, baş ağrısı ve göz yanmasına neden olmaktadır. Yüksek dozda fenolün cilt ile temas etmesi durumunda ise karaciğer hasarı, cilt yanması, koyu renkte idrar, düzensiz kalp atışı ve bazen ölümler gözlenebilmektedir. Fenolün yüksek konsantrasyonda ağız yoluyla vücuda alınması iç yanmalara ve ölüme neden olmaktadır.

Azo boyarmaddelerde kullanılan diazo tuzlarının kanserojen olma olasılığı vardır. Bunlara nitrobenzen, benzidin, toluidin, diaminodifenilüre gibi maddeler örnek verilebilir (Toker 2005).

Ayrıca ülkemizde de T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü tarafından 29.12.1994 tarihinde kansere sebep olmasından dolayı deri ve tekstil ürünlerinde kullanılan bazı azo boyarmaddelerin ve azo boyarmaddelerin içerisine katılan aril aminlerin listesini barındıran bir genelge yayımlanmıştır. Tüm bu veriler göz önüne alındığında, günümüzde kullanımda olan azo boyaların toplum sağlığı üzerine olan etkilerinin araştırılmasının başta kanser olmak üzere birçok hastalıktan korunmada en önemli stratejilerden biri olacağı açıktır.

Bu amaçla yapılan karsinojenlerin taranması amaçlı çalışmalar için mutajenite esas alınmaktadır. Genetik kodun ve genetik sistemin evrensel olması ve karsinojenite ile mutajenite arasındaki korelasyonun yüksek olması bunun en önemli sebepleridir (Akın 1990).

Mutajenite test sistemleri sonuçlarının gözlenebilme zamanına bağlı olarak kısa ve uzun zamanlı sistemler olmak üzere ikiye ayrılır (Wickramasnghe 1979; Mortelmans and Zeiger 2000; Zeiger *et al.* 2005). Çeşitli deney hayvanlarıyla yapılan *in vivo* uzun zamanlı mutajenite test sistemleri kısa zamanlı mutajenite test sistemlerine göre daha güvenilir sonuçlar sunmaktadır. Fakat birçok sentetik ve doğal kimyasalların kontrollerinde yüksek maliyet ve uzun zaman gerektirdiği için tercih edilmemektedirler (Wickramasnghe 1979; Gulluce *et al.* 2010). Uzun zamanlı test sistemlerinin dezavantajlarına sahip olmayan kısa zamanlı test sistemleri öncü testler için daha uygun ve kabul edilebilir olmalarıyla öne çıkmaktadır (Mortelmans and Zeiger 2000).

Bakteriyel testler (Ames *et al.* 1973a, 1973b; Maron and Ames 1983; Mortelmans and Riccio 2000; Mortelmans and Zeiger 2000), mikronükleus ve bitki tohumları ile yapılan RAPD analizleri, hücre kültürü çalışmaları en yaygın kullanılan kısa zamanlı testlere örnek olarak verilebilir (Özbek 2006; Karadayı 2010).

Yapılan bu çalışmada; azo boyarmaddelerin yukarıda sayılan potansiyel mutajenik özellikleri göz önüne alınarak, biyolojik çalışmalarda kullanılan Amido Black 10B, Orange G ve Evans Blue azo boyarmaddelerinin genotoksik özelliklerinin *E. coli* WP2uvrA suşuyla yapılan *E. coli* WP2, *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 mutant bakteri suşlarıyla yapılan Ames/*Salmonella* ve RAPD analizleri kullanılarak araştırılması hedeflenmiştir. Ayrıca bu çalışma; Amido Black 10B, Orange G ve Evans Blue boyarmaddelerinin Ames/*Salmonella*, *E. coli* WP2 ve RAPD analizleri ile yapılan ilk genotoksisite çalışması özelliğini taşıması ve doğrudan araştırmacıları ilgilendiren laboratuvarlarda kullanılan boyarmaddeler ile ilgili ilk çalışmalardan olma özelliğini taşıması yönleri ile özgün değer taşımaktadır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Boya ve Boyarmadde Kavramı

Konuşma dilinde çoğu kez boya ve boyarmadde kelimeleri birbiri yerine kullanılır. Bu iki sözcük eşanlamlı değildir. Cisimlerin yüzeyinin ya dış tesirlerden korunması ya da güzel bir görünüm sağlanması için renkli hale getirilmesinde kullanılan maddelere boya denir. Boya bir yüzeye kuruyan yağ ile birlikte fırça veya boyama tabancaları ile uygulanır. Boyanan yüzey, yağın kurumması ile oldukça kalın yeni bir tabaka ile kaplanır. Bu işlem gerçekte bir boyama değil bir örtmedir. Boyalar uygulandıkları yüzeyde hiçbir değişiklik yapmazlar ve kazınarak yüzeyden büyük parçalar halinde uzaklaştırılabilirler. Boyalar genellikle anorganik yapıdadırlar. Boyarmadde ise bir materyale kendiliğinden veya uygun reaksiyon maddeleriyle afinitesi olan, renk verici maddelerdir. Boyarmaddelerle yapılan renklendirme boyalarla yapılan renklendirme işlemine benzemez. Genellikle çözeltiler veya süspansiyonlar halinde çeşitli boyama yöntemleriyle uygulanırlar. Boyar maddelerin tamamı organik yapıdadır. Boyar maddeler uygulandıkları cisimlerin yüzey karakterini değiştirirler. Bu yüzden kazınarak ya da herhangi bir fiziksel işlem yapılarak cisimden uzaklaştırılmazlar (Koçak 2011).

2.2. Boyarmaddelerin Özellikleri ve Sınıflandırılması

Birçok organik maddeden farklı olarak boyarmaddeler renk sahibidirler. Bu özelliklerinden dolayı boyarmaddeler;

- 1) Görülebilir spektrumdaki (400-700 nm) ışığı absorblar,
- 2) En az bir kromofora sahiptir,
- 3) Bağlayıcı bir sisteme sahiptir,
- 4) Organik bileşiklerde stabilizasyonu sağlayan elektron rezonansına sahiptir (Abrahart 1977).

Moleküler yapıdaki bu özelliklerin herhangi biri eksilirse renkte azalma görülebilmektedir. Boyarmaddeler organik bileşikler olup benzen, naftalen ve antrasin halkaları ile birleşmiş kromofor ve okzokrom gruplarını içerirler. Kromofor grubu boyarmaddelere renk özelliği verir. Ancak bu grubu içeren boyarmaddelerin uygulanacağı cisme bağlanma yeteneği yoktur. Bu yüzden renk mekanik yollarla kolayca giderilebilir. Tam bir boyarmadde özelliği gösterebilmesi için okzokrom grubuna ihtiyaç duyulur. Okzokrom grubu boyarmaddelerin absorpsiyonunu, bağlanma gücünü artırır ve çözünürlüğünü etkiler (Velmurugan *et al.* 2011; Hassan 2014).

Kromofor grubunun kimyasal yapısına dayanarak boyarmaddeler azo, antrakininon, trifenilmetan, heterosiklik ve polimerik olmak üzere 5'e ayrılırlar (Yang *et al.* 2009; Khan *et al.* 2013). Ayrıca boyarmaddeler uygulama özelliklerine göre anyonik, katyonik, doğrudan, dispers ve reaktif olmak üzere 5 sınıfta incelenebilirler. Kimyasal yapısına göre sınıflandırmada en geniş yer tutan boyarmaddeler azo boyarmaddeleriye göre uygulama yöntemlerine göre sınıflandırmada dispers ve reaktif boyarmaddeleridir (Ertem 2007).

2.3. Azo Boyarmaddeler

Azo boyarmaddeleri diazonyum tuzlarının fenoller, naftoller ve aromatik aminler ile birleşmesi sonucunda oluşurlar (Toker 2005; Ertem 2007). Organik kökenli boyarmaddelerin en önemli bölümünü oluşturan ve sayı bakımından diğer gruplardaki boyarmaddelerin toplamından fazla olan azo boyarmaddeler tekstil, gıda, deri, kâğıt, matbaa ve kozmetik endüstrilerinde kullanılmaktadırlar (Ahmad and Hameed 2010; Chequer *et al.* 2011). Azo boyarmaddelerinin oldukça yaygın kullanılmasının beş önemli nedeni bulunmaktadır:

- 1) Sentezlerinin kolay oluşu ve ucuz başlangıç bileşenlerinden elde edilebilmeleri maliyetlerinin ucuz olmasını sağlaması
- 2) Molekül üzerinde çeşitli grupların kolay modifiye edilebilmesi farklı azo boyarmaddelerin sentezine imkan oluşturması

- 3) Molar absorpsiyon katsayılarının yüksek olması
- 4) Başta ışık ve yıkama spesifikliğı olmak üzere iyi değerlere sahip olması
- 5) Geniş renk aralığı sunması (Ertan ve Eyduran 1995; Saylam 2006; Ertem 2007).

Evans Blue: Biyoloji laboratuvarlarında kullanılan evans blue yapısında suramin ve tripan blue bulunan polisulfon bir boyar maddedir.(Skowronek *et al.* 2000; Sharma *et al.* 2004) Kan damarı ve hücre zarı geçirgenliğı çalışmalarında sıklıkla kullanılır. İntravital boya olarak da yönetilebilir ve taşıyıcı molekülü olarak serum albümine bağlanır. Evans blue-albumin kaynaşması;

- 1) Dokuda mavi renk ile dikkat çekerek makroskobik olarak tanımlanabilir (Matsuda *et al.* 1995).
- 2) Floresans mikroskopuyla incelenmiş doku bölümlerinde kırmızı oto floresans ile gözlemlenebilir (Matsuda *et al.* 1995; Brussee *et al.* 1997; Tidball *et al.* 1999).
- 3) Serum örnekleri veya homojenize olmuş doku spektrofotometre ile ölçülebilir (Brown *et al.* 1992; Oztas *et al.* 1992; Hamer *et al.* 2007).

Evans blue aynı zamanda HIV girişinin ve HIV'in reseptörlerine bağlanan TNF- α nın bir inhibitörü olarak görev yaparak moleküler çalışmalarda da adından bahsettirmektedir. (Sharma *et al.* 2004)

Orange G: Biyolojik çalışmalarda kullanılan bir diğ er boyar madde Orange G dir. Çoğunlukla sitolojik çalışmalarda kullanılmakla birlikte moleküler çalışmalarda da kullanılmaktadır. Orange g boyar maddesi Papanikolaou testinde (hücre yayma testi) eozin boyasıyla birlikte kullanılmaktadır. Bu test özellikle servik kanserinin erken teşhisi için önem taşımaktadır. Orange G aynı zamanda elektroforezde DNA yükleme tamponu olarak da kullanılmaktadır. (Yüzbaşıoğlu 2008; Sabnis 2010)

Amido Black 10B: Biyolojik çalışmalarda kullanılan bir boya olan amido black 10b proteinlerin boyanmasında Comassie blue ile aynı işlevi görür. (Sabnis 2010).

2.4. Azo Boyarmaddeler ve Toksikoloji

Dünyada yılda 7×10^5 ton ve 100.000'in üzerinde çeşit boyarmadde üretilmektedir (Aksu 2005). Bunların yarısından fazlasını azo boyarmaddeler oluşturmaktadır (Soares *et al.* 2002; Ahmad and Hameed 2010; Chequer *et al.* 2011). Hemen hemen bütün endüstriler tarafından kullanılan bu boyarmaddelerin toplam miktarının %10-15'inin üretim sürecinde çevreye yayıldığı, ekosistem, sucul yaşam, insan hayatı, mikroorganizmalar ve gıda zinciri üzerinde karsinojenik, mutajenik ve teratojenik etkilerinin olduğu tespit edilmiştir (Nam and Renganathan 2000; Moutaouakkil *et al.* 2003; Pokhrel and Viraraghavan 2004; Crini 2006; Mansour *et al.* 2007; Chequer *et al.* 2011; Constantin *et al.* 2013; Konicki *et al.* 2013).

Boyarmaddelerin ter, tükürük ve mide sıvısı ile ilişki kurduğunda aromatik amin oluşturup oluşturmaması insan sağlığı üzerine olumsuz etkilerinin araştırılmasında kolaylık sağlayan kriterlerden biridir (Pielesz 1999; Pielesz *et al.* 2002; Chequer *et al.* 2011). Çünkü aromatik aminler en iyi bilinen genotoksinlerdir. Genellikle N-oksidasyon içeren ve hidroksilamin ve nitronyum iyonlarının oluşumuna yol açan enzim aktivasyonları aromatik aminlerin yüksek mutajen olmasını sağlar. Metabolik aktivasyonun yanında fotokimyasal oksidasyon da aromatik aminleri genotoksinlere çeviren ek bir mekanizma olarak literatürlere yerleşmiştir. Işığın emilimi reaktif oksijen türleri gibi direkt harekete geçen nitro ve nitroso foto ürünlerin stabilitesini bozabilmektedir (Guerard 2012). Ekosistemi ve insan sağlığını tehdit eden benzidin ve 4-bifenilamin gibi fenilaminleri aromatik aminlere örnek olarak verilebilir (Choudhary 1996; Chung *et al.* 2000; Chequer *et al.* 2011).

Azo boyar maddeleri ağız yoluyla alındıktan sonra anaerobik barsak florası ve barsak duvarında veya karaciğer duvarında bulunan memeli azo redüktazlar tarafından serbest aromatik aminlere indirgenebilmektedirler (Umbuzeiro *et al.* 2005; Chequer *et al.* 2011). Böyle bir transformasyon rhesus maymunlarını ve insanları içeren memeli gruplarının büyük çoğunluğunda meydana gelebilmektedir (Prival and Mitchell 1982). Azo boyarmaddelerin aktivasyonu nitro ve azo redüksiyonlarını içermektedir

(Umbuzeiro *et al.* 2005). Bu yüzden bu aktivasyon sürecinde barsak florası önemli rol oynamaktadır (Lima *et al.* 2007).

2.5. Mutasyonlar

Mutasyonlar genetik bilgide meydana gelen kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanırlar. Bu terim ilk olarak Hugo de Vries tarafından 1905 yılında kullanılmıştır (Barış 2007; Öner vd 2009; Karadayı 2010). Mutasyonlar evrimin hammaddesi ve bütün genetik varyasyonların kaynağıdır (Greenman *et al.* 2006). Mutasyonların olmaması organizmaların değişen ortam şartlarına uyum sağlamasını engeller ve nesillerinin tükenmesine yol açabilir. Diğer taraftan mutasyonlar birçok insan hastalığı ve bozukluklarına neden olan zararlı etkilere sahiptirler. Özellikle kanser hastalıklarının ortaya çıkması ve gelişmesinde önemli faktörlerden biri olarak mutasyonlar büyük dikkat çekmektedir (Pierce 2010; Sun *et al.* 2012). Etkilerinin araştırılması sırasında sınıflandırma kolaylığı sağlamak için mutasyonlar kromozom mutasyonları ve gen mutasyonları olmak üzere 2 ana başlığa ayrılmıştır (Oraler 1990; Karadayı 2010).

2.5.1.Kromozom mutasyonları

Kromozom mutasyonları; kromozom yapılarında meydana gelen kromozom yapı mutasyonları, kromozomların sayısına bir ya da daha fazla kromozom eklenmesine veya çıkarılmasına neden olan anaploidi ve kromozomlara bir ya da daha fazla takımlar halinde kromozomların eklenmesine neden olan poliploidi olmak üzere 3 ana gruba ayrılırlar (Pierce 2010).

2.5.1.a. Kromozom yapı mutasyonları

Kromozom yapı mutasyonları tek bir kromozomun yapısında meydana gelen mutasyonlardır. Bu mutasyonların duplikasyon, delesyon, inversiyon ve translokasyon olmak üzere 4 başlık altında incelenmektedir (Barış 2007; Karadayı 2010; Pierce 2010).

Duplikasyonlar

Duplikasyonlar, kromozomun bir kısmının kendini iki ya da daha fazla katına çıkarmasıyla oluşan mutasyonlardır (Şekil 2.1). Duplike olmuş bölge orijinlendiği parçanın hemen bitişiğinde ise buna tandem duplikasyon, orijinlendiği kısımla aynı kromozom üzerinde farklı bölgede ya da farklı kromozom üzerinde ise yeri değişmiş duplikasyon adı verilir. Aynı zamanda bir kromozom parçası kendini çoğaltıp 180° dönerek kromozoma yapıştırsa bu duplikasyon çeşidine de reverse duplikasyon adı verilir. Bu mutasyon sonucunda genomda parça çoğalması görülür. Mayoz bölünmede meydana gelen Crossing-over olayında meydana gelen aksaklıklara duplikasyonların neden olduğu bilinmektedir (Mumcu 2005; Öztaş 2005; Yüksel 2005; Barış 2007; Öner vd 2009; Karadayı 2010; Pierce 2010).

Delesyonlar

Delesyonlar bir kromozom segmentinin kaybolmasına neden olan mutasyonlardır (Şekil 2.1). Bu mutasyonlar genotipik düzeyde etki gösterdiği gibi fenotipik düzeyde de önemli etkilere sahiptirler. Delesyonun fenotipik sonuçları kromozomun silinmiş bölgesindeki genlere bağlıdır. Eğer silinmiş bölge sentromer içeriyorsa mayoz ve mitoz bölünmeye uğrayamayacaktır ve kopan parçanın bulunduğu kromozom ortadan kaybolacaktır. Homozigot durumdaki kromozomlarda meydana gelen delesyonlar ise çoğunlukla letaldir. Çünkü silinmiş bölgede bulunan esas genlerin bütün kopyaları kaybedilmiştir. Bu mutasyon sonucunda duplikasyonların aksine genomda parça azalması görülür (Dilek 2004; Korkmaz 2005; Pierce 2010; Karadayı 2010).

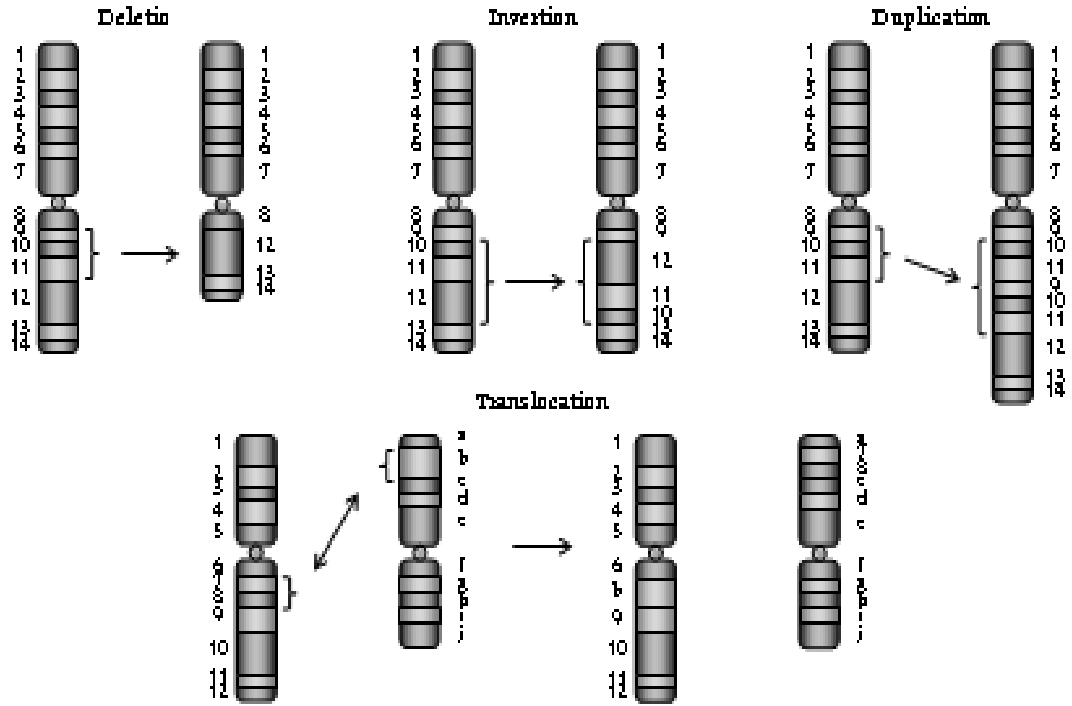
İnversiyonlar

İnversiyonlar bir kromozom segmentinin 180° dönerek tekrar koştığı yere bağlandığı mutasyonlardır (Şekil 2.1). Bir kromozomun orijinal yapısına AB•CDEFG denilirse AB•CFEDG şeklinde oluşan kromozom inversiyona uğramıştır denilir. İnversiyonlar sentromer bölgelerinde meydana geliyorsa perisentrik inversiyonlar (ADC•BEFG),

sentromer bölgelerinde meydana gelmiyorsa parasentrik inversiyonlar (AB•CFEDG) adını alırlar. Bu mutasyon sonucunda kromozomlarda herhangi bir parça kaybı ya da kazanımı olmadığı halde gen dizilişlerinde farklılıklar meydana gelmiştir. Bu yüzden bu mutasyonlara sahip bireylerde fenotipik etkiler belirgindir. Ayrıca yakın türler arasında melezleme yapıldığında görülen anormal sinapsis oluşumlarının bu mutasyonlar sonucu oluştuğu düşünülmektedir (Dilek 2004; Korkmaz 2005; Mumcu 2005; Öztaş 2005; Yüksel 2005; Barış 2007; Öner vd 2009; Karadayı 2010; Pierce 2010).

Translokasyonlar

Translokasyonlar homolog olmayan kromozomlar arasındaki segment değişimleriyle oluşan mutasyonlardır (Şekil 2.1). Translokasyon olayı homolog kromozomlar arasında parça değişimi olan Crossing-over olayı ile karıştırılmamalıdır. Homolog olmayan kromozomlar arasında bir kromozomdan diğerine parça aktarımı varsa bu olaya nonreciprocal translokasyon denilir. AB•CDEFG ve MN•OPQRS homolog olmayan iki kromozom olarak düşünüldüğünde EF segmentinin diğer kromozoma yerleşmesiyle AB•CDG ve MN•OPEFQRS kromozomları oluşur ve bu nonreciprocal translokasyonun bir örneğidir. Homolog olmayan kromozomlar arasında karşılıklı parça aktarımına ise reciprocal translokasyon adı verilmektedir. AB•CDEFG ve MN•OPQRS homolog olmayan kromozomlar olarak düşünülürse EF ve QR parçalarının birbiriyle yer değiştirmesi(AB•CDQRG ve MN•OPEFS) reciprocal translokasyonun bir örneğidir. Translokasyonlar yeni gen oluşumlarına sebep olduğu için evrimsel açıdan büyük bir öneme sahiptir (Dayıoğlu ve Doğru 1997; Kuru ve Gözükara 2001; Sağsöz vd 2001; Dilek 2004; Korkmaz 2005; Mumcu 2005; Öztaş 2005; Yüksel 2005; Barış 2007; Öner vd 2009; Karadayı 2010; Pierce 2010).



Şekil 2.1. Kromozom yapı mutasyonları çeşitlerinin gösterilmesi (Karadayı *et al.* 2012)

2.5.1.b. Anöploidi

Kromozom yapısı mutasyonlarına ek olarak bu mutasyonlar kromozomların sayılarında değişikliğe yol açarlar. Anöploidi birkaç yolla meydana gelebilir. a) Sentromer bölgelerinin delesyona uğraması, b) Mayoz ve mitoz bölünmede homolog kromozomlar veya kardeş kromatidler arasında ayrılmama durumu bu mutasyona sebep olabilir. Anöploidi mutasyonlarının nullisomi, monosomi, trisomi, tetrasomi olmak üzere 4 çeşidi vardır (Dayıoğlu ve Doğru 1997; Kuru ve Gözükara 2001; Sağsöz vd 2001; Dilek 2004; Korkmaz 2005; Mumcu 2005; Öztaş 2005; Yüksel 2005; Barış 2007; Öner vd 2009; Karadayı 2010; Pierce 2010).

Nullisomi ($2n-2$) bir homolog kromozom çiftinin kaybolmasıyla oluşan mutasyonlardır. Nullisomi bir insanda meydana geldiğinde normalde 46 olan kromozom sayısı 44'e düşer (Pierce 2010).

Monosomi ($2n-1$) tek bir kromozomun kaybolmasıyla oluşan mutasyonlardır. Monosomi bir insanda meydana geldiğinde normalde 46 olan kromozom sayısı 45'e düşer (Pierce 2010).

Trisomi ($2n+1$) tek bir kromozomun kazanılmasıyla oluşan mutasyonlardır. Trisomi bir insanda meydana geldiğinde normalde 46 olan kromozom sayısı 47'e çıkar (Pierce 2010).

Tetrasomi ($2n+2$) bir homolog kromozom çiftinin kazanılmasıyla oluşan mutasyonlardır. Tetrasomi bir insanda meydana geldiğinde normalde 46 olan kromozom sayısı 48'e çıkar (Pierce 2010).

2.5.1.c. Poliploidi

Kromozom takımlarının mayoz veya mitoz bölünmede ayrılmalarında sorun olduğunda meydana gelen mutasyonlardır. Poliploidi otopoliploidi ve allopoliploidi olmak üzere 2 gruba ayrılır (Pierce 2010).

Otopoliploidi bütün kromozom takımları tek bir türden kaynaklanmaktadır. Allopoliploidi ise iki veya daha fazla türün hibridizasyonu sonucunda meydana gelmektedir (Pierce 2010).

2.5.2. Gen mutasyonları

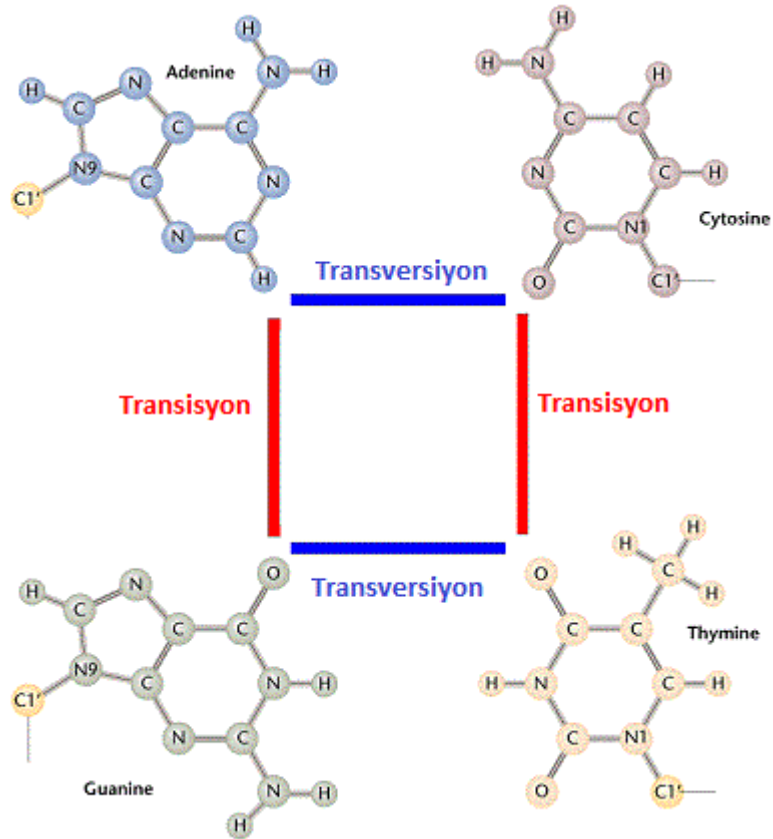
Gen mutasyonları genetik materyal üzerinde bir ya da birkaç bazı etkileyen mutasyonlardır. Gen mutasyonları baz değişimi, insersiyon ve delesyonlar olmak üzere üç gruba ayrılırlar.

DNA'da tek bir baz değişimiyle kendini gösteren baz değişimi mutasyonları gen mutasyonlarının en basit grubudur. Çift zincirden oluşan DNA'nın tamamlayıcı

özelliğinden dolayı DNA üzerinde bir baz değiştiğinde karşı zincirde tamamlayıcısı olan baz da değişecektir. Böylece DNA'nın her iki zincirinde de mutasyonlu genom replike olacaktır (Şekil 2.3.). Baz değişimi mutasyonları kendi arasında bir pürin bazıyla bir pirimidin bazı veya bir pirimidin bazı ile bir pürin bazının yer değiştirmesiyle oluşan transversiyon ve bir pirimidin bazıyla bir pirimidin veya bir pürin bazıyla bir pürin bazının yer değiştirmesiyle oluşan transisyon olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar (Şekil 2.2).

İnsersiyonlar genetik materyalin yapısına bir ya da daha fazla bazın eklenmesiyle oluşan mutasyonlardır.

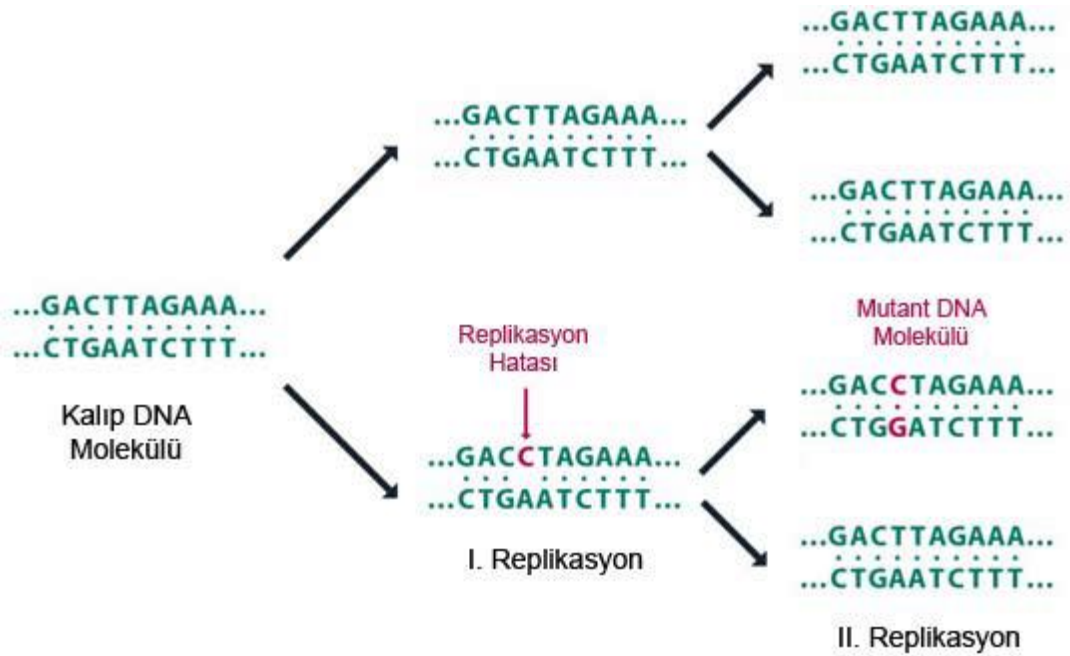
Delesyonlar genetik materyalin yapısından bir ya da daha fazla bazın çıkmasıyla oluşan mutasyonlardır.



Şekil 2.2. Transversiyon ve transisyon tipi baz değişimi mutasyonları

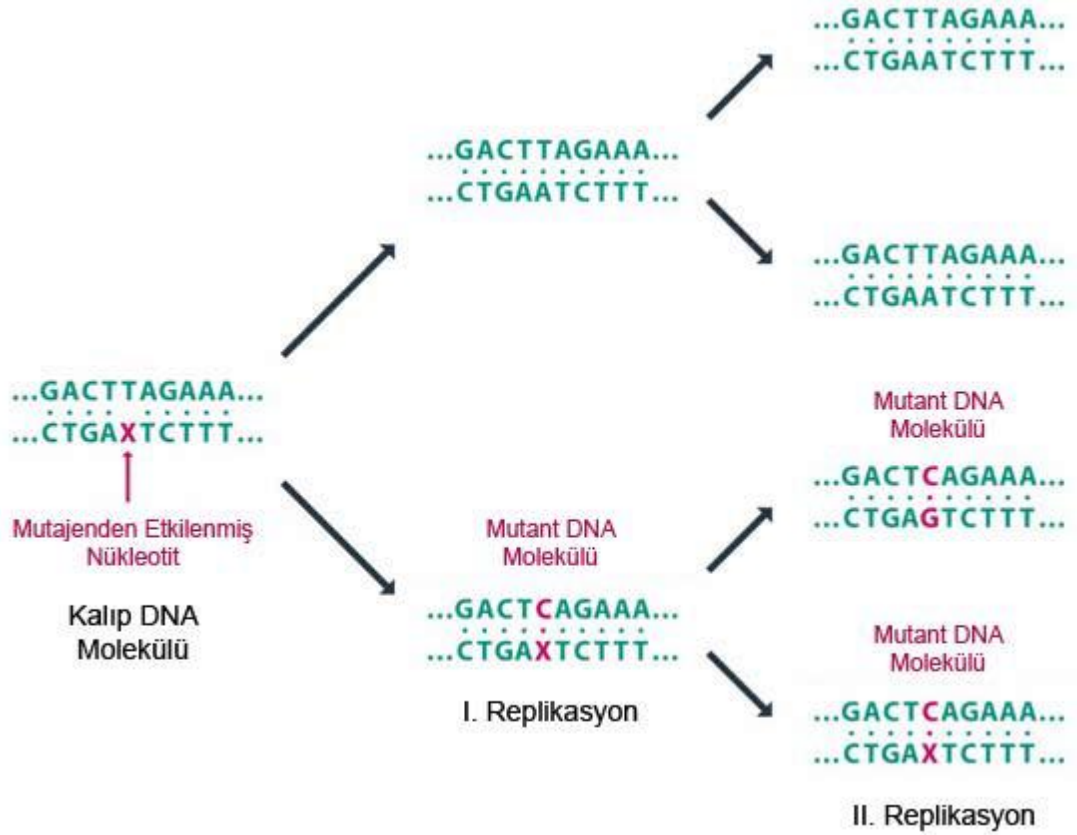
2.6. Gen Mutasyonlarının Sebepleri

Gen mutasyonlarının meydana gelmesinde iki önemli mekanizma göze çarpmaktadır. Bunlardan ilki DNA replikasyonu sırasında kendiliğinden meydana gelen hatalardır. DNA'da bu hataların olduğu zincir bu hatayı kendi komplementerine taşıyarak genomda farklılıklar meydana getirir (Şekil 2.3.) (Kuru ve Gözükara 2001; Bahçeci 2007; Brown 2007; Öner vd 2009; Karadayı 2010).



Şekil 2.3. Replikasyon hataları sonucunda bir gen mutasyonunun ortaya çıkışı (Brown 2007; Karadayı 2010)

Mutasyonların meydana gelmesindeki ikinci önemli mekanizma ise fiziksel ve kimyasal kaynaklı mutajenlerin DNA ile etkileşime geçmesidir. Mutajenlerden kaynaklanan mutasyonlar çoğunlukla DNA'nın tek zincirinde kendisini gösterir (Şekil 2.4). Bu mutasyonlar DNA onarım mekanizması tarafından tamir edilmediği takdirde replikasyon döngüleri sonucunda her iki zincirde de kendilerini gösterirler (Kuru ve Gözükara 2001; Bahçeci 2007; Brown 2007; Öner vd 2009; Karadayı 2010).



Şekil 2.4. Mutajen maddelerin DNA molekülü ile etkileşimi sonucunda bir gen mutasyonunun ortaya çıkışı (Brown 2007)

2.6.1. Kimyasal ve fiziksel mutajenler

Mutajenler DNA veya RNA gibi hücrel bilgi ve yönetim zincirlerinin moleküler yapısını değiştirerek söz konusu organizmanın doğal olarak beklenen seviyenin çok üzerinde mutasyona uğramasına sebep olan fiziksel veya kimyasal etmenler olarak tanımlanırlar. Bu tanım mutajenler ve DNA'da hasara yol açan diğer ajanlar arasındaki farklılığı açık bir şekilde vurgulamaktadır. DNA'da hasara neden olan ajanlar DNA zincirlerinde mutasyon yerine kırıklar oluşturarak hücrelerin ölümüne neden olurlar (Brown 2007; Karadayı 2010; Pierce 2010).

Mutajenler üç farklı şekilde mutasyon oluşturma yeteneğine sahiptirler (Brown 2007):

- 1) DNA ile doğrudan etkileşime geçerek replikasyonda hatalar oluştururlar.
- 2) Hücrede mutasyona yol açan maddelerin salgılanmasını uyararak indirekt etki gösterirler.
- 3) Baz analogları gibi davranarak replikasyon sırasında hatalara neden olurlar.

2.6.1.a. Kimyasal mutajenler

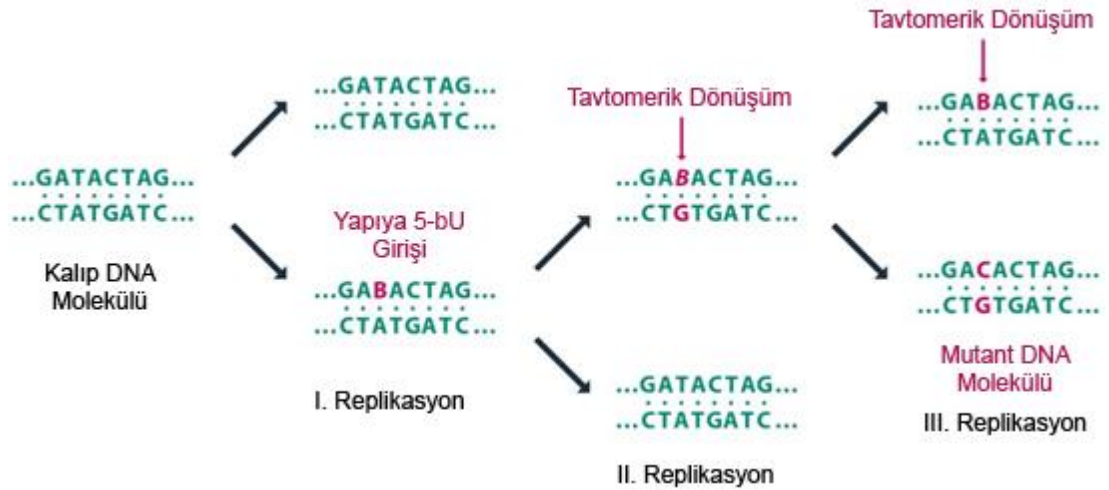
İnterkalasyon ajanları: İnterkalasyon ajanları DNA'da iki bazın arasına girerek, DNA heliksinin üç boyutlu yapısını bozarak ve replikasyon sırasında insersiyon ve delesyon tipi mutasyonlara yol açarak etkilerini göstermektedirler. Bu tip kimyasal mutajenlere örnek olarak etidyum bromid, akridin orange, proflavin ve dioksin örnek verilebilir (Özbek 2006; Bahçeci 2007; Brown 2007; Öner vd 2009; Karadayı 2010; Pierce 2010).

Alkilleyici ajanlar: Alkilleyici ajanlar alkil grubunu bağlama özelliğine sahip olan mutajenlerdir. Bu ajanlar bazlara kendi yapılarında bulunan etil ve metil gruplarını bağlayıp farklı bazlarla eşleşme yapmalarını sağlayarak etkilerini göstermektedirler. Örneğin; Etil metan sülfonat guanine bir etil grubu bağlayıp 6-etilguanini oluşturularak timin ile bağ yapmasını sağlayarak mutasyona yol açmaktadır (Özbek 2006; Bahçeci 2007; Brown 2007; Öner vd 2009; Karadayı 2010; Pierce 2010).

Baz analogları: Baz analogları DNA'nın yapısına katılan bazlarla benzer yapıda olan kimyasal mutajenlerdir. DNA polimeraz bu kimyasalları bazlardan ayırt edemediği için replikasyon sırasında yeni sentezlenmiş DNA molekülleri oluşturabilirler. 5-bromourasil en iyi bilinen baz analogudur ve timinle benzer özelliktedirler (Şekil 2.5). Ancak bu mutajen DNA yapısına katıldığında adenin yerine guanin ile eşleşerek mutasyona yol açmaktadır (Kuru ve Gözükara 2001; Özbek 2006; Bahçeci 2007; Brown 2007; Öner vd 2009; Karadayı 2010; Pierce 2010).

Deaminasyon ajanları: Deaminasyon ajanları DNA'daki bazları deaminasyona uğratarak farklı bazlarla eşleşmelerini sağlayan mutajenlerdir. Bu durum DNA molekülünde spontan olarak da meydana gelebilmektedir. Örneğin; adeninin

deaminasyonu sonucu oluşan hipoksantin timin ile eşleşeceğine sitozin ile eşleşerek DNA molekülünde mutasyon meydana getirir (Özbek 2006; Bahçeci 2007; Brown 2007; Öner vd 2009; Karadayı 2010; Pierce 2010).



Şekil 2.5. 5-Bromourasil maddesinin tavtomerik formları arasındaki farklı eşleşme potansiyeli ve baz değişimi nokta mutasyonu oluşturma mekanizması (Brown 2007; Karadayı 2010)

2.6.1.b. Fiziksel mutajenler

UV ışınları: 260 nm dalga boyutundaki UV ışınları özellikle pirimidin bölgelerinde dimerizasyona neden olmaktadır. Bu dimerizasyonlar çoğunlukla delesyon tipi mutasyonlara neden olmaktadır (Kuru ve Gözükara 2001; Özbek 2006; Bahçeci 2007; Brown 2007; Öner vd 2009).

İyonize radyasyon: Bu mutajenlere maruz kalan genomlarda yapısal kırılmalar, baz değişimi mutasyonları, insersiyon ve delesyon tipi mutasyonlar sıklıkla görülmektedir (Kuru ve Gözükara 2001; Özbek 2006; Bahçeci 2007; Brown 2007; Öner vd 2009).

Sıcaklık: Sıcaklık uygulamaları şeker halkasını baza bağlayan β -N-glikozidik bağların kopmasına yol açar. Bu reaksiyon sıklıkla pürin bazlarının bulunduğu bölgelerde meydana gelmektedir. Bazdan ayrılan şeker ve fosfat gruplarının da yıkımı sonucunda çift zincirli DNA yapısında 1 nükleotidlik bir boşluk (GAP) meydana gelir. Meydana

gelen boşluk DNA tamir mekanizması ile tamir edilmezse bu bölgenin mutasyona uğrama olasılığı yüksektir (Kuru ve Gözükara 2001; Özbek 2006; Bahçeci 2007; Brown 2007; Öner vd 2009).

2.7. Gen Mutasyonlarının Etkileri

2.7.1. Gen mutasyonlarının genomlar üzerine olan etkileri

Nükleotid diziliminde değişime sebep olan pek çok gen mutasyonu kodlanmayan bölgelerde meydana geldiği için genomun fonksiyonunu etkilemez. Böyle mutasyonlara sessiz mutasyon adı verilir. Ancak kodlanan bölgelerde meydana gelen mutasyonlar genomun fonksiyonunu önemli derecede etkilemektedirler (Brown 2007; Karadayı 2010).

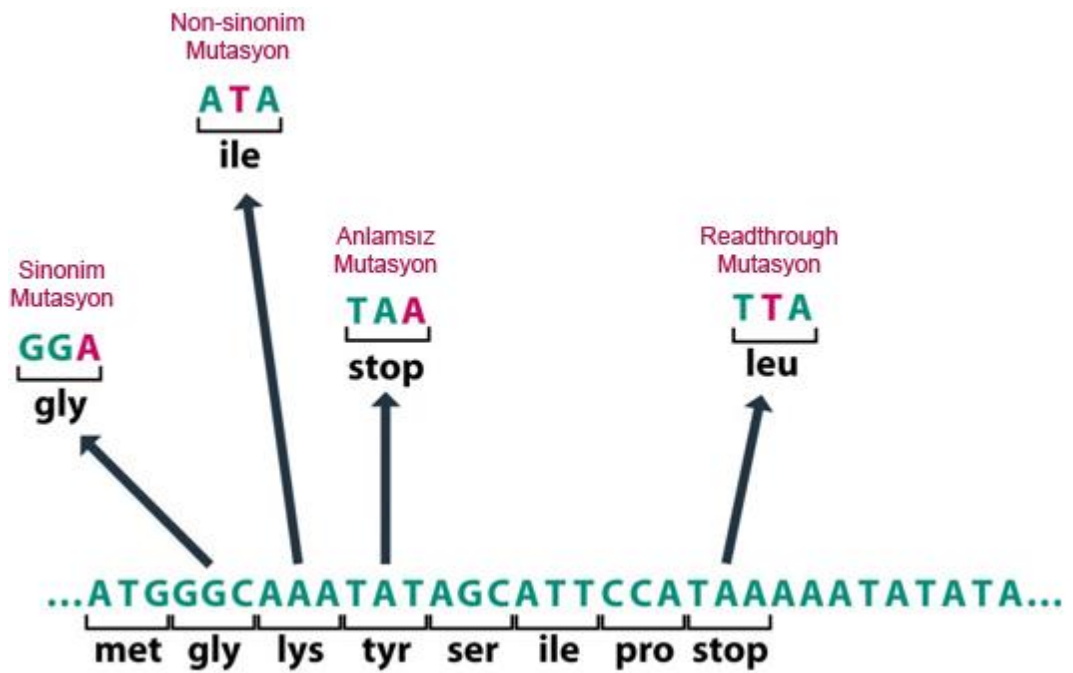
Kodlanan gen bölgelerinde meydana gelen ve genomun fonksiyonunu değiştirmeyen mutasyonlara sessiz mutasyon ya da sinonim mutasyon adı verilir (Şekil 2.6). Bu mutasyon sonucunda oluşan kod ile mutasyona uğramadan önceki kodun oluşturduğu mRNA kodunu aynı aminoasidi sentezlemektedir (Bahçeci 2007; Brown 2007; Öner vd 2009).

Baz değişim mutasyonları sonucunda bir aminoasidi sentezleyen kodonun başka bir aminoasidi sentezleyen kodona dönüşmesi olayına nonsinonim mutasyon adı verilmektedir (Şekil 2.6). Nonsinonim mutasyonlar sonucunda oluşan mutant proteindeki 1 farklı aminoasit, binlerce aminoasitten oluşan proteinlerin birkaç aminoasit değişimine gösterdiği toleranstan dolayı çoğunlukla protein kaybına sebep olmamaktadır (Bahçeci 2007; Brown 2007; Öner vd 2009; Karadayı 2010).

Baz değişim mutasyonlarının neden olduğu bir diğer mutasyon çeşidi ise anlamsız mutasyonlardır (Şekil 2.6). Bu olguda, ilgili gen dizisindeki bir amino asidin sentezinden sorumlu kodonda meydana gelen bir baz değişimi mutasyonu, bu kodonun terminasyon (stop, sonlanma) kodonuna dönüşmesine sebep olur. Böyle oluşan

proteinler çoğunlukla fonksiyon kaybına uğramaktadır (Bahçeci 2007; Brown 2007; Öner vd 2009).

Ayrıca baz değişim mutasyonları sonlanma kodonlarında meydana gelip bu kodonları aminoasit sentezleyen kodonlara çevirebiliyorsa bu tür mutasyonlara anlamsız mutasyonların tersi anlamında readthrough mutasyonları adı verilir (Şekil 2.6).

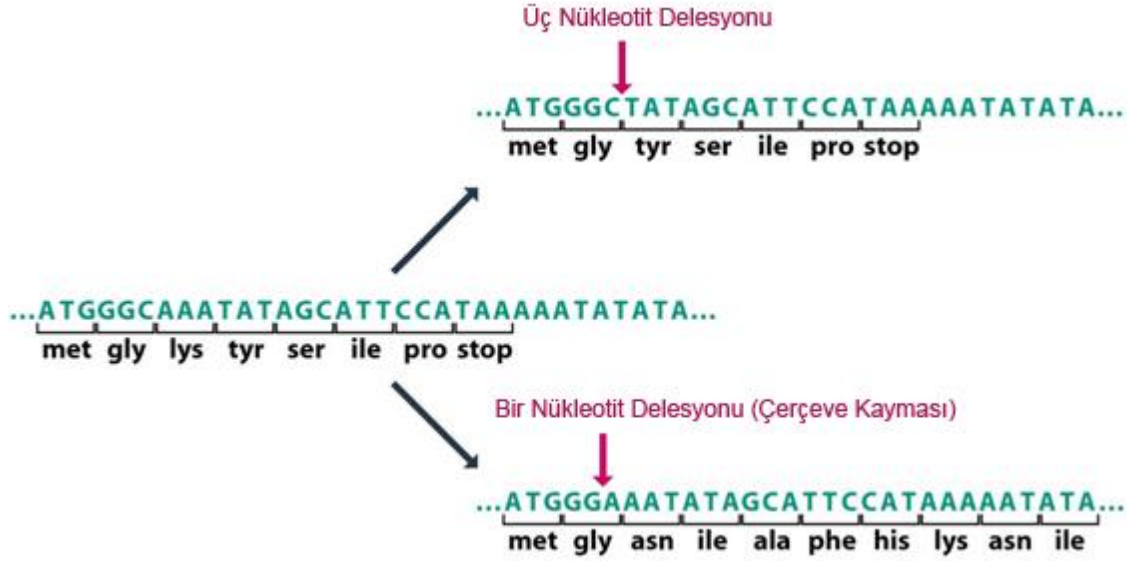


Şekil 2.6. Baz değişimi nokta mutasyonlarının genom üzerine olan etkileri (Brown 2007)

Gen mutasyonlarının diğer grubunu oluşturan insersiyon ve delesyonlar genomun fonksiyonu üzerinde önemli etkilere sahiptirler. Bu mutasyonların en iyi bilinen etkisi genomun yapısına bazların eklenmesi ya da çıkması sonucunda gen bölgelerindeki okuma sırası değişmektedir. Bu olaya çerçeve kayması adı verilir ve oluşan ürün orijinalinden tamamen farklıdır (Şekil 2.7).

Delesyon ve insersiyonların tamamı çerçeve kayması mutasyonuna sebep olamamaktadır. Gen bölgesine 3 veya 3'ün katı şeklinde baz ekleniyor ya da çıkıyorsa

çerçeve kayması mutasyonları meydana gelmemekte bunun yerine oluşan mutant proteinde bir ya da birden çok aminoasit fazlalığı veya azlığı oluşmaktadır (Şekil 2.7). Böyle meydana gelen bir mutasyon çerçeve kayması mutasyonlarına göre genom fonksiyonlarını daha az etkilemektedir.



Şekil 2.7. İnsersiyon/Delesyon tipi gen mutasyonlarının genom üzerine olan etkileri (Brown 2007)

2.7.2. Gen mutasyonlarının mikroorganizmalar üzerine olan etkileri

Bakteri ve maya gibi mikroorganizmalarda meydana gelen gen mutasyonları bu canlıların bazı özelliklerini kaybetmesi ile sonuçlanmaktadır. Bu mikroorganizmaların detaylı fenotipik özelliklerinin incelenmesi yerine farklı besiyerlerinde gelişebilme özelliklerine göre sınıflandırmalar, 4 temel kategorinin oluşmasıyla sonuçlanmıştır (Kuru ve Gözükara 2001; Brown 2007; Öner vd 2009; Karadayı 2010).

1. Mikroorganizmaların belirli gen bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar bu canlıları mutasyona uğrayan gen bölgelerinin ürünü bakımından dışarıya bağımlı duruma getirmektedir. Oksotrofluk olarak tanımlanan bu durumdaki mikroorganizmaların buldukları ortamda hayatta kalabilmeleri için ilgili genin ürünlerinin besiyeri

ortamında bulundurulması gerekmektedir. çalışmalarımızda kullandığımız *E. coli* WP2*uvrA* mutant bakterisi triptofan oksotrofluğuna, *Salmonella typhimurium* TA1535 ve TA1537 mutant bakteri suşları ise histidin/ biyotin oksotrofluğuna örnek olarak verilebilmektedir. Bu suşların yabani formları yani gen ürünü olarak dışa bağımlı olmayan formlarına ise prototrof adı verilmektedir.

2. Gen mutasyonları çevresel şartlara bağılı olarak mutasyonların meydana gelmesine olanak sağlayabilmektedir. Isıya bağımlı mutant mikroorganizmalar bu mutasyona sahip olduğu bilinen organizmalardır. Bu mikroorganizmalar düşük ısıda normal hayatlarına devam edebilmektedirler. Ancak ısı yükseldikçe hayatlarını devam ettirememektedirler. Sonuç olarak meydana gelen mutasyonun protein stabilitesini olumsuz etkilediği ve mutant bireylerdeki proteinlerin orijinal bireylere göre daha hassas olduğu görüşü benimsenmektedir.

3. Gen mutasyonlarının mikroorganizmalar üzerine bir diğer etkisi inhibitörlere karşı dirençli mutantların ortaya çıkmasını sağlamaktır. *E. coli* bakterisinin streptomisine karşı direnç sağlaması bu duruma en iyi örnektir. Mikroorganizmanın bir proteininde meydana gelen mutasyondan dolayı streptomisin bakteriyel hücreye ulaşmasını engellenmesi bu olayın mekanizmasını açıklamaktadır.

4. Mikroorganizmaların promotör bölgelerinde ve gen işleyişini düzenleyen bölgelerde meydana gelen mutasyonlar ilgili genin ürününün sürekli olarak sentezlenmesini sağlamaktadır.

2.7.3. Gen mutasyonlarının gelişmiş organizmalar üzerine olan etkileri

Başta insan olmak üzere birçok ökaryotik canlıyı kapsayan gelişmiş organizmalar, mutasyonların indirekt etkilerinin gözlenebilmesi için idealdirler. Bu canlıların büyük çoğunluğu somatik ve germ hücrelerini bünyelerinde bulundurmaktadırlar. Gen mutasyonlarının bu hücrelerden hangisinde meydana geldiği bu mutasyonun etkisini tarif etmede en önemli kriterlerden biridir. Mutasyon somatik hücrelerde meydana geliyorsa bu durumdan sadece mutasyonu taşıyan birey etkilenmektedir. Ancak mutasyon germ hücrelerinde meydana geliyorsa gelecek nesillere aktarılma olasılığı yüksektir (Kuru ve Gözükara 2001; Brown 2007; Öner vd 2009).

Çok hücreli gelişmiş canlılardaki mutasyon etkileri fonksiyon kaybı ve fonksiyon kazanımı olmak üzere 2 grupta incelenebilmektedir. Fonksiyon kaybı mutasyonların neden olduğu en yaygın etkidir. Bunun mekanizması mutasyon sonucunda bazı proteinlerin etkilerinin tamamen kaybolmasıdır (Brown 2007). Fonksiyon kazanımı ise mutasyonların neden olduğu nadir etkilerden biridir. Bu olayın esası organizmanın mutasyona uğramasıyla daha önce sentezleyemediği proteinleri sentezleyebilme özelliği kazanmasıdır. Böyle bir mutasyonun hücre döngüsünde rol oynayan bir veya birden fazla gen bölgesinde meydana gelmesi hücrelerin kontrolsüz çoğalmasına yani kansere neden olabilmektedir (Brown 2007).

2.8. Mutajenite Araştırmalarında Kullanılan Test Sistemleri

Günlük hayatta karşımıza çıkan doğal ve sentetik kimyasallar genotoksik ve karsinojenik etkilere sahip olma potansiyeline sahiptirler. Buna dayanarak Karadayı (2010) “Genotoksik ve karsinojenik özelliklere sahip kimyasalların olumsuz etkilerinden korunma kimyasal maddelerin tespiti, tanılanması ve etkilerinin araştırılması ilkelerine dayanmaktadır.” şeklinde görüş bildirmiştir. Böylece maddelerin genotoksik ve karsinojenik özelliklerini saptayabilmek için en uygun yöntem deney hayvanlarıyla uzun zamanda yapılan *in vivo* çalışmalardır. Uzun zamanlı test sistemleri mutajenite ve kanser çalışmaları gibi hassas durumlarda kullanılması en uygun testler olup öncü testlerde uygulanması kullanışlı değildir (Petek 1999; Özbek 2006). Bu nedenle kimyasal maddelerin karsinojenik ve mutajenik etkilerini inceleyebilmek için kısa zamanlı test sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemlerin, kısa zamanda sonuç vermeleri, ekonomik olmaları ve öncü testler için kullanışlı olmaları önemlerini arttırmaktadır (Mortelmans and Zeiger 2000; Özbek 2006). Ancak kısa zamanlı test sistemlerinde pozitif sonuç gösteren kimyasallar uzun zamanlı test sistemleri ile çalışılarak sonuç teyit ettirilmelidir.

2.8.1. Sitogenetik yöntemler

Genetik materyale yüksek derecede zarar veren ajanların araştırılmasında yapısal kromozom bozukluğu (CA), kardeş kromatid değişimi (SCE) ve mikronükleus (MN) testleri kullanılmaktadır.

2.8.1.a. Yapısal kromozom bozukluğu testi (CA: Chromosome Aberration)

Bu test sistemi anöploidi, poliploidi ve kromozom-kromatid kopmalarından kaynaklanan mutasyonların incelenmesinde kullanılır. Yapılan uygulamada test maddesine maruz bırakılan örneklere ardından kolsişin eklenerek kromozomların bölünme sırasında metafaz safhasında kalması sağlanır (Korkmaz 2005).

2.8.1.b. Kardeş kromatid değişimi testi (SCE: Sister Chromatid Exchange)

Bu test genellikle DNA kırılmalarına dayanan hasarların tespiti için kullanılmaktadır. Bu testte meydana gelen kırılmalar DNA onarım merkezini harekete geçirerek, kardeş kromatitler arasında homolog parçalar yer değiştirir. Ardından çeşitli boyama işlemlerinden geçirilerek incelenirler (Albanesi *et al.* 1999; Korkmaz 2005).

2.8.1.c. Mikronükleus testi (MN)

Hücrelerin mitoz bölünmeleri sonucunda ortaya çıkan mikronükleuslar hücrenin esas çekirdeğine dahil olmayan sentromeri bulunmayan kromozom parçalarından ya da kromozomun kendisinden köken alan oluşumlardır. Kimyasal uygulamalar sonucunda MN frekansındaki artış hücrede kromozom mutasyonlarının fazlalığının göstergesidir (Fenech 1993; Demirel ve Zamani 2002).

Bu test sistemi sitogenetik hasarların belirlenmesinde daha fazla hücrenin sayılmasına olanak sağlama ve istatistiksel olarak daha kabul edilebilir sonuçları ortaya koyma

özellikleri bakımından araştırıcılar tarafından yaygın bir şekilde kullanılır (Fenech 1993; Demirel ve Zamani 2002).

2.8.2. Mikrobiyal yöntemler

Genellikle bakteriyel mutasyon test sistemlerinin kullanıldığı mikrobiyal yöntemler gen mutasyonları ile alakalı doğal veya sentetik kimyasalların mutajenik potansiyelini belirlemek için en önemli kısa zamanlı test sistemleri olarak bilinirler (Ames *et al.* 1973a, 1973b; Maron and Ames 1983; Mortelmans and Riccio 2000; Mortelmans and Zeiger 2000). Bakterilerin basit besiyerlerinde kolay ve hızlı bir şekilde üremeleri, kısa hayat devirlerinin olması ve bunlarla yapılan testlerin ucuz, hızlı ve pratik olması gibi özellikler bu başlık altında incelenecek olan testlerin avantajlarından (Mortelmans and Zeiger 2000).

Araştırıcılar tarafından en çok tercih edilen mikrobiyal testlere *Saccharomyces cerevisiae* ile uygulanan maya delesyon testi, *Salmonella typhimurium* mutant bakteri suşlarının kullanıldığı AMES/*Salmonella* test sistemi, *Escherichia coli* mutant bakteri suşunun kullanıldığı *E. coli* WP2 test sistemi örnek verilebilir (Mortelmans and Riccio 2000; Mortelmans and Zeiger 2000; Kirpnick *et al.* 2005).

2.8.2.a. Maya delesyon testi (Yeast DEL Assay)

İntrakromozomal test sistemleri içinde yer alan maya delesyon (DEL) testi uygulamasının kolay olması ve sonuçlarının güvenilir olmasından dolayı yaygın olarak kullanılan bir testtir. Bu çalışmada kullanılan mutant bireylerin mutajenite oranlarını arttırmak için DNA zincir kırıklarına neden olan maddeler iyonizan ışınlar, alkilleyici ajanlar, oksidatif stres ve sıcaklık şoku kullanılabilir. Bu test sistemi karsinojen maddelere karşı diğer kısa zamanlı test sistemlerinden daha çok duyarlıdır. Bu özelliğinden dolayı kısa zamanda üne kavuşmuş ve zirai atıklar, çevresel kirleticiler ve farmositikler gibi birçok maddenin genotoksisite çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır (Brennan and Schiestl 2004; Kirpnick *et al.* 2005).

Bu test sistemi *Saccharomyces cerevisiae*'nin genomundaki *his3* operonuna pRS6 plazmidinin yerleştirilmesiyle histidin yönünden inaktive edilmesi esasına dayanmaktadır. Böylelikle çalışmada kullanılan organizma histidin bakımından oksotrof hale getirilmiştir.

Maya delesyon test sisteminde en yaygın kullanılan maya suşu *S. cerevisiae* RS112'dir. Bu organizma hem adenin hemde histidin oksotrofisi göstermektedir (Brennan and Schiestl 2004; Kirpnick *et al.* 2005).

2.8.2.b. Ames/Salmonella test sistemi

Ames/Salmonella test sistemi Dr. Bruce Ames ve Dr. Maron tarafından 1970'li yıllarda geliştirilmiştir. Bakteriyel geri mutasyon esasına dayanan bu test uygulama kolaylığı ve testin kabul edilirliliği bakımından büyük öneme sahiptir. Bilim dünyasına sunulduğu anda kullanımı verdiği sonuçların güvenilir olmasından dolayı hızla yayılmaya başlamıştır (Mortelmans and Zeiger 2000).

Günümüzde en çok Amerika ve Japonya'da kullanılan bu test *Salmonella typhimurium* LT2 atasal bireyler *in vitro* koşullarda mutasyona uğratılarak histidin oksotrofuna dönüştürülmüştür. Bu test kullanılarak yapılan mutajenite çalışmalarının temeli, uygulanan kimyasalın bakteri suşunda bulunan his mutasyonunu geri mutasyona uğratmasıdır. Böylece bakteri suşları oksotrof formdan prototrof forma dönüşmektedirler. Böyle bir etkiye sahip olan kimyasal için mutajenik etkiye sahiptir denilebilir (Shamberger *et al.* 1979; Rosin and Stich 1978-1979; Alekperov *et al.* 1986; Victorin *et al.* 1987).

Ames test sisteminde kullanılan *Salmonella typhimurium* bakteri suşlarının genetik özellikleri;

Histidin mutasyonu: Ames test sisteminde kullanılan farklı bakteri suşları, histidin gen bölgesinin farklı yerlerinde ve farklı özellikte mutasyonlar meydana getirilerek

oluşturulmuşlardır. Baz değişimi nokta mutasyonu ya da çerçeve kaymasına neden olan delesyon ve insersiyon mutasyonlarıyla bakteriler histidin bakımından prototrofik oksotrof forma dönüştürülmüşlerdir. Böylelikle etkisinin belirlenmesi için uygulanan kimyasalların hangi çeşit mutasyonla etki ettiği belirlenebilecektir.

Salmonella typhimurium bakteri suşları ile yapılan çalışmalarda bu bakterilerin his operonunda bulunan mutasyonların yeri ve mutasyon etki biçimleri belirlenmiştir (Çizelge 2.1).

rfa mutasyonu: Gram negatif bakterilerde bulunan hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasını kodlayan genlerde meydana getirilen mutasyonlar sonucunda lipopolisakkarit tabakanın kısmen ya da tamamen kaybolması sağlanmıştır. Bunun amacı uygulanan kimyasalla bakteriyi maksimum düzeyde karşı karşıya bırakmaktır (Mortelmans and Zeiger 2000).

uvrB mutasyonu: Bu mutasyon DNA onarım sistemindeki kesip çıkarma işlemi gören *uvrB* geninin delesyonu ile oluşmuştur. Mutajenlerin etkisinin ortaya çıkarılmasında test duyarlılığının artırılmasını sağlar. *uvrB* geninin delesyonu sırasında biyotin ve nitroredüktaz enzimini kodlayan gen bölgeleri de delesyona uğramıştır. H vitamini olarak da adlandırılan biyotin testin yapıldığı ortama eklenmek zorundadır. Nitroredüktaz enzimi ise birçok nitro grubu mutajen için aktivasyon olanağı sağladığı için kullanılacak kimyasal bu özellikteyse ortama bu enzimin katılması gerekmektedir (Mortelmans and Zeiger 2000).

R faktörü: Test suşlarına mutajenlere karşı hassasiyet kazandırılması için amfisilin dirençlilik geni taşıyan pKM 101 plazmidi eklenmiş ve TA97, TA98 ve TA100 mutant bakteri suşları elde edilmiştir. TA97 ile TA1537, TA98 ile TA1538 ve TA100 ile TA1535 suşları arasında mutajenik özgülük bulunmaktadır. R faktörü bulduran bakteri suşları orijinal formlara oranla mutajen maddelere daha hassas olduğu belirtilmiştir (Mortelmans ve Zeiger 2000). Oksidatif mutajenlerin tespiti için

geliştirilen TA102 suşu da yapısında tetrasiklin dirençlilik geni taşıyan pAQ1 plazmiti taşımaktadır (Sawai *et al.* 1998; Mortelmans and Zeiger 2000).

Çizelge 2.1. Ames/*Salmonella* test sisteminde yaygın olarak kullanılan histidin oksotrofu mutant bakterilerin genetiksel özellikleri

Suş	Histidin Mutasyonu	LPS	Onarım	pKM 101	Mutasyonun Niteliği	Belirlenebilen Bileşik Grupları
TA1535	<i>His G46</i>	<i>rfa</i>	$\Delta uvrB$	-	AT→GC Transisyon	Baz değişimi nokta mutasyonuna sebep olan mutajenler
TA1537	<i>His C3076</i>	<i>rfa</i>	$\Delta uvrB$	-	C.....C yanına +1	Çerçeve kaymasına sebep olan mutajenler
TA1538	<i>His D3052</i>	<i>rfa</i>	$\Delta uvrB$	-	CG.....CG yanından -1	Çerçeve kaymasına sebep olan mutajenler
TA97	<i>His D6610</i>	<i>rfa</i>	$\Delta uvrB$	+	CCC yanına +4	Çerçeve kaymasına sebep olan mutajenler
TA98	<i>His D3052</i>	<i>rfa</i>	$\Delta uvrB$	+	CG yanından -1	Çerçeve kaymasına sebep olan mutajenler
TA100	<i>His G46</i>	<i>rfa</i>	$\Delta uvrB$	+	AT→GC Transisyon	Baz değişimi nokta mutasyonuna sebep olan mutajenler
TA102	pAQ1 <i>His G428</i> Δ his	<i>rfa</i>	$\Delta uvrB$	-	GC ochre AT	Oksidantlar, X ışınları, U.V., mitomisin C ve kinonlar...

2.8.2.c. *Escherichia coli* WP2 test sistemi

Bakteriyel geri mutasyon test sistemlerinden bir diğeri ise 1976 yılında Green ve Muriel isimli araştırıcılar tarafından kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılması için geliştirilen *E. coli* WP2 test sistemidir (Green and Muriel 1976).

Bu test sisteminde *E. coli* bakterisinin suşları kullanılmaktadır. Araştırmalar bu test sisteminde kullanılan bakteri suşlarının *trpE* geninde AT baz değişimi nokta mutasyonu taşıdığını göstermiştir. Test suşlarında meydana gelen bu mutasyon ochre (anlamsız, non-sense) mutasyonun meydana gelmesine sebep olarak test suşlarını triptofana karşı oksotrof hale getirmiştir (Mortelmans and Riccio 2000).

Ayrıca *E. coli* WP2 $uvrA$ test suşunda triptofan mutasyonuna ek olarak *uvrA* mutasyonu, *E. coli* WP2(pKM101) suşunda pKM101 plazmiti ve *E. coli* WP2 $uvrA$ (pKM101) test suşunda ise hem *uvrA* mutasyonu hem de pKM101 plazmiti bulunmaktadır. Yeni nesil olarak adlandırılan bu bakteri suşlarına ek olarak eklenen her bir özellik o suşun testteki güvenirliğini arttırmaktadır (Mortelmans and Riccio 2000).

2.8.3. PCR (Polymerase Chain Reaction) temelli yöntemler

PCR 1993 yılında Dr. Kary Mullis tarafından keşfedilmiştir. PCR'ın keşfi moleküler biyoloji alanında devrim olarak sayılmış ve keşfedildiği zamandan bu yana evrim, klinik tıp, adli tıp, patojen tespiti gibi çeşitli araştırma alanlarında kullanılmıştır. Daha sonra RAPD(random amplified polymorphic DNA), AP-PCR(arbitrarily primed PCR) ve DAF(DNA amplification fingerprinting) gibi yeni PCR temelli metodlar geliştirilmiştir. Bu üç metod genetik haritalama, taksonomi ve filogeni çalışmalarında yarı belirleyici olarak rol oynayan metodlardır (Atienzar and Jha 2006).

2.8.3.a. RAPD (random amplified polymorphic DNA)

Kısa zamanlı mutasyon test sistemlerinden biride PCR temelli ve Williams *et al.* (1990) ve Welsh and McClelland (1990) tarafından geliştirilen random amplified polymorphic DNA (RAPD) analizidir. RAPD tekniğinde az miktarda ve düşük kalitede DNA'ya ihtiyaç duyulması, çabuk sonuç vermesi ve ucuz olması tekniğin önemli avantajlarındanır (Yıldırım ve Kandemir 2001; Temizkan ve Arda 2004). Bu avantajlarından dolayı RAPD analizi;

- 1) Genetik çeşitlilik çalışmalarında polimorfizm saptanmasında (Grayson *et al.* 2000; Atienzar and Jha 2006).
- 2) Soyağacı çalışmalarında (Atienzar and Jha 2006).
- 3) Genetik haritaların oluşturulmasında (Atienzar and Jha 2006).
- 4) Canlı çeşitlerini tanılamada (Atienzar and Jha 2006).
- 5) Böcek direnç genlerinin tespitinde (Atienzar and Jha 2006).
- 6) Genotoksisite ve karsinogenez çalışmalarında kullanılmaktadır (Cenkci *et al.* 2009; Atienzar and Jha 2006).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan boyarmaddeler

Çalışmada biyoloji laboratuvarlarında kullanılan Amido Black 10B(Sigma-Aldrich®), Orange G(Sigma-Aldrich®) ve Evans Blue (Sigma-Aldrich®) boyarmaddeleri kullanılmıştır. Bu boyarmaddeler uygun çözücüde farklı miktarlarda çözülmüş ve bir sonraki basamakta tohumlarda ve köklerde etkileri hem görsel hem de deneysel olarak değerlendirilmiştir.

3.1.2. Çalışmada kullanılan mutant bakteri suşları

Bu çalışmada kullanılan *Salmonella typhimurium* TA1535 (ATTC® Numarası: 29629) ve TA1537 (ATTC® Numarası: 29630) mutant bakteri suşları ATTC® (The American Type Culture Collection–Georgetown University, Bacteria Department, Washington, U.S.A.)’den; *Escherichia coli* WP2uvrA (ATTC® Numarası: 49979) mutant bakteri suşu da LGC Standarts (Middlesex, U.K.)’tan temin edilmiştir.

3.1.3. Çalışmada kullanılan bitki tohumu

Çalışmada kullanılan aynı türe ait 32T83 kodlu mısır tohumları Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesinden temin edilmiştir.

3.1.4. Pozitif mutajenler ve kimyasal maddeler

Mutajenite deneylerinde pozitif kontrol olarak kullanılan mutajenik ajanlar:

Sodyum azid (NaN ₃)	: Sigma-Aldrich [®] ,ten
9-Aminoakridin (9-AA)	: Merck [®] ,ten
N-Metil-N ⁷ -nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)	: ABCR GmbH & Co. KG [®] 'den

temin edilmiştir.

Bakteriyel mutajenite uygulamalarının çeşitli aşamalarında kullanılan kimyasal maddeler:

D-glukoz (dekstroz)	: Oxoid [®] ,ten
Nutrient Broth No.2	: Oxoid [®] ,ten
Nutrient Agar	: Difco [®] ,dan
Bacto Agar	: Difco [®] ,dan
L-triptofan	: Merck [®] ,ten
Magnezyum sülfat	: Merck [®] ,ten
Potasyum fosfat dibasic	: Merck [®] ,ten
D-biyotin	: Sigma-Aldrich [®] ,ten
L-histidin HCl	: Sigma-Aldrich [®] ,ten
Kristal viyole	: Sigma-Aldrich [®] ,ten
Sodyum klorür	: Sigma-Aldrich [®] ,ten
Sodyum fosfat monobasic	: Sigma-Aldrich [®] ,ten
Sodyum fosfat dibasic	: Sigma-Aldrich [®] ,ten
Sitrik asit monohidrat	: Sigma-Aldrich [®] ,ten
Amonyum sodyum fosfat dibasic tetrahidrat	: Sigma-Aldrich [®] ,ten temin edilmiştir.

Bitkiden DNA izolasyonu için kullanılan kimyasal maddeler:

Trizma base	: Sigma-Aldrich [®] ,ten
EDTA	: Sigma-Aldrich [®] ,ten
Sodyum klorür	: Sigma-Aldrich [®] ,ten
β- merkaptoetanol	: Sigma-Aldrich [®] ,ten

Polivinilpirolidon (PVP)	: Sigma-Aldrich®'ten
Setil trimetil amonyum bromür (CTAB)	: Sigma-Aldrich®'ten
Fenol: Kloroform: İzoamil alkol	: Sigma-Aldrich®'ten
TE Buffer	: Sigma-Aldrich®'ten
Sodyum dodesil sülfat	: Fluka®'dan
Kloroform: İzoamil alkol	: Fluka®'dan temin

edilmiştir.

RAPD-PCR analizi için gerekli olan kimyasal maddeler:

Taq DNA Polimeraz	: Sigma-Aldrich®'ten
10X PCR Buffer without MgCl ₂	: Sigma-Aldrich®'ten
dNTPs	: Sigma-Aldrich®'ten
MgCl ₂	: Sigma-Aldrich®'ten temin

edilmiştir.

3.1.5. RAPD-PCR analizinde kullanılan primerler

RAPD-PCR analizinde kullanılan primerler İnvitrogen™ den temin edilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. RAPD-PCR analizinde kullanılan primerler

Primerin adı	Baz Dizilimi	Referans
OPA2	5'-TGCCGAGCTG-3'	Gajera <i>et al.</i> 2014
OPA3	5'-AGTCAGCCAG-3'	Gajera <i>et al.</i> 2014
OPA6	5'-GGTCCCTGAC-3'	Erturk <i>et al.</i> 2012
OPB4	5'-GGACTGGAGT-3'	Cenkci <i>et al.</i> 2009

3.1.6. Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Buzdolabı	: Arçelik, TÜRKİYE, 8190NF
Çalkalamalı İnkübatör	: Zhicheng, CHINA, ZHWY-200B
Derin Dondurucu	: Nuair, U.S.A., -86 Ultralow Freezer, SN P07K-476316- PK
Hassas Terazi	: Mettler Toledo, CHINA, AL204
İnkübatör	: Binder, GERMANY, BD53
Manyetik Karıştırıcı	: Nüve, TÜRKİYE, MK-418, SN 05-1083
Mikrodalga Fırın	: Arçelik, TÜRKİYE, MD592
Mini Karıştırıcı	: IKA, U.S.A., M51, SN 03017581
Otoklav	: Hirayama, JAPAN, HVE 50, SN 030787253
Saf Su Cihazı	: GFL, GERMANY, 2004
Sıcak Su Banyosu	: Memmert, GERMANY, 854
Steril Kabin	: Esco, SINGAPORE, AC2-4E1
Spektrofotometre	: Shimadzu, JAPAN, RC 232C
pH Metre	: Hanna, PORTUGAL, HI 9321, SN 396202
Vortex	: IKA, U.S.A., MS2
Qiaxcel Advenced	: Qiagen, USA
Termal döngü cihazı	: Sensequest labcyclers, GERMANY
Santrifüj	: Hettich, GERMANY

3.1.7. Çözeltiler ve besiyerleri

Minimal glukoz agar (MGA): Mutajenite deneylerinde temel alt besiyeri ve modifiye edilerek test organizmalarının histidin, biyotin ve triptofan oksotroflerini araştırmak için kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml'de</u>
Agar	15 gr
%10'luk D-glukoz çözeltisi	50 ml
Vogel-Bonner (VB tuzları) medyum E (50×)	20 ml

Hazırlanışı:

15 g agar 930 ml distile su içerisine katılmış ve oluşan çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Bu işlemin ardından, çözeltiye daha önce steril edilen Vogel-Bonner (VB tuzları) medyum E (50×) ve %10'luk D-glukoz çözeltisi eklenmiş, steril kabin içerisinde hafifçe çalkalamak suretiyle iyice karışması sağlanmıştır. Besiyeri uygun dökme ısısına geldiğinde petri kaplarına dökülmüştür. Bu besiyeri oda sıcaklığındaki steril ortamlarda muhafaza edilmelidir (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

%10'luk D-glukoz çözeltisi: MGA besiyerlerinin (alt agar) hazırlanmasında kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml'de</u>
D-glukoz (Dekstroz)	100 g

Hazırlanışı:

Bu çözelti 100 g D-glukoz 700 ml distile su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı ile iyice çözülmüş ve son hacmi distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Bu işlemde sonra 50 ml'lik hacimlerde cam şişelere aktarılan çözelti 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve +4°C'de saklanmıştır (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

Vogel-Bonner (VB tuzları) medyum E (50×): MGA (alt agar) besiyerlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml'de</u>
Magnezyum sülfat (MgSO ₄)	8,7 g
Amonyum sodyum fosfat dibasic tetrahidrat (NaNH ₄ HPO ₄ + 4H ₂ O)	175 g
Potasyum fostaf dibasic (K ₂ HPO ₄)	500 g
Sitrik asit monohidrat (HOC(COOH)(CH ₂ COOH) ₂ + H ₂ O)	100 g

Hazırlanışı:

Yukarıda belirtilen maddeler, önceden sıcaklığı 50°C'ye ayarlanmış olan 650 ml distile su içerisine sırasıyla eklenmiştir. Manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözünmesi sağlanan bir maddenin ardından diğerinin eklenmesi suretiyle hazırlanan çözeltinin son hacmi, distile su eklenerek 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Bu işlemden sonra 20 ml'lik hacimlerde cam deney tüplerine aktarılan çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve karanlıkta oda ısısında saklanmıştır (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

Histidin/Biyotin çözeltili top agar: *S. typhimurium* suşlarıyla yapılan mutajenite deneylerinde uygulanan test materyalinin, test bakterilerinin ve diğer kimyasalların homojen olarak etkileşimini sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml'de</u>
Agar	6 g
Sodyum klorür (NaCl)	6 g

Hazırlanışı:

6 g agar ve 6 g NaCl 900 ml distile su içerisine katılmış, oluşan çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve oda sıcaklığında saklanmıştır. Deneyde kullanılmadan önce çözelti, mikrodalga fırında çözülmüş ve içerisine 100 ml 0,5 mM Histidin/Biyotin çözeltisi eklenmiştir (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

Triptofan çözeltili top agar: *E. coli* bakteri suşuyla yapılan mutajenite deneylerinde uygulanan test materyalinin, test bakterilerinin ve diğer kimyasalların homojen olarak etkileşimini sağlamak amacıyla kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml'de</u>
Agar	6 g
Sodyum klorür (NaCl)	6 g
0,5 mM Triptofan çözeltisi	100 ml

Hazırlanışı:

6 g agar ve 6 g NaCl 900 ml distile su içerisine katılmış, oluşan çözelti 120°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve oda sıcaklığında saklanmıştır. Deneyde kullanılmadan önce çözelti, mikrodalga fırında çözülmüş ve içerisine 100 ml 0,5 mM triptofan çözeltisi eklenmiştir (Mortelmans and Riccio 2000; Karadayı 2010).

0,5 mM Histidin/Biyotin çözeltisi: Bu çözelti *S. typhimurium* suşları ile yapılan mutajenite deneylerinde; histidin ve biyotin oksotrofu olan test bakterilerinin birkaç kez bölünmesine olanak sağlayarak, bu bakterileri mutajen ajanlara karşı daha hassas kılmak için kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml'de</u>
D-Biyotin	124 mg
L-Histidin	96 mg

Hazırlanışı:

Yukarıdaki maddeler kaynama sıcaklığına getirilmiş olan 1000 ml distile su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı ile iyice çözülmüştür. 0,45 µM membran filtre kullanılarak steril edildikten sonra +4°C'de saklanmıştır (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

0,5 mM Triptofan çözeltisi: Bu çözelti *E. coli* suşu kullanılarak yapılan mutajenite deneylerinde; triptofan oksotrofu olan test bakterilerinin birkaç kez bölünmesine olanak sağlayarak, bu bakterileri mutajen ajanlara karşı daha hassas kılmak için kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml'de</u>
L-Triptofan	102 mg

Hazırlanışı:

102 mg L-Triptofan kaynama sıcaklığına getirilmiş olan 1000 ml distile su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı vasıtasıyla iyice çözülmüştür. 0,45 µM membran filtre kullanılarak steril edildikten sonra +4°C'de saklanmıştır (Mortelmans and Riccio 2000; Karadayı 2010).

0,1 mM Sodyum fosfat tamponu (SFT) (pH: 7,4): Mutajenite deneylerinde reaksiyon ortamının pH dengesini sağlamak, test materyali, mutajen ve bakteri hücreleri arasındaki etkileşimi kolaylaştırmak amacıyla kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>1000 ml'de</u>
A Çözeltisi: 1000 ml distile su içerisinde 11,9 g sodyum fosfat monobasic (NaH ₂ PO ₄) çözümlenmesiyle hazırlanır.	120 ml
B Çözeltisi: 1000 ml distile su içerisinde 12,6 g sodyum fosfat dibasic (Na ₂ HPO ₄) çözümlenmesiyle hazırlanır.	880 ml

Hazırlanışı:

A ve B çözeltileri yukarıda belirtilen miktarlarda karıştırılmış ve oluşan yeni çözeltiliye gerektiğinde A çözeltisi eklenerek pH: 7,4 değerine ayarlanmıştır. Bu işlemin ardından 20 ml hacimdeki cam deney tüplerine aktarılan çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve karanlıkta oda ısısında saklanmıştır (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

Nutrient broth (NB): Test bakterilerinin canlandırılmasında ve gecelik kültürlerinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

İçerik

Oxoid nutrient broth No:2

1000 ml'de

23 g

Hazırlanışı:

23 g Nutrient broth kaynama sıcaklığına getirilmiş olan 1000 ml distile su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı ile çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 10 ml hacimdeki cam tüplere aktarıldıktan sonra 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edilmiş ve +4°C'de saklanmıştır (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

Nutrient agar (NA): Canlandırılan test bakterilerinden tek kolonilerin elde edilmesi ve *E. coli* mutant bakterileri ırkının *uvrA* mutasyonunu ile *S. typhimurium* mutant bakterilerinin *rfa* ve *uvrB* mutasyonlarının genetik kontrolü için kullanılmıştır.

İçerik

Difco nutrient agar

1000 ml'de

28 g

Hazırlanışı:

28 g Nutrient agar kaynama sıcaklığına getirilmiş olan 1000 ml distile su içerisine katılarak manyetik karıştırıcı ile çözülmüştür. Hazırlanan çözelti 121°C'de 30 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra dökme ısısına geldiğinde petri kaplarına dökülmüştür. Bu besiyeri oda sıcaklığındaki steril ortamlarda muhafaza edilmiştir (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

%0,1'lik Kristal viyole çözeltisi: *rfa* mutasyonu taşıyan mutant *S. typhimurium* bakterilerinin genetik kontrolü için kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>100 ml'de</u>
Kristal viyole	100 mg

Hazırlanışı:

100 mg kristal viyolenin 100 ml distile su içerisinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen çözelti ışık geçirmeyen şişelere konularak +4°C'de saklanmıştır (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

%0,01'lik Biotin çözeltisi: Biotin oksotrofu olan *S. typhimurium* bakterilerinin genetik kontrolü için kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>100 ml'de</u>
D-Biyotin	10 mg

Hazırlanışı:

10 mg D-biyotinin kaynama sıcaklığındaki 100 ml distile su içerisinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen çözelti 0,45 µM membran filtre kullanılarak steril edildikten sonra +4°C'de saklanmıştır (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

%0,5'lik Histidin çözeltisi: Histidin oksotrofu olan *S. typhimurium* bakterilerinin genetik kontrolü için kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>100 ml'de</u>
L-Histidin	500 mg

Hazırlanışı:

500 mg L-histidinin kaynama sıcaklığındaki 100 ml distile su içerisinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen çözelti 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra +4°C'de saklanmıştır (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

%0,4'lük Triptofan çözeltisi: Triptofan oksotrofu olan *E. coli* bakterilerinin genetik kontrolü için kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>100 ml'de</u>
L-Triptofan	400 mg

Hazırlanışı:

500 mg L-triptofanın kaynama sıcaklığındaki 100 ml distile su içerisinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Elde edilen çözelti 0,45 μ M membran filtre kullanılarak steril edildikten sonra +4°C'de saklanmıştır (Mortelmans and Riccio 2000; Karadayı 2010).

DNA Ekstraksiyon tamponu: RAPD-PCR yönteminde mısır bitkilerinin kökünden DNA izole etmek için kullanılmıştır.

<u>İçerik</u>	<u>100ml'de</u>
Trizma	0,24g
EDTA	4,65g
Sodyum klorür	2,92g
SDS	2g
β - merkaptoetanol	2g
PVP	1g

Hazırlanışı:

İçerikteki kimyasal maddelerin (β - merkaptoetanol hariç) 100 ml distile su içerisinde çözünmesiyle elde edilmiştir. Elde edilen çözelti 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildikten sonra oda sıcaklığında saklanmıştır. Uygulamaya başlanacağı zaman bu çözeltinin içerisine 2 ml β - merkaptoetanol katılarak kullanılır (Barış 2004).

3.2. Yöntem

3.2.1. Mutajenite araştırmalarında kullanılan mutant bakterilerin genetik özelliklerinin kontrolü

3.2.1.a. Histidin/Biyotin gereksinimi

Ames deneylerinde kullanılan *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 mutant bakteri ırklarının histidin ve biyotin oksotrofilerinin kontrolü amacıyla yapılan bir testtir. Gecelik kültürleri hazırlanan bakteriler MGA, histidinli MGA (1000 ml MGA+8 ml %0,5'lik Histidin çözeltisi), biyotinli MGA (1000 ml MGA+8 ml %0,01'lik Biyotin çözeltisi) ve histidinli/biyotinli MGA (1000 ml MGA+8 ml %0,5'lik Histidin çözeltisi + 8 ml %0,01'lik Biyotin çözeltisi) besiyerlerine ekilmiştir. 37°C'de 24 saat inkübasyon süresinden sonra besiyerlerindeki bakterilerin üreme durumları kontrol edilmiştir. Yapılan bu testin sonucunda sadece histidinli/biyotinli MGA besiyerinde üreme görülmesi test mikroorganizmalarının histidin ve biyotin oksotrofu olduğunu gösterir (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

3.2.1.b. Triptofan gereksinimi

E. coli WP2 deneylerinde kullanılan *E. coli* WP2uvrA mutant bakterinin triptofan oksotrofilerinin kontrolü amacıyla yapılan bir testtir. Gecelik kültürleri hazırlanan bakteriler MGA ve triptofanlı MGA (1000 ml MGA+8 ml %0,4'lük Triptofan çözeltisi) besiyerlerine ekilmiştir. 37°C'de 24 saat inkübasyon süresinden sonra besiyerlerindeki bakterilerin üreme durumları kontrol edilmiştir. Yapılan bu testin sonucunda sadece triptofanlı MGA besiyerinde üreme görülmesi test mikroorganizmalarının triptofan oksotrofu olduğunu gösterir (Mortelmans and Riccio 2000; Karadayı 2010).

3.2.1.c. *uvrA* ve *uvrB* mutasyonları

Kullanılan test organizmalarından *E. coli* mutant bakteri ırkı *uvrA*, *S. typhimurium* ırkları ise *uvrB* mutasyonu taşımaktadır. Bu test kullanılan mikroorganizmalarının ultraviyole ışınlar karşısında duyarlılık göstermesi ilkesine dayanarak yapılmıştır. Gecelik kültürleri hazırlanan bakteriler NA besiyerine tüm yüzeye yayılacak biçimde ekilmiştir. Steril kabin içinde kapakları açılan petrilerin yarısı UV ışınlarını geçirmediği için alüminyum folyo ile kapatılmış ve 30 watt gücündeki UV lambası altında 10 saniye boyunca ışınlar maruz bırakılmıştır. Daha sonra petrilerin kapakları kapatılarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve bu sürenin sonunda bakterilerin üreme durumları kontrol edilmiştir. Yapılan bu testin sonucunda UV ışınlarına maruz kalan bölgede üremenin olmayıp maruz kalmayan bölgede üremenin olması test mikroorganizmalarının *uvrA* ve *uvrB* mutasyonlarını taşıdıklarının bir kanıtıdır (Mortelmans ve Riccio 2000; Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

3.2.1.d. *rfa* mutasyonu

Ames deneylerinde kullanılan *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 mutant bakteri ırklarının *rfa* mutasyonu taşıdıklarını kontrol etmek amacıyla yapılan bir testtir. Gecelik kültürleri hazırlanan bakteriler nutrient agar besiyerine tüm yüzeye yayılacak şekilde ekilmişlerdir. Daha sonra steril disklerle 10 µl %0,1'lik kristal viyole çözeltisi emdirilmiş ve bakterilerin ekildiği besiyerlerinin ortasına yerleştirilmişlerdir. 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve bu sürenin sonunda bakterilerin üreme durumları kontrol edilmiştir. Yapılan bu testin sonucunda petrilerin ortasında bulunan disklerin çevresinde bulunan şeffaf zon test mikroorganizmalarının *rfa* mutasyonu taşıdığı bir kanıtıdır (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

3.2.2. Kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının belirlenmesi

Kültürlerin canlandırılması sırasında spontan olarak meydana gelen mutasyonlar kültür içindeki oksotrof formda olan bakterileri prototrof forma çevirebilmektedir. Bu nedenle

çalışma sonuçlarında herhangi bir sapmanın meydana gelmesini önlemek için kendiliğinden geri dönen koloni sayılarının saptanması gerekmektedir. Bu kontrol amaçlı çalışmada Ames/*Salmonella* testi için, 45°C sıcaklığında 2 ml eritilmiş histidin/biyotin çözeltili top agar içeren deney tüplerinin her birine gecelik bakteri kültürlerinden (O.D.540-0,1-0,2) 100 µl ilave edilir ve iyice karıştırıldıktan sonra MGA besiyerli petrilere dökülür, petri yüzeyine iyice yayılması sağlanır ve 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılır. WP2 testi için ise 45°C sıcaklığında 2 ml eritilmiş triptofan çözeltili top agar içeren deney tüplerinin her birine gecelik bakteri kültürlerinden (O.D.540-0,1-0,2) 100 µl ilave edilir ve iyice karıştırıldıktan sonra MGA besiyerli petrilere dökülür, petri yüzeyine iyice yayılması sağlanır ve 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan koloniler sayılarak kendiliğinden geri dönen koloni sayıları belirlenmiş olur (Mortelmans and Riccio 2000; Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

3.2.3. Pozitif mutajenlerin ve test materyallerinin uygulama konsantrasyonlarının belirlenmesi

Bu çalışmada *E. coli* WP2*uvrA* mutant bakteri suşu için MNNG, *S. typhimurium* TA1535 mutant bakteri suşu için NaN₃, *S. typhimurium* TA1537 mutant bakteri suşu için ise 9-AA maddesi pozitif mutajen olarak kullanılmıştır. Yapılan mutajenite deneylerinden elde edilecek sonuçların sağlıklı değerlendirilebilmesi için pozitif mutajen uygulamalarından 48 saat sonra petrilere 300-700 geri dönen koloni gözlenmesi gerekmektedir. Bu sonuçları sağlamak için çeşitli pozitif mutajen çözeltileri hazırlanmış ve üzerlerine test mikroorganizmaları uygulanmıştır. Bu çalışmada ames testi için 45°C sıcaklığında 2 ml eritilmiş histidin/biyotin çözeltili top agar kullanılırken WP2 testinde 45°C sıcaklığında 2 ml eritilmiş triptofan çözeltili top agar kullanılmıştır. 2 ml top agar içeren tüplerin her birine gecelik bakteri kültüründen 100 µl, 50 µl değişik dozlarda hazırlanmış pozitif mutajen madde katılır ve MGA besiyeri içeren petrilere dökülerek iyice yayılması sağlanır. 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılır ve bu sürenin ardından koloni sayılarına bakılarak uygun doz belirlenir.

Ayrıca mutajenite çalışmalarına başlamadan önce boyarmaddelerin belirlenen dozlarının test mikroorganizmaları üzerine etkilerinin gözlenilmesi gerekmektedir. Bu amaçla dozları belirlenen boyarmaddelerin her bir mutant bakteri suşu için sitotoksiste çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda gecelik bakteri kültürleri her bir petriye 1000 bakteri düşecek şekilde dilüe edilmiştir. İçerisinde 45°C sıcaklığında 2 ml eritilmiş histidin/biyotin çözeltili top agar bulunan deney tüplerinin her birine 100 µl gecelik bakteri kültüründen ve dozları belli olan boyar madde çözeltileri eklenir. Bu karışım NA besiyeri petrilere dökülür ve iyice yayılması sağlanır. Bu test sisteminde test materyallerinin uygulandığı petrilere koloni sayılarının yorumlanabilmesi için negatif kontrole ihtiyaç duyulmaktadır. Negatif kontrol gruplarının tek farkı içine test maddesinin eklenmemesidir. NA besiyerlerine ekilen test ve negatif kontrol grupları 37°C'de 48 saat inkübasyona bırakılır ve bu sürenin ardından test grubundaki koloni sayıları negatif gruptaki koloni sayılarıyla karşılaştırılarak sitotoksik etkilerinin olup olmadığı belirlenir. Negatif kontroldeki koloni sayısının %80'inden daha az koloni gelişmesine olanak sağlayan test maddesi konsantrasyonları sitotoksik olarak tanımlanmış ve çalışmalarda kullanılmamıştır (Edenharder and Grünhage 2003; Karadayı 2010).

3.2.4. Test suşlarının saklanması ve gecelik kültürlerin hazırlanması

Test mikroorganizmalarının uzun süre saklanması belli yöntemler uygulanarak -87°C'de dondurulmalarıyla mümkündür. Genetik özellikleri belirlenen test organizmaları NB besiyeri içinde belli oranda çoğaltılırlar. Daha sonra bu bakteri kültürünün içerisine son hacmi %10 olacak şekilde gliserol eklenir, vorteks yardımıyla iyice karışması sağlanır ve 1 ml hacimde bölünerek steril ependorf tüplerine konulur. Bu tüpler -87°C'de uzun süreli olarak saklanırlar.

Esas çalışmada kullanılacak olan gecelik kültürler, -87°C'de saklanan stoklardan NB besiyerine inokülasyon yapılarak 37°C'de 120 rpm hızda 11-14 saat çalkalamalı inkübasyona bırakılarak hazırlanırlar. İnkübasyon süreleri dolan kültürler deney

zamanına kadar karanlıkta ve oda ısısında bekletilirler (Mortelmans and Riccio 2000; Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

3.2.5. Mutajenite deneyleri

S. typhimurium mutant bakteri suşları ile yapılan mutajenite deneylerinde; sırasıyla 100 µl, 80 µl, 60 µl, 40 µl, 20 µl test materyali, pozitif kontrol için kullanılmak üzere 50 µl test suşuna özel mutajen madde, 500 µl SFT, 100 µl gecelik bakteri kültürü 45°C sıcaklığında 2 ml eritilmiş histidin/biyotin çözeltisi top agar içeren deney tüplerine konulmuş iyice karışması sağlanarak MGA besiyeri petrilere yüzeye homojen yayılacak şekilde dökülmüştür. 37°C’de 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda petrileredeki koloni sayıları sayılarak yorumlanmıştır (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010).

Ames/*Salmonella* testi için tanımlanan mutajenite deney protokollerinin tamamı top agar içinde kullanılan histidin/ biyotin çözeltisi yerine triptofan çözeltisi kullanılarak *E. coli* WP2 test sistemi için de uygulanabilir niteliktedir (Mortelmans and Riccio 2000; Karadayı 2010).

Bu çalışmaların negatif kontrolleri test materyalinin yerine aynı miktarda bu materyalin çözücüsünün eklenmesiyle, pozitif kontrolleri ise test materyalinin yerine aynı miktarda kullanılan bakteri suşuna spesifik olan mutajen madde çözeltisinin eklenmesiyle hazırlanmıştır.

3.2.6. Sonuçların değerlendirilmesi

Mutajenite çalışmalarından elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde Mortelmans and Zeiger (2000) tarafından önerilen “standard plate incorporation” yöntemi kullanılmıştır (Mortelmans and Zeiger 2000). Bu çalışmada her bir örneğin mutajenite sonuçları çalışmanın negatif kontrolleri ile kıyaslanarak % mutasyon oranları hesaplanmıştır.

Test materyallerinin her bir dozu için mutajenik indeks; deney grubunda sayılan koloni sayısı ortalamasının negatif kontroldeki koloni sayısı ortalamasına bölünmesiyle hesaplanmıştır. Buna göre sonuçta deney gruplarında meydana gelen ortalama koloni sayısı negatif kontroldeki ortalama koloni sayısının en az 2 katı ise test materyalleri mutajenik olarak değerlendirilmiştir (Vargas *et al.* 1993; Varella *et al.* 2004; Evandri *et al.* 2005; Santos *et al.* 2008; Gulluce *et al.* 2010; Karadayı 2010).

3.2.7. RAPD-PCR yönteminde kullanılan bitki tohumlarının yüzey sterilizasyonu

Sterilizasyon, mikrobiyal yaşamın tüm formlarının fiziksel ya da kimyasal yöntemler uygulanarak tamamen yok edilmesi işlemidir (Özyurt 2000). Sterilizasyon olayında bitkinin yapısal özellikleri, eksplantın cinsi, çalışmanın amacı, kullanılan maddenin özellikleri ve uygulama süresi gibi çok çeşitli faktörler etkili olduğundan; hangi bitki için hangi yöntemin, hangi maddenin, hangi konsantrasyonda ve ne kadar süreyle uygulanması gerektiği, ancak kapsamlı araştırmalarla ortaya konabilmektedir (Tort 1997). Çalışmada kullanılan mısır tohumlarının yüzey sterilizasyonları Cencki *et al.* (2009) sterilizasyon protokolünde küçük değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Bu protokole göre:

- a) Tohumlar 1 dk boyunca etanol içinde çalkalanır.
- b) Tohumlar 5 dk boyunca %10'luk sodyum hipoklorit(çamaşır suyu) çözeltisiyle muamele edilir.
- c) Üzerinde dezenfektan bulunan tohumlar steril distile su ile 3-4 kez yıkanır.

3.2.8. RAPD-PCR yönteminde kullanılan bitki tohumlarının çimlendirilmesi

Önceden steril edilmiş ve cam petri boyutuna uygun kesilmiş kurutma kağıtları steril cam petrilere yerleştirilmiştir. Daha sonra steril edilen mısır tohumları her petriye 10'ar tane yerleştirilerek 5 doz halinde hazırlanmış olan boyarmadde çözeltileri uygulanmış ve 5 gün boyunca çimlenmeye bırakılmıştır. Bu çimlenme süresi içerisinde petriler düzenli olarak kontrol edilerek su seviyesinin stabilitesi sağlanmıştır.

3.2.9. RAPD-PCR yönteminde kullanılan bitki köklerinin DNA izolasyonu

PCR tekniğinin uygulanabilmesi uygun miktar ve kalitede DNA'nın izole edilmesiyle mümkün olmaktadır. Ancak yüksek polisakkarit içeriğine sahip bitki türlerinde kaliteli DNA elde edilmesi oldukça zor olduğundan dolayı protokoldeki bütün basamaklar titizlikle takip edilmelidir. Bitkilerin DNA izolasyonu protokolü olarak Barış (2004) esas alınmıştır. Elde edilen DNA'ların kalitesi spektrofotometre ölçümleriyle belirlenmiştir. Buna göre 2 µl DNA solüsyonu 998 µl Tris-EDTA solüsyonuyla karıştırılarak spektrofotometrede O.D.260 ve O.D.280 ölçümleri yapılmıştır. DNA ölçümlerinin O.D.260/O.D.280 oranınının 1,2-1,8 arasında çıkması DNA'nın maksimum saflıkta olduğunu ifade etmektedir. Bu işleme ek olarak DNA'ların saflığı etidyum bromid varlığında agaroz jel elektroforezinde de incelenmiştir (Barış 2004).

3.2.10. Bitki köklerinden elde edilen DNA'ların RAPD-PCR Analizleri

Beş farklı primer kullanılarak yapılan RAPD uygulamalarında kullanılan her bir kimyasal ve fiziksel işlemler Cenkci *et al.* (2009)'un metodu baz alınarak optimize edilmiştir. Çalışmada kontaminasyonu en aza indirmek için steril ekipmanlar kullanılmıştır. Her bir primer için içerisinde DNA örneği bulundurmayan bir kontrol grubu kullanılmıştır.

3.2.10.a. RAPD-PCR bileşenleri ve koşulları

RAPD-PCR çalışması her bir örnek için 19 µl reaksiyon hacmiyle gerçekleştirilmiştir.

PCR reaksiyon bileşenleri;

- ddH₂O : 13 µl
- 10X PCR Buffer without MgCl₂ : 1 µl
- MgCl₂ : 2 µl

- dNTPs : 0,5 µl
- Taq DNA polimeraz : 0,5 µl
- Primer : 1 µl

RAPD-PCR döngü koşulları 40 döngü olacak şekilde termal döngü cihazında yapılmıştır.

- Ön denatürasyon 94°C'de 3dk
 - Denatürasyon 94°C'de 1dk
 - Bağlanma 38°C'de 1dk
 - Uzama 72°C'de 1,5dk
 - Sonlanma 72°C'de 7dk
- 40 döngü

3.2.10.b. RAPD-PCR analizinde kullanılan primerlerin hazırlanması

Kullanılan primerler firmanın önerdiği miktarda sulandırılmış ve bunlar stok solüsyon olarak kullanılmıştır. Çalışma solüsyonları ise stok solüsyonundan 25µl alınıp 475 µl su ile karıştırılarak elde edilmiştir.

3.2.10.c. RAPD-PCR ürünlerinin görüntülenmesi

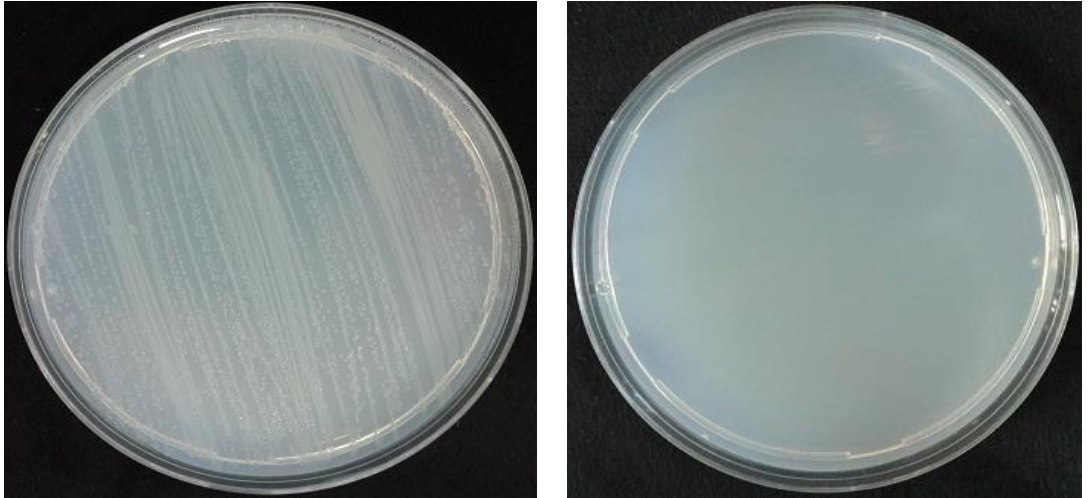
PCR ürünlerinin görüntülenmesinde QIAXCEL Advanced cihazından yararlanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Mutajenite Araştırmalarında Kullanılan Mutant Bakterilerin Genetik Özelliklerinin Kontrolü

4.1.1. Histidin/Biyotin gereksinimi

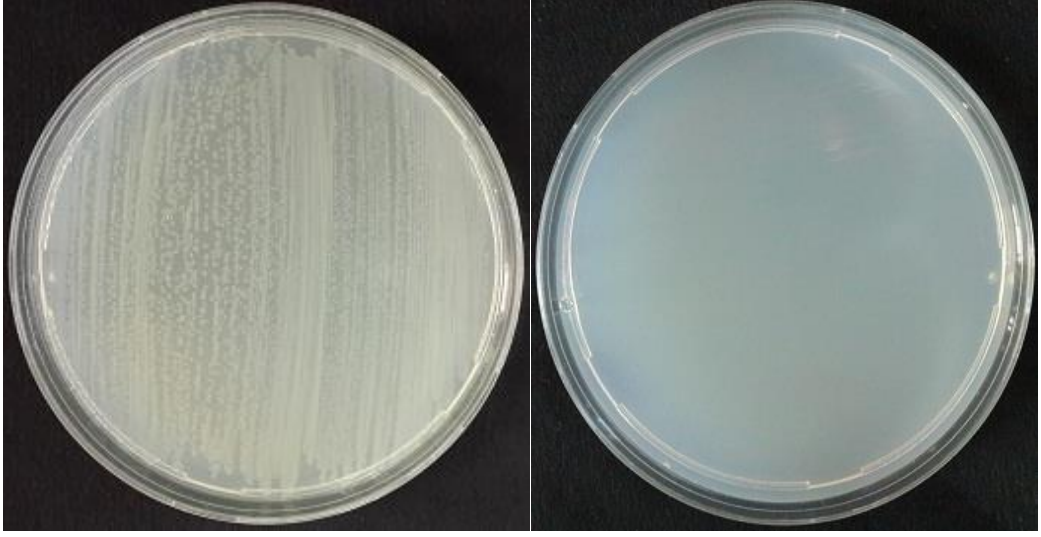
S. typhimurium TA1535 ve TA1537 bakteri suşları kullanılarak histidinli, biyotinli, histidin/biyotinli ve hem histidinsiz hem de biyotinsiz MGA besiyeri petrilere yapılan ekimler sonucunda test organizmalarının histidin ve biyotin oksotrofu olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarında üreme için histidin/biyotin gereksiniminin gösterilmesi

4.1.2. Triptofan gereksinimi

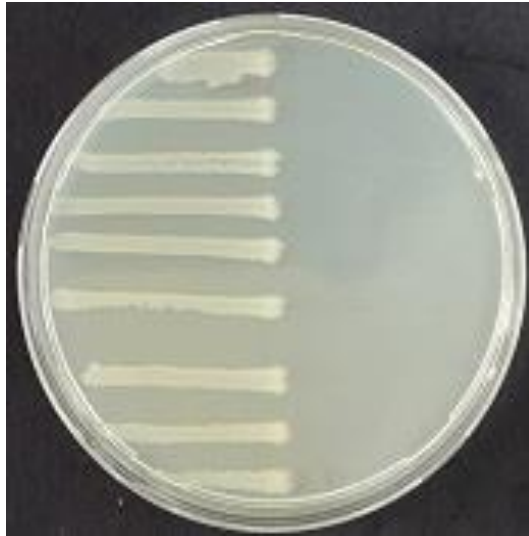
E. coli WP2uvrA bakteri suşları kullanılarak triptofan içeren ve triptofan içermeyen MGA besiyerlerine yapılan ekimler sonucunda test mikroorganizmalarının triptofan oksotrofu olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *E. coli* WP2 $uvrA$ suşunda üreme için triptofan gereksiniminin gösterilmesi

4.1.3. *uvrA* ve *uvrB* mutasyonları

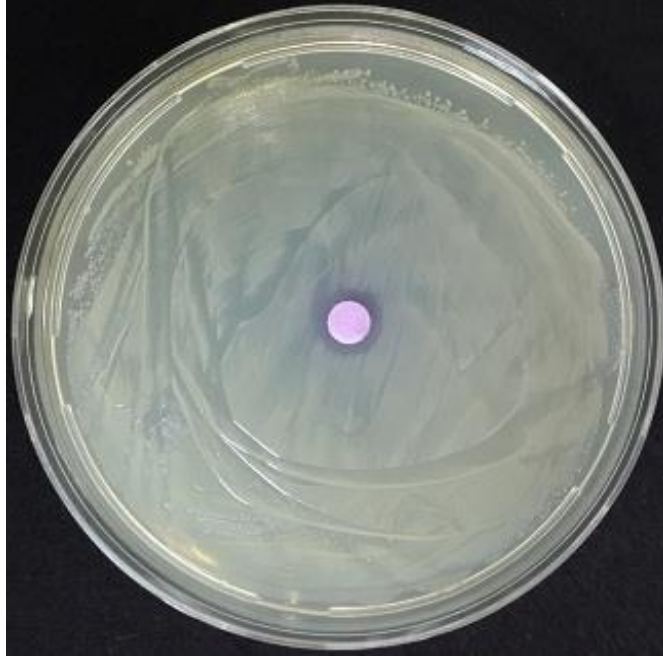
E. coli WP2 ve *S. typhimurium* bakteri suşlarının NA besiyerine ekilip 10 s kadar UV ışınına maruz bırakıldığı deney sonucunda test organizmalarından *E. coli* WP2 bakteri suşlarının *uvrA* ve *S. typhimurium* bakteri suşlarının *uvrB* mutasyonlarına sahip oldukları gösterilmiştir (Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Test suşlarının *uvrA* ve *uvrB* mutasyonlarını taşıdıklarının gösterilmesi

4.1.4. *rfa* mutasyonu

S. typhimurium TA1535 ve TA1537 bakteri suşları kullanılarak NA besiyerlerine yapılan ekimler sonucunda test organizmalarının *rfa* mutasyonuna sahip oldukları gösterilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 suşlarında *rfa* mutasyonunun gösterilmesi

4.2. Kendiliğinden Geri Dönen Koloni Sayılarının Belirlenmesi

Spontan mutasyonlardan kaynaklanan kendiliğinden geri dönen koloni sayıları her bir test suşu için belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Mutant bakteri suşlarının kendiliğinden geriye dönen koloni sayıları

Mutant Bakteri Suşu	Kendiliğinden Geriye Dönen Koloni Sayısı (Ortalama \pm S.D.)
<i>E. coli</i> WP2uvrA	8,5 \pm 2,42
<i>S. typhimurium</i> TA1535	22,5 \pm 1,87
<i>S. typhimurium</i> TA1537	6,83 \pm 2,31

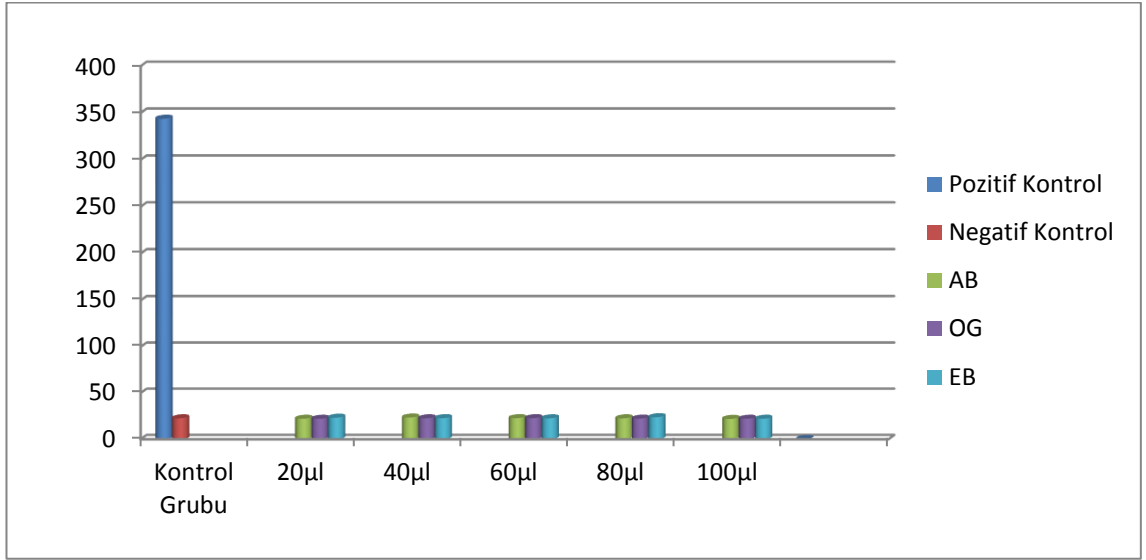
4.3. Pozitif Mutajenlerin ve Test Materyallerinin Uygulama Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Pozitif mutajenlerin en iyi sonuç verdiği dozu saptayabilmek için yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda uygulama konsantrasyonları MNNG, sodyum azid ve 9-AA için sırasıyla 1 μ g/petri, 1 μ g/petri ve 40 μ g/petri olarak belirlenmiştir.

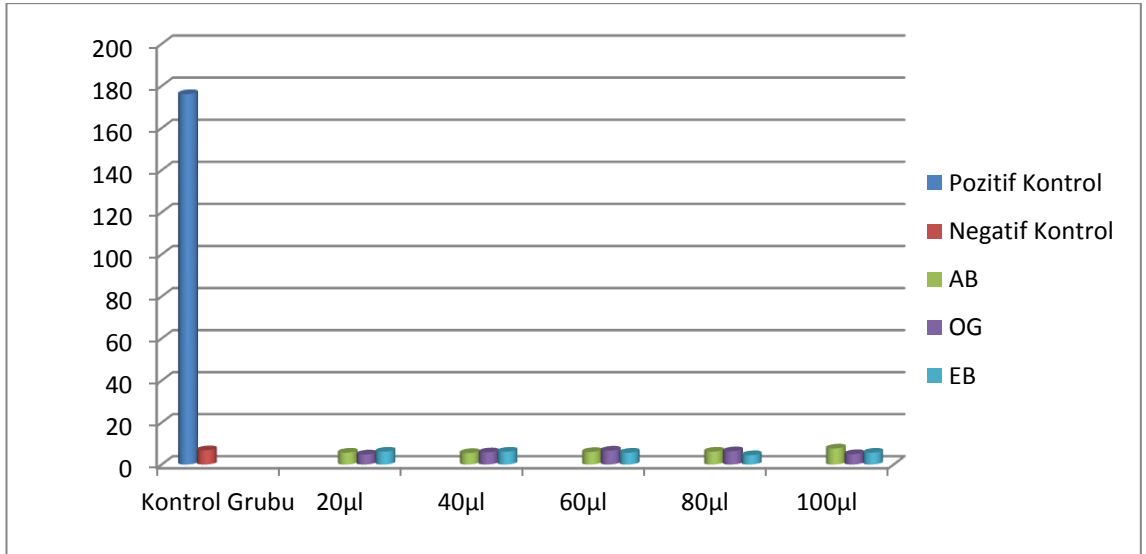
Test maddelerinin önceden belirlenen dozlarının sitotoksik etkilerinin bulunmadığı belirlenmiştir.

4.4. Boyarmadde Çözeltilerinin Mutajenik Özellikleri

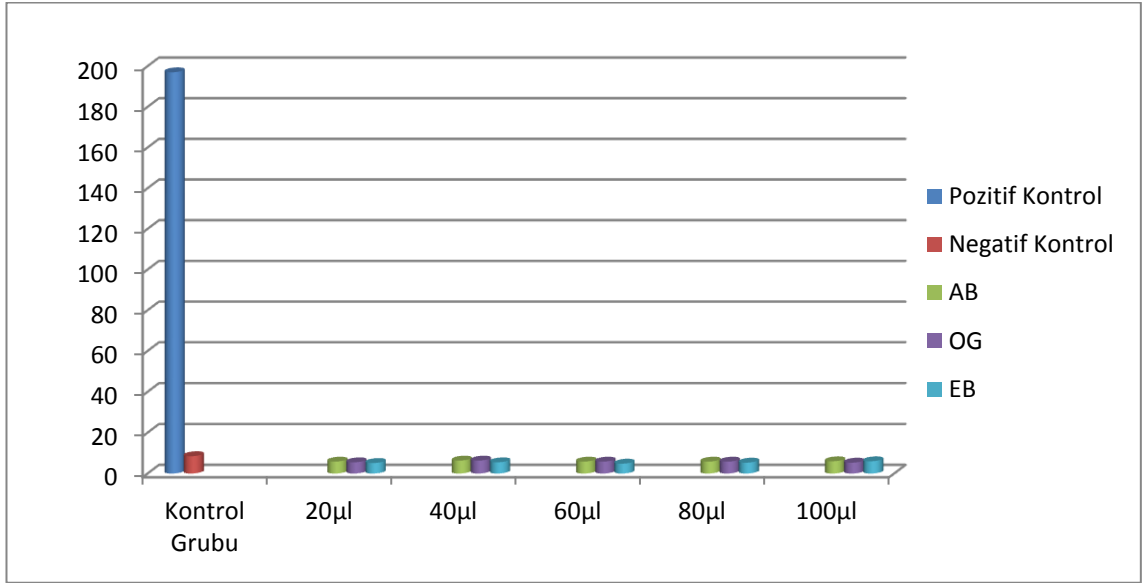
AB, OG ve EB boyarmaddeleri ile yapılan Ames/*Salmonella* ve *E. coli* WP2 testlerinin hiçbirinde uygulanan dozlarda mutajenik etki gözlemlenmemiştir.



Şekil 4.5. AB, OG ve EB boyarmaddelerinin *S. typhimurium* TA1535 bakteri suşu üzerine olan mutajenik etkileri (Pozitif kontrol: 1 µg/petri NaN₃ ve Negatif kontrol: 50 µl/petri DMSO).

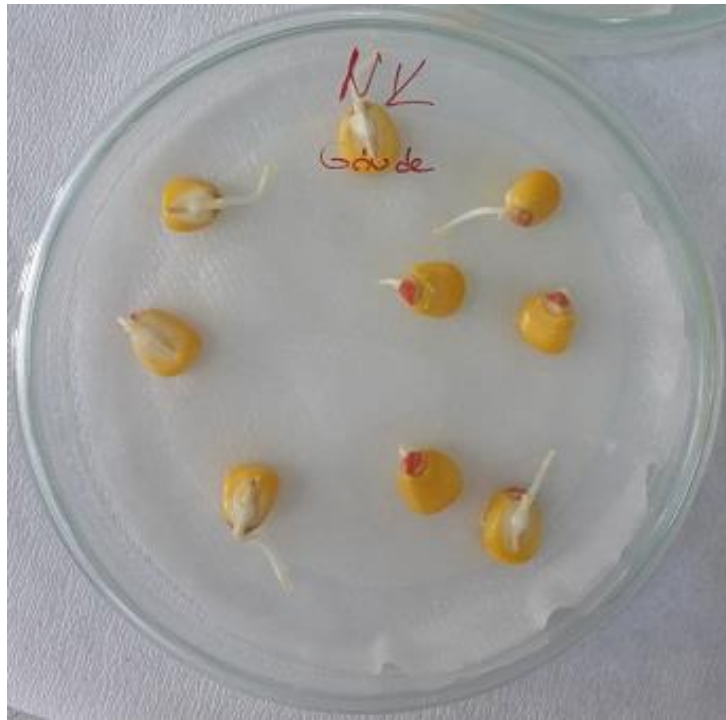


Şekil 4.6. AB, OG ve EB boyarmaddelerinin *S. typhimurium* TA1537 bakteri suşu üzerine olan mutajenik etkileri (Pozitif kontrol: 1 µg/petri NaN₃ ve Negatif kontrol: 50 µl/petri DMSO).

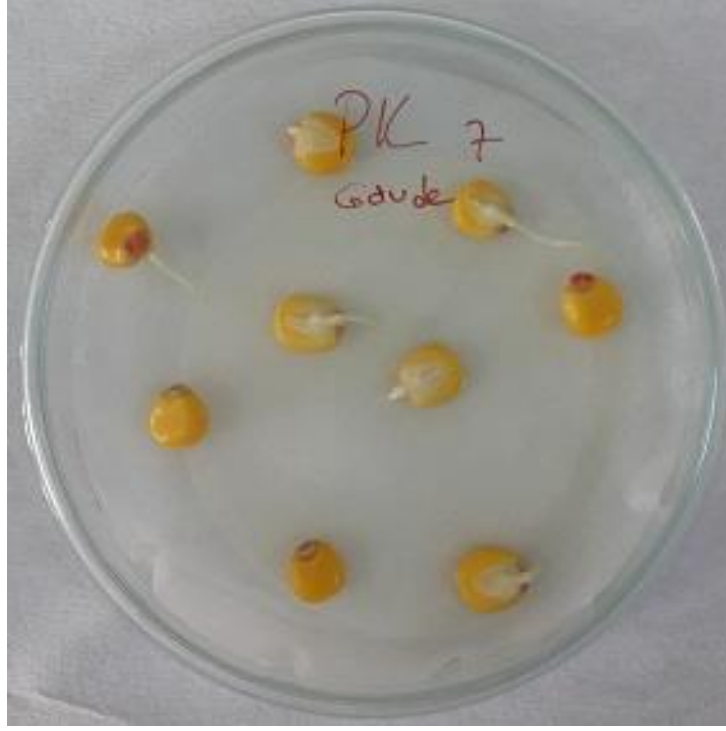


Şekil 4.7. AB, OG ve EB boyarmaddelerinin *E. coli* WP2uvrA bakteri suşu üzerine olan mutajenik etkileri (Pozitif kontrol: 1 µg/petri NaN₃ ve Negatif kontrol: 50 µl/petri DMSO).

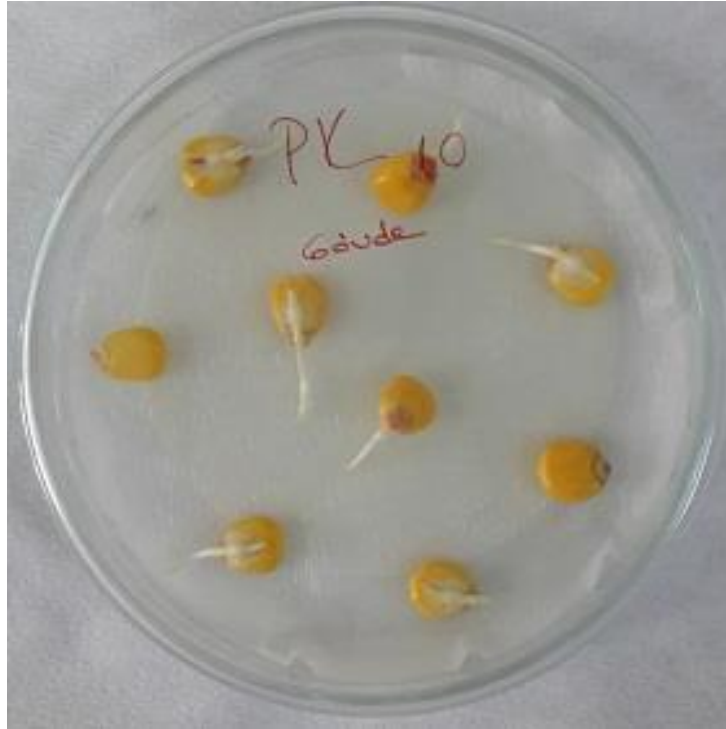
4.5. Boyarmaddelerin Çimlenme Üzerine Etkileri



Şekil 4.8. Mısır tohumlarının negatif kontrolü (1 günlük)



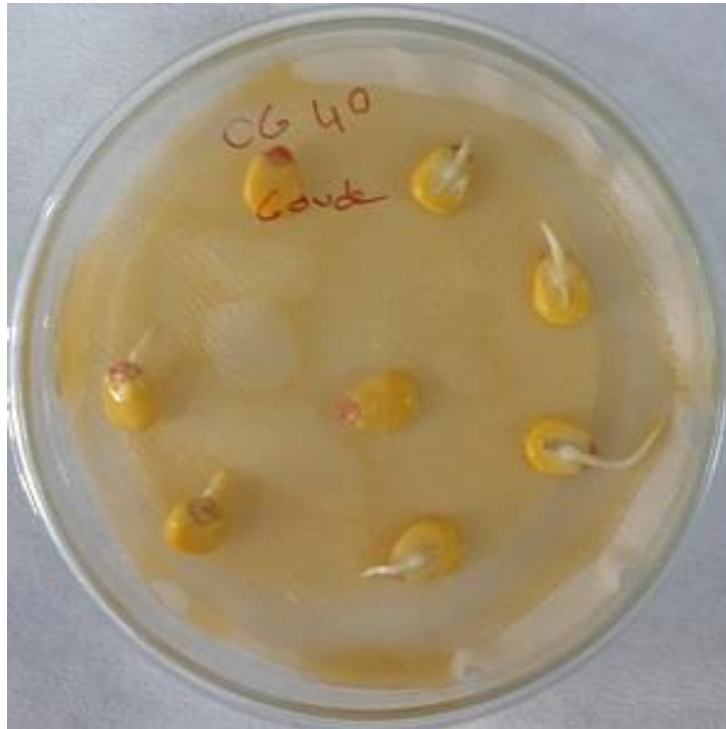
Şekil 4.9. Mısır tohumlarının pozitif kontrolü 1 (1 günlük)



Şekil 4.10. Mısır tohumlarının pozitif kontrolü 2 (1 günlük)



Şekil 4.11. OG'ye maruz kalmış mısır tohumları 1 (1 günlük)



Şekil 4.12. OG'ye maruz kalmış mısır tohumları 2 (1 günlük)



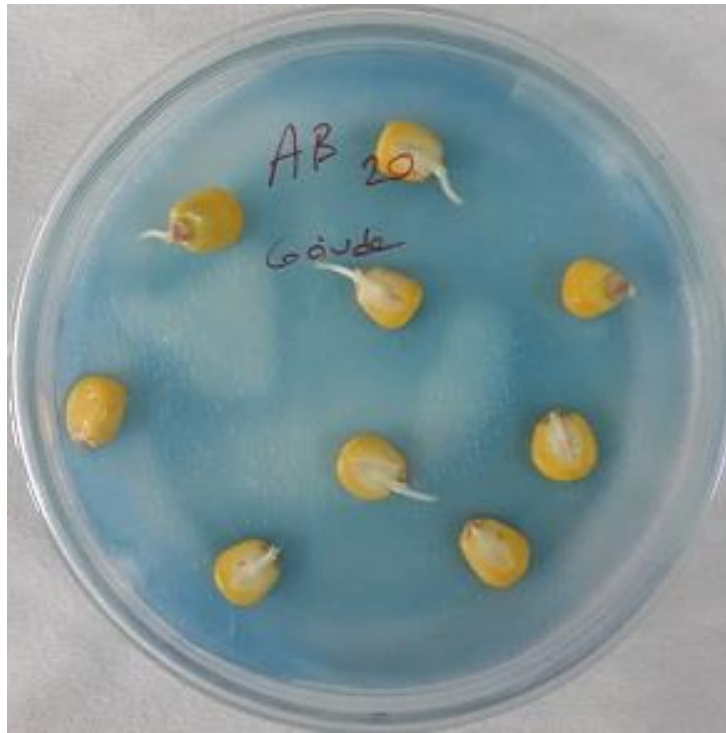
Şekil 4.13. OG'ye maruz kalmış mısır tohumları 3 (1 günlük)



Şekil 4.14. OG'ye maruz kalmış mısır tohumları 4 (1 günlük)



Şekil 4.15. OG'ye maruz kalmış mısır tohumları 5 (1 günlük)



Şekil 4.16. AB'ye maruz kalmış mısır tohumları 1 (1 günlük)



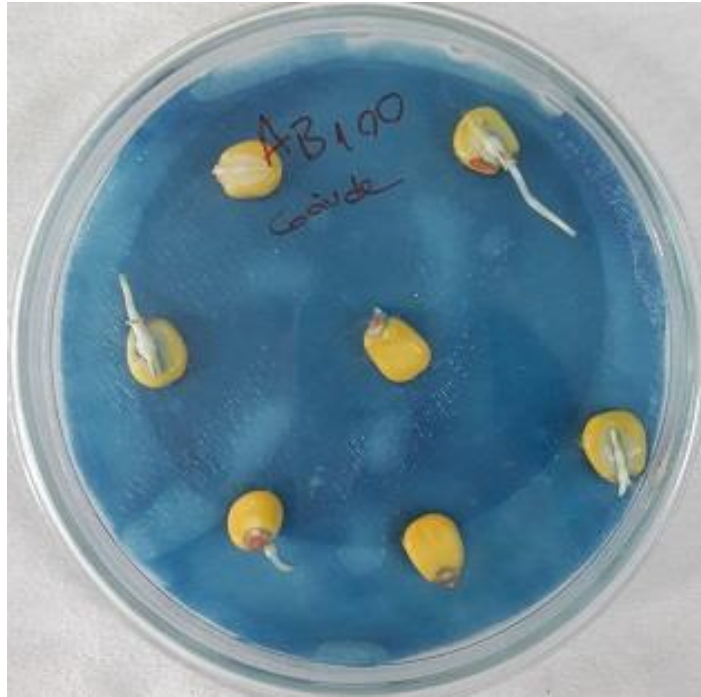
Şekil 4.17. AB'ye maruz kalmış mısır tohumları 2 (1 günlük)



Şekil 4.18. AB'ye maruz kalmış mısır tohumları 3 (1 günlük)



Şekil 4.19. AB'ye maruz kalmış mısır tohumları 4 (1 günlük)



Şekil 4.20. AB'ye maruz kalmış mısır tohumları 5 (1 günlük)



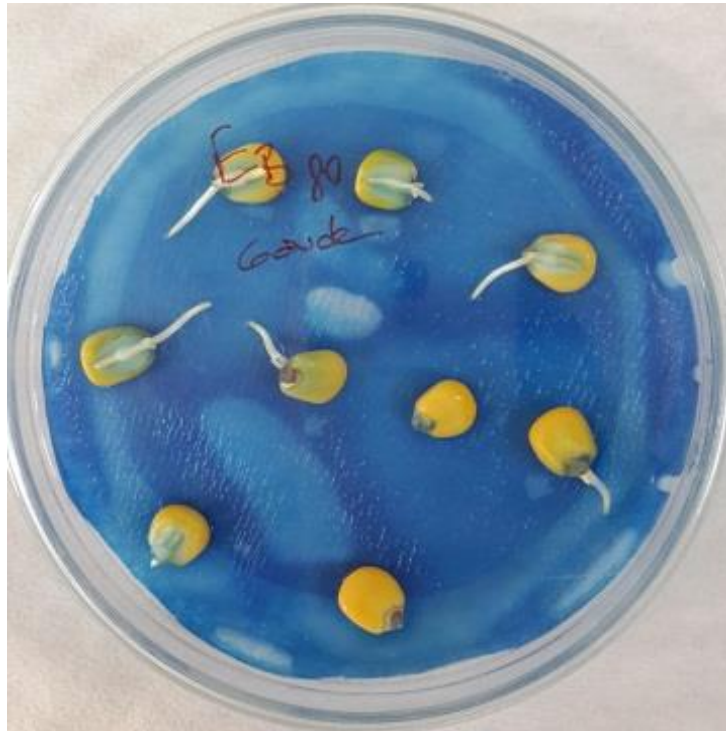
Şekil 4.21. EB'ye maruz kalmış mısır tohumları 1 (1 günlük)



Şekil 4.22. EB'ye maruz kalmış mısır tohumları 2 (1 günlük)



Şekil 4.23. EB'ye maruz kalmış mısır tohumları 3 (1 günlük)



Şekil 4.24. EB'ye maruz kalmış mısır tohumları 4 (1 günlük)



Şekil 4.25. EB'ye maruz kalmış mısır tohumları 5 (1 günlük)



Şekil 4.26. Mısır tohumlarının negatif kontrolü (5 günlük)



Şekil 4.27. Mısır tohumlarının pozitif kontrolü 1 (5 günlük)



Şekil 4.28. Mısır tohumlarının pozitif kontrolü 2 (5 günlük)



Şekil 4.29. OG'ye maruz kalmış mısır tohumları 1 (5 günlük)



Şekil 4.30. OG'ye maruz kalmış mısır tohumları 2 (5 günlük)



Şekil 4.31. OG'ye maruz kalmış mısır tohumları 3 (5 günlük)



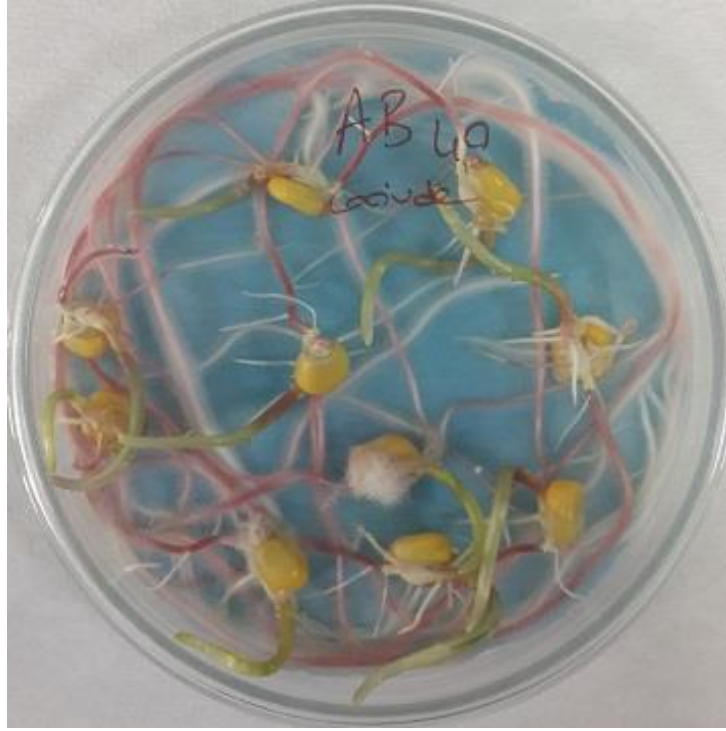
Şekil 4.32. OG'ye maruz kalmış mısır tohumları 4 (5 günlük)



Şekil 4.33. OG'ye maruz kalmış mısır tohumları 5 (5 günlük)



Şekil 4.34. AB'ye maruz kalmış mısır tohumları 1 (5 günlük)



Şekil 4.35. AB'ye maruz kalmış mısır tohumları 2 (5 günlük)



Şekil 4.36. AB'ye maruz kalmış mısır tohumları 3 (5 günlük)



Şekil 4.37. AB'ye maruz kalmış mısır tohumları 4 (5 günlük)



Şekil 4.38. AB'ye maruz kalmış mısır tohumları 5 (5 günlük)



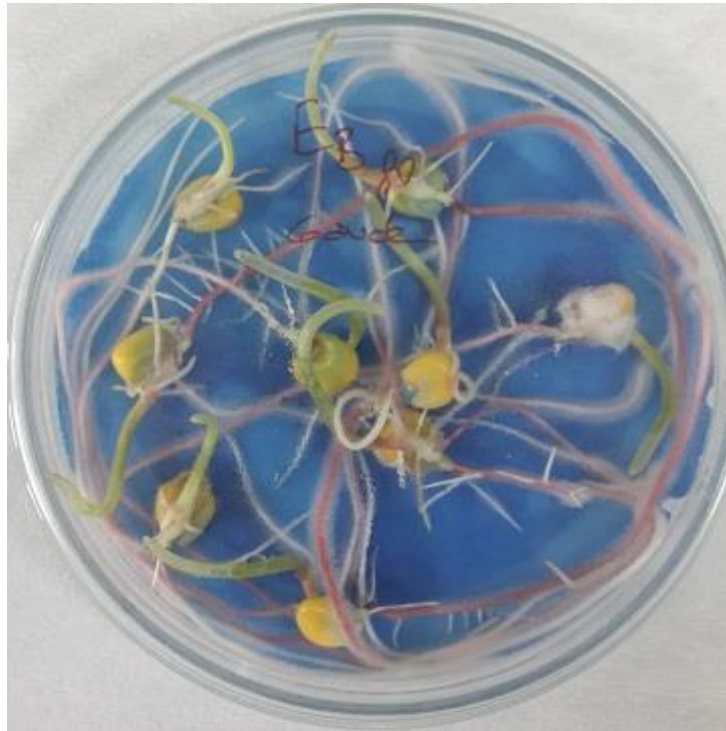
Şekil 4.39. EB'ye maruz kalmış mısır tohumları 1 (5 günlük)



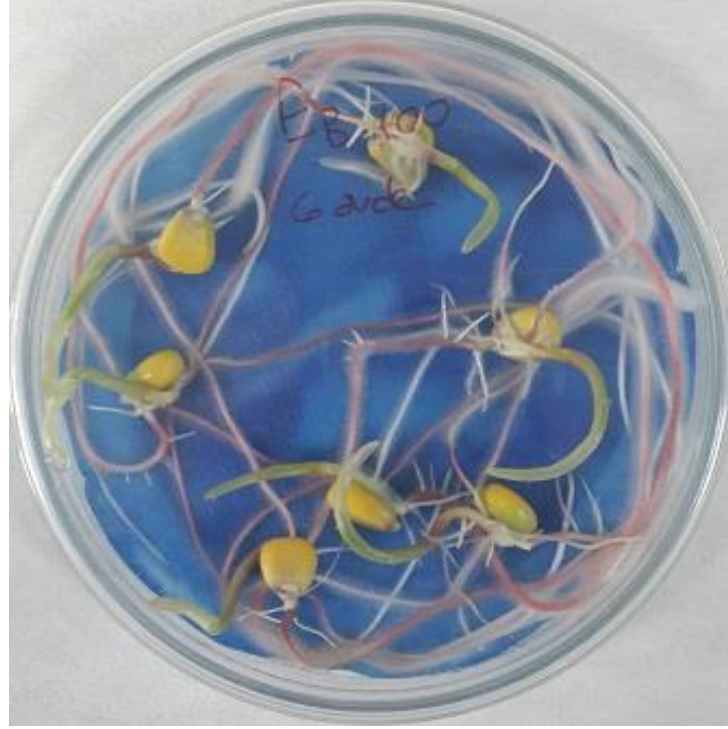
Şekil 4.40. EB'ye maruz kalmış mısır tohumları 2 (5 günlük)



Şekil 4.41. EB'ye maruz kalmış mısır tohumları 3 (5 günlük)

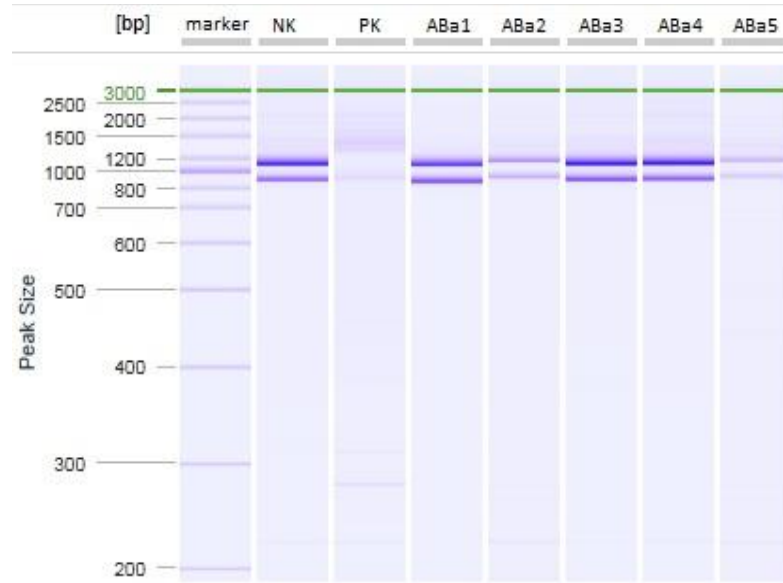


Şekil 4.42. EB'ye maruz kalmış mısır tohumları 4 (5 günlük)

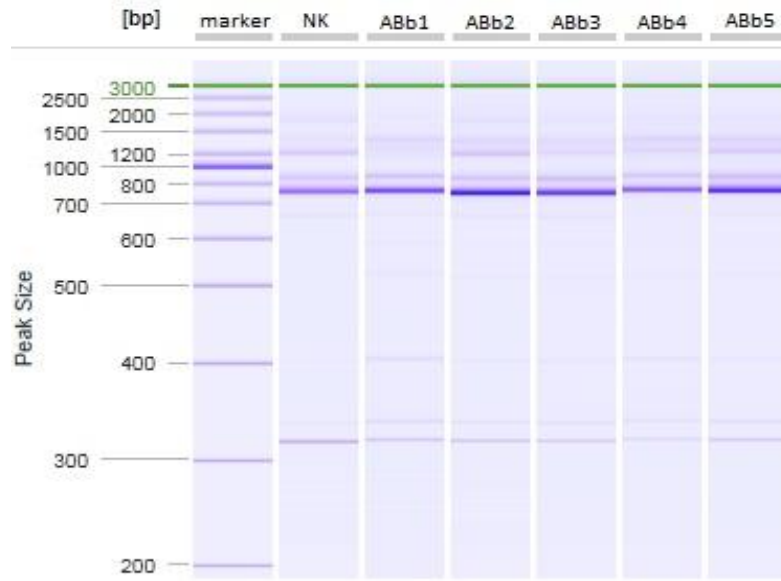


Şekil 4.43. EB'ye maruz kalmış mısır tohumları 5 (5 günlük)

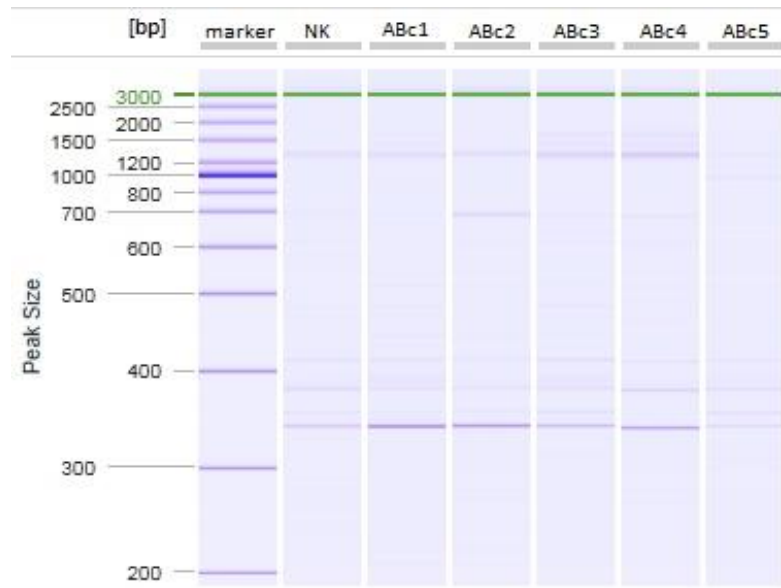
4.6. Boyarmaddelerin RAPD profilleri



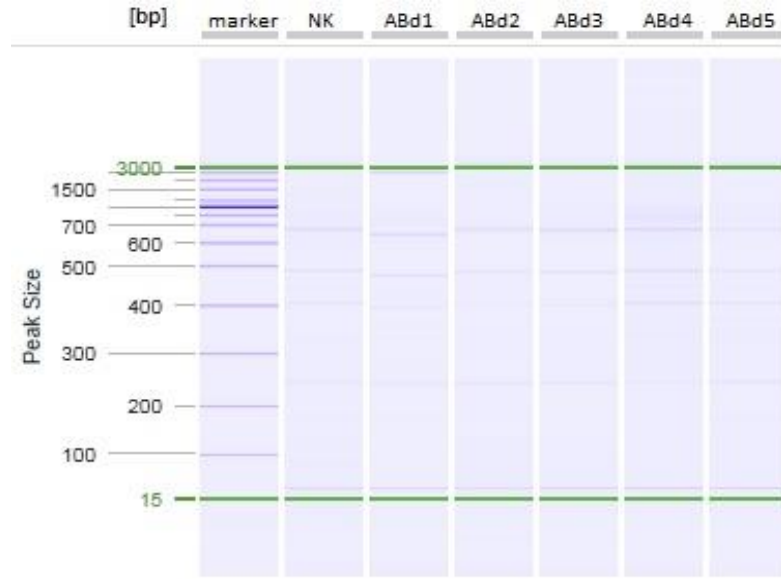
Şekil 4.44. AB boyarmaddesinin OPA2 primeri için RAPD görüntüsü



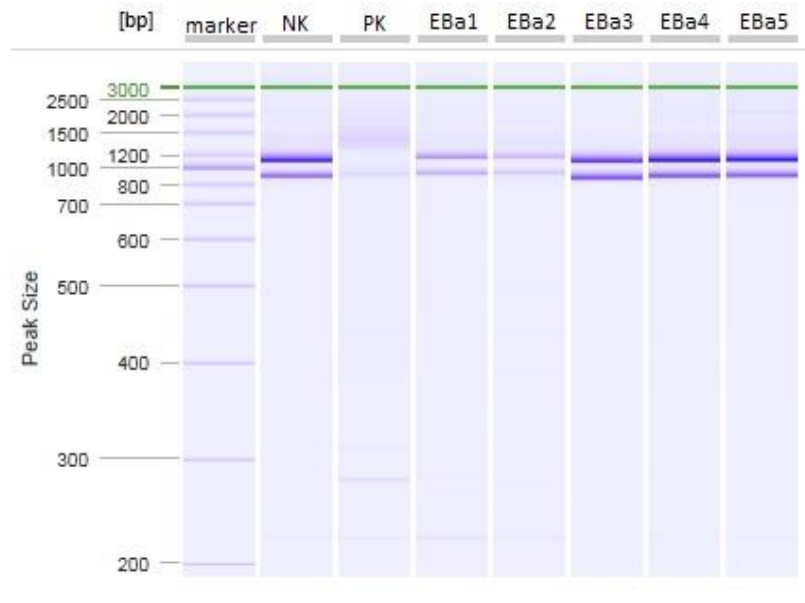
Şekil 4.45. AB boyarmaddesinin OPA3 primeri için RAPD görüntüsü



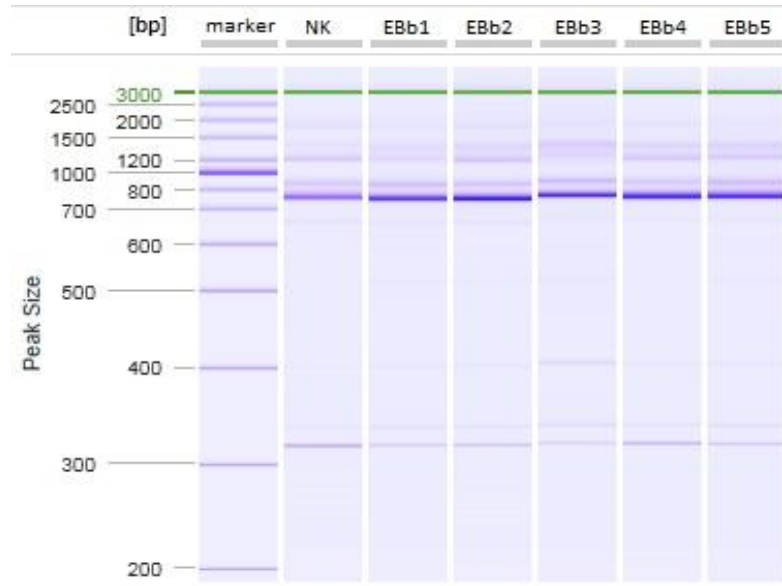
Şekil 4.46. AB boyarmaddesinin OPA6 primeri için RAPD görüntüsü



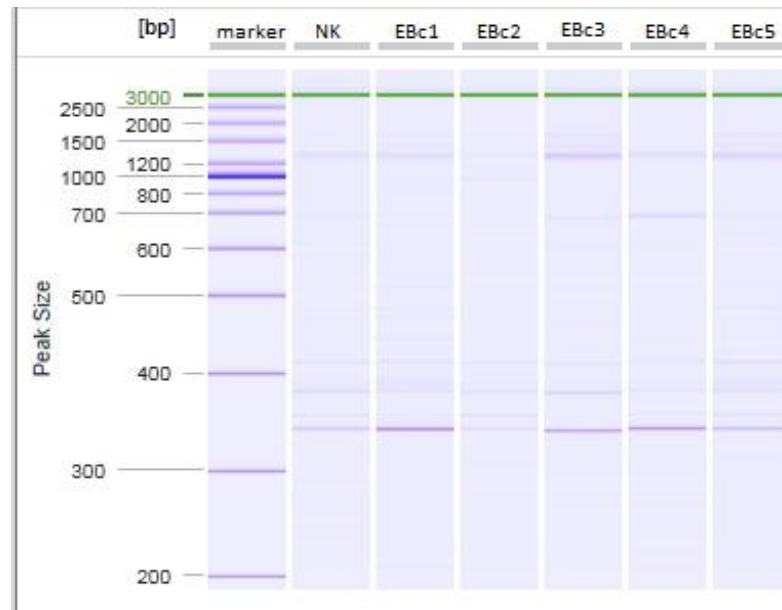
Şekil 4.47. AB boyarmaddesinin OPB4 primeri için RAPD görüntüsü



Şekil 4.48. EB boyarmaddesinin OPA2 primeri için RAPD görüntüsü



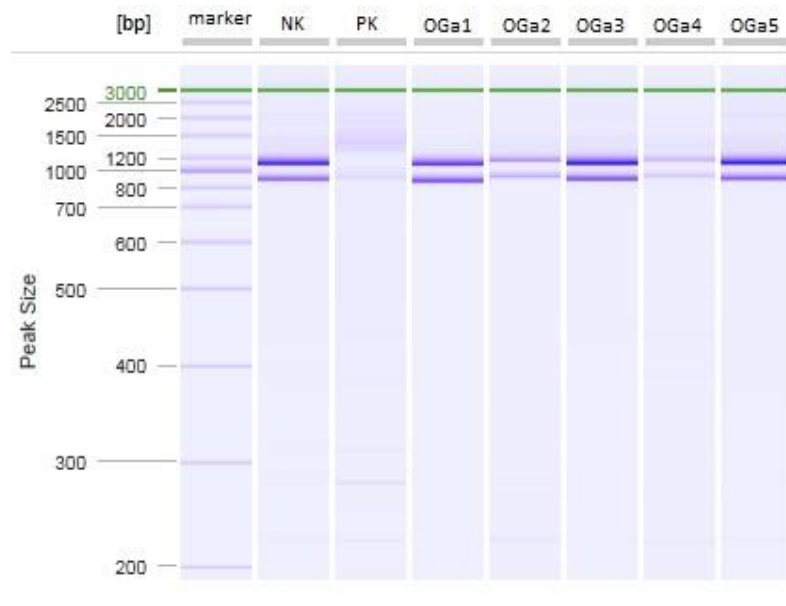
Şekil 4.49. EB boyarmaddesinin OPA3 primeri için RAPD görüntüsü



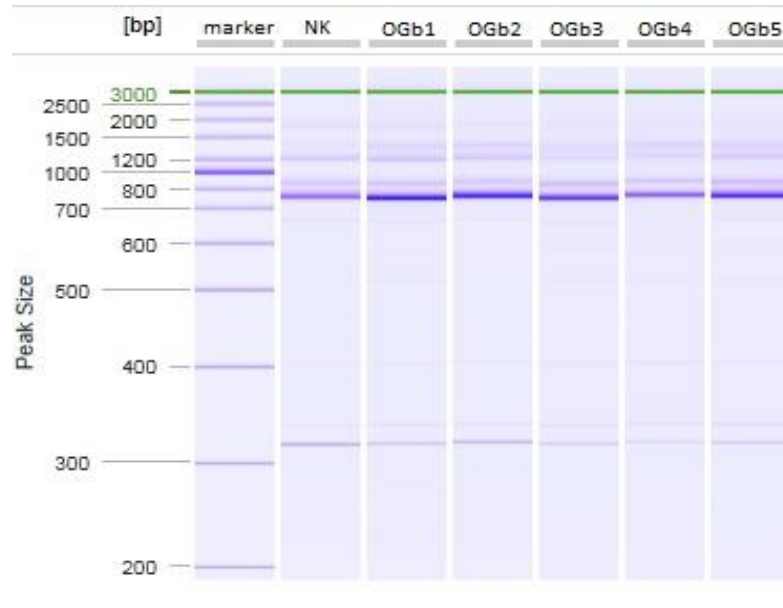
Şekil 4.50. EB boyarmaddesinin OPA6 primeri için RAPD görüntüsü



Şekil 4.51. EB boyarmaddesinin OPB4 primeri için RAPD görüntüsü



Şekil 4.52. OG boyarmaddesinin OPA2 primeri için RAPD görüntüsü



Şekil 4.53. OG boyarmaddesinin OPA3 primeri için RAPD görüntüsü



Şekil 4.54. OG boyarmaddesinin OPA6 primeri için RAPD görüntüsü



Şekil 4.55. OG boyarmaddesinin OPB4 primeri için RAPD görüntüsü

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Azo boyarmaddelerin toksik etkileri, çoğunlukla mutajeniteleri, hem boyarmaddenin kendisinden hemde arilamin ve serbest radikaller gibi metabolitlerinden kaynaklanabilmektedir (Collier *et al.* 1993; Weisburger 1997; Chequer *et al.* 2011). Azo boyarmaddelerinin kimyasal yapısında anilin, naftalen, fenol, nitrobenzen, benzidin ve toluidin gibi mutajenik etki gösterebilme potansiyeli olan maddelerin bulunduğu bilinmektedir (Toker 2005).

Azo boyarmaddeler yapısındaki azo grubunun sayısına göre monoazo, diazo ve poliazo olmak üzere üçe ayrılırlar (Toker 2005; Ertem 2007). Çalışmada kullanılan AB ve EB boyarmaddeleri diazo grubu azo boyarmaddelerin içerisinde yer alırken OG monoazo grubu azo boyarmaddelerin içerisinde yer alır.

Yukarıdaki sebeplere dayanarak daha önce Ames/ *Salmonella*, *E. coli* WP2 ve RAPD analizlerinin yapılmadığı bilinen diazo AB, EB ve monoazo OG boyarmaddeleri bu çalışmada kullanılmıştır.

Çalışmada Ames/*Salmonella* ve *E. coli* WP2 kısa zamanlı testleri; kullanılan test suşlarının model organizmalardan elde edilmeleri, kısa zamanda sonuca ulaştırmaları, birçok kimyasal maddenin mutajenitesinin çalışılmasına olanak sağlamaları, insan vücut sıcaklığıyla aynı sıcaklıkta gelişiyor olmaları bakımından tercih edilmiştir (Ames *et al.* 1973b; Mortelmans and Zeiger 2000; Zeiger *et al.* 2005).

Çalışmada kullanılan bir diğer kısa zamanlı test olan RAPD analizi ise araştırılacak genomun bilgisine ihtiyaç duyulmaması, az DNA konsantrasyonuna ihtiyaç duyulması, ucuz olması ve primer uzunluğunun kısa olması ve G, C miktarının az olması gibi özellikleri bakımından genotoksisite ve mutajenite çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Atienzar and Jha 2006) Ames ve WP2 bakteriyel testlerinin aksine,

test maddelerinin ökaryotik bir genomda nasıl etkiler doğurabileceğini araştırması yönünden önem arz etmektedir.

Çalışmanın ilk aşamasında AB, OG ve EB boyarmadde dozlarını belirlemek için kullanım protokolleri ve literatürde belirtilen en yüksek konsantrasyondan başlayarak uygun çözeltilerin bu referans doza göre hazırlanması tercih edilmiştir (Godlewska *et al.* 2012). Her bir boyarmadde için 10 mg/ml olacak şekilde bir stok çözelti hazırlanmış ve deneylerde bu çözeltini uygun konsantrasyonları uygulanmıştır. Yine en uygun konsantrasyonun belirlenmesi amacıyla hazırlanan stok boya çözeltileri ile *S. typhimurium* TA1535, TA1537 ve *E. coli* WP2uvrA bakteri suşları ve 32T83 kodlu mısır tohumlarının üzerindeki sitotoksiste uygulamaları yapılmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında biyolojik çalışmalarda kullanılan AB, OG ve EB boyarmadde çözeltilerinin *E. coli* WP2uvrA, *S. typhimurium* TA1535 ve TA1537 mutant bakteri suşları üzerine olan mutajenik etkileri araştırılmıştır.

Çalışmada kullanılan bakteri suşlarının histidin veya triptofan operonlarında meydana getirilen mutasyonların tipleri boyarmaddelerin meydana getireceği mutasyonların mekanizmalarını açığa çıkarmak için yardımcı olmaktadır. Buna dayanarak, çalışmamız kapsamında boyarmaddelerin mutajenik özelliklerini belirlemek amacıyla yapılan mutajenite testlerinde *S. typhimurium* TA1535, TA1537 ve *E. coli* WP2uvrA bakteri suşları kullanılmıştır.

S. typhimurium TA1535 bakteri suşu histidin operonunun ilk sırasında yer alan *hisG* gen bölgesinde *HisG46* adı verilen transisyon tipi baz değişimi nokta mutasyonu taşımaktadır (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010; Karadayı *et al.* 2012). Bu bilgiye dayanarak *S. typhimurium* TA1535 bakteri suşu ile yapılan Ames/ *Salmonella* testinde mutajenik özellik gösteren etken maddelerin transisyon tipi baz değişimi mutasyonu meydana getirdiği öngörülmektedir.

S. typhimurium TA1537 bakteri suşu ise *HisC3076* adı verilen ve histidin biosentezinden sorumlu *his C* gen bölgesinde 1 baz eklenmesiyle meydana gelen insersiyon mutasyonu taşımaktadır. Bu olay çerçeve kayması mutasyonu ile sonuçlanmaktadır (Mortelmans and Zeiger 2000; Karadayı 2010; Karadayı *et al.* 2012). Bu bilgiye dayanarak *S. typhimurium* TA1537 bakteri suşu ile yapılan Ames/*Salmonella* testinde mutajenik özellik gösteren etken maddelerin delesyon mutasyonu meydana getirdiği öngörülmektedir.

E. coli WP2*uvrA* bakteri suşu triptofan operonunda bulunan ve triptofan sentezinde önemli role sahip olan *trpE* geninde A=T baz çiftinde transversiyon tipi baz değişimi mutasyonu taşıdığı bilinmektedir. Bu olay triptofan gen bölgesinde ochre mutasyonunun meydana gelmesiyle sonuçlanmaktadır (Mortelmans and Riccio 2000; Karadayı 2010). Bu bilgiye dayanarak *E. coli* WP2*uvrA* bakteri suşu ile yapılan *E. coli* WP2 testinde mutajenik özellik gösteren etken maddelerin baz değişimi nokta mutasyonu meydana getirdiği öngörülmektedir.. Yine bu organizmadaki değişimden etkilenen baz çiftinin *S. typhimurium* TA1535'tekinden (G=C) farklı olması (A=T), bu test sistemine oksidatif strese yol açan mutajenleri de belirleme özelliğini kazandırmaktadır.

Çalışmanın üçüncü aşamasında RAPD-PCR analizi için temin edilen izogenik mısır tohumları AB, OG ve EB boyarmaddelerine maruz bırakılarak çimlenmesi sağlanmıştır. Çimlenen mısırların köklerinden DNA izole edilerek RAPD-PCR analizi uygulanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde bazı yan bant profillerinin ortaya çıktığı, ancak bu oluşumların istatistiksel olarak değerli olmadığı ve herbir primere ait temel bant profillerinin sabit kaldığı gözlemlenmiştir.

Azo boyarmaddelerin mutajenitesinin ya boyanın kendisinden ya da boyarmaddenin yapısında bulunan metabolitlerinden kaynaklandığı yukarıda belirtilmiştir. Çok güçlü bağ yapılarına sahip olan azo boyarmaddeler kolay kolay kendilerini oluşturan kimyasallara parçalanamazlar ve bu özellik onlara yıkama, sıcaklık ve ışık gibi etkilere karşı daha stabil özellik kazandırır. Ekici *et al.* (2001) bazı azo boyarmaddelerin

metabolitlerinin stabilitesi hakkında çalışmalar yapmıştır. Yapılan çalışmalarda hem aktif çamur hem de içerisinde sadece su bulunan 2 sistem hazırlanmış ve sonuç olarak akuatik sistemde boyarmadde metabolitlerinin stabilitesi yüksek çıkmıştır.

Sonuç olarak;

1. Boyarmaddelerin yapılan sitotoksikite çalışmalarının sonucunda uygulama konsantrasyonlarının sitotoksik etkilerinin olmadığı belirlenmiştir.
2. *S. typhimurium* TA 1535 ve TA 1537 suşlarıyla yapılan Ames/*Salmonella* kısa zamanlı test sisteminin sonucunda uygulanan boyarmadde konsantrasyonlarının mutajenik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Test suşlarının oluşturdukları mutasyon çeşitlerine dayanarak araştırılması yapılan boyarmaddelerin baz değişimi nokta mutasyonuna ve delesyona yol açmadığını söylenebilir.
3. *E. coli* WP2 $uvrA$ bakteri suşu ile yapılan *E. coli* WP2 kısa zamanlı test sisteminin sonucunda Ames testini destekler nitelikte sonuçlar elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara ve test organizmasının oluşturduğu mutasyon çeşidine dayanarak araştırılması yapılan boyarmaddelerin oksidatif stres yoluyla mutasyona neden olmadığı şeklinde açıklanabilir.
4. Ökaryotik bir organizma olan mısırın köklerinden elde edilen DNA ile yapılan RAPD analizi sonucunda elde edilen bant profillerinde sapmalar olmadığı belirlenmiş ve prokaryot organizmalarla yapılan Ames/*Salmonella* ve *E. coli* WP2 test sistemleriyle paralel sonuçlar elde edilmiştir.
5. Uygulama konsantrasyonları mısır tohumları üzerine uygulanarak çimlenmeye olan etkileri incelenmiş ve çimlenmeyi olumsuz etkileyen bir durumla karşılaşılmamıştır.
6. Uygulanılan kısa zamanlı test sistemlerinin mevcut literatürlerde kimyasal ve mutajen madde çalışmada en iyi sonuçlar veren metodlar olduğu bilindiği için bu boyarmaddelerin çalışılmasında kullanılmaları en uygun metodlar olarak düşünülmüştür.
7. Bu çalışmada kullanılan kısa zamanlı test sistemlerinin tamamen steril maddeler üzerinde yapıyor olması, kullanılan boyarmaddelerin yapısını tehdit edici herhangi bir unsurun bulunmaması, kullanılan boyarmaddelerin sadece su ile çözülmüş olması

onların yapılarında bulunan kimyasalların ayrılmasını engellemiştir. Bu sebepten dolayı kullanılan boyarmaddelerin kendi başına mutajenik etki yapmadığı belirlenmiştir.

8. Biyolojik çalışmalarda kullanılan bu boyarmaddelerin uygulama konsantrasyonlarının üç kısa zamanlı test sisteminde sonuçlarının mutajenik etkiye sahip olmadığı bulunmasıyla bu boyarmaddelerin kullanılmasında toksisite ve mutajenite açısından herhangi bir sakınca görülmediği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abrahart, E.N., 1977. Dyes and their intermediates. Chemical Publishing, 265 s, New York.
- Ahmad, A.A. and Hameed, B.H., 2010. Fixed-bed adsorption of reactive azo dye onto granular activated carbon prepared from waste. *Journal of Hazardous Materials*, 175 (2010), 298–303.
- Akın, A., 1990. Bazı gıda katkı maddelerinin *Salmonella*/mikrozom test sistemi ile mutajenik etkilerinin saptanması. Bilim Uzmanlığı Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Aksu, Z. 2005. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry*, 40, 997–1026.
- Albanesi, T., Polani, S., Cozzi, R. and Perticone, P., 1999. DNA strand methylation and sister chromatid exchanges in mammalian cells *in vitro*. *Mutation Research*, 429, 239-248.
- Alekperov, U.K., Ames, B.N., Kada, T. and Wattenberg, L.W., 1986. Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis: Report by ICPEMC expert group on antimutagens and desmutagens. *Mutation Research*, 168, 47-65.
- Ali, S., Nisar, N. and Hussain, T., 2007. Dyeing properties of natural dyes extracted from eucalyptus. *TJTI*, 98(6), 559-562.
- Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E. and Lee, F. D., 1973b. Carcinogens are Mutagens: A Simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70 (8), 2281-2285.
- Ames, B. N., Lee, F. D. and Durston, W. E., 1973a. An Improved Bacterial Test System for the Detection and Classification of Mutagens and Carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(3), 782-786.
- Anliker, R., 1977. Colour chemistry and the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1, 211–237.
- Atienzar, F.A. and Jha, A.N., 2006. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. *Mutation Research*, 613 (2006), 76–102.
- Bahçeci, Z., 2007. Moleküler Biyoloji. Göktuğ Basın Yayın Dağıtım ve Pazarlama, 323 s, Amasya.
- Barış, A., 2007. Farklı Tipteki Pestisitlerin Muhtemel Mutajenitelerinin Ames/*Salmonella*/Mikrozom Test Yöntemiyle Araştırılması. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon.
- Barış, Ö., 2004. Doğu Anadolu Bölgesinde Yetişen Bazı *Salvia* Türlerinin Biyolojik Aktivite ve Genetik Profillerinin Belirlenmesi. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Brennan, R.J. and Schiestl, R.H., 2004. Detecting Carcinogens With the Yeast DEL Assay. *Genetic Recombination: Reviews and Protocols*. Ed: Waldman, A.S., Humana Press Inc., 111-124.

- Brown, M.A., Mitar, D.A. and Whitworth, J.A., 1992. Measurement of plasma Volume in pregnancy. *Clinical Science* 83, 29–34.
- Brown, T.A., 2007. *Genomes 3*. Garland Science Publishing, 713 p, New York, USA.
- Brussee, V., Tardif, F. and Tremblay, J.P., 1997. Muscle fibers of mdx mice are more vulnerable to exercise than those of normal mice. *Neuromuscular Disorders* 7, 487–492.
- Bütüner D.B. ve Kantarcı G., 2006. Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi. *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 35 (2) 149 – 170.
- Cenkci, S., Yıldız, M., Ciğerci, İ.H., Konuk, M. and Bozdağ, A., 2009. Toxic chemicals-induced genotoxicity detected by random amplified polymorphic DNA (RAPD) in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings). *Chemosphere*, 76, 900–906.
- Chequer, F.M.D., Lizier, T.M., Felício, R., Zanoni, M.V.B., Deboni, H.M., Lopes, N.P., Marcos, R. and Oliveira, D.P., 2011. Analyses of the genotoxic and mutagenic potential of the products formed after the biotransformation of the azo dye Disperse Red 1. *Toxicology in Vitro*, 25, 2054–2063.
- Choudhary, G., 1996. Human health perspectives on environmental exposure to benzidine: a review. *Chemosphere*, 32, 267–291.
- Chung, K.T., Hughes, T.J. and Claxton, L.D., 2000. Comparison of the mutagenic specificity induced by four nitro-group-containing aromatic amines in *Salmonella typhimurium* his genes. *Mutation Research*, 465, 165–171.
- Collier, S.W., Storm, J.E. and Bronaugh, R.L., 1993. Reduction of azo dyes during *in vitro* percutaneous absorption. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 118, 73–79.
- Combes, R.D. and Haveland-Smith, R.B., 1982. A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. *Mutation Research*, 98, 101–248.
- Constantin, M., Asmarandei, I., Harabagiu, V., Ghimici, L. and Ascenzi, P., 2013. Removal of anionic dyes from aqueous solutions by an ion-exchanger based on pullulan microspheres. *Gheorghe Fundueanu Carbohydrate Polymers*, 91 (2013), 74– 84.
- Crini, G., 2006. Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review. *Bioresource Technology*, 97(9), 1061–1085.
- Dayıoğlu, H. ve Doğru, Ü., 1997. Genetik. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi No: 842/330/78, 150 s, Erzurum.
- Dean, J., 2003. *The Craft of Natural Dyeing: Glowing Colours from the Plant World*. Search Press, 64 s, New York.
- Demirağ, K. ve Altuğ, T., 1990. İzmir ve çevresinde satılan bazı gıdalardaki sentetik organik boyaların saptanması. *GIDA*, 19, 31-36.
- Demirel, S. ve Zamani, A.G., 2002. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi*, 12 (3), 123-127.
- Denoncourt, J.M., Martyniuk, C.J., Solla, S.R., Balakrishnan, V.K. and Langlois, V.S., 2014. Sediment Contaminated with the Azo Dye Disperse Yellow 7 Alters Cellular Stress- and Androgen-Related Transcription in *Silurana tropicalis* Larvae. *Environmental Science & Technology*, 48, 2952–2961.
- Dilek, B., 2004. Porsuk Nehri'nin Genotoksik Etkisi. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.

- Edenharder, R. and Grünhage, D., 2003. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutation Research*, 540, 1-18.
- Ekici, P., Leupold, G. and Parlar, H., 2001. Degradability of selected azo dye metabolites in activated sludge systems. *Chemosphere*, 44 (4), 721–728.
- Ertan, N. ve Eyduran, F., 1995. The synthesis of some hetarylazopyridone dyes and solvent effects on their absorption spectra. *Dyes and Pigments*, 27(4), 313-320.
- Ertem, J., 2007. Bazı heterosiklik azo boyarmaddelerinin sentezi ve özelliklerinin incelenmesi. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Erturk, F.A., Ay, H., Nardemir, G. and Agar, G., 2012. Molecular determination of genotoxic effects of cobalt and nickel on maize (*Zea mays* L.) by RAPD and protein analyses. *Toxicology and Industrial Health*, 29(7), 662–671.
- Evandri, M.G., Battinelli, L., Daniele, C., Mastrangelo, S., Bolle, P. and Mazzanti G., 2005. The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay. *Food and Chemical Toxicology*, 43, 1381-1387.
- Fenech, M., 1993. The Cytokinesis-Block Micronucleus Technique and Its Application to Genotoxicity Studies in Human Populations. *Environmental Health Perspectives Supplements*, 101 (3), 101-107.
- Gajera, H.P., Domadiya, R.K., Patel, S.V. and Golakiya, B.A., 2014. Appraisal of RAPD and ISSR markers for genetic diversity analysis among cowpea (*Vigna unguiculata* L.) genotypes, *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 17(2), 79-88.
- Godlewska, E.Z., Przystas, W. and Sota, E.G., 2012. Decolorization of diazo Evans Blue by two strains *Pseudomonas fluorescens* isolated from different wastewater treatment plants. *Water Air Soil Pollution*, 223, 5259-5266.
- Grayson, T.H., Atienzar, F.A., Alexander, S.M., Cooper, L.F., and Gilpin, M.L., 2000. Molecular diversity of *Renibacterium salmoninarum* isolates determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis, *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (2000) 435–438.
- Green, M.H.L. and Muriel, W.J., 1976. Mutagen testing using *Trp*⁺ reversion in *Escherichia coli*, *Mutation Research*, 39, 3-32.
- Greenman, C., Wooster, R., Futreal, P. A., Stratton, M. R. and Easton, D. F., 2006. Statistical analysis of pathogenicity of somatic mutations in cancer. *Genetics* 173, 2187–2198.
- Guerard, M., Zeller, A., Singer, T. and Gocke, E., 2012. *In vitro* genotoxicity of neutral red after photo-activation and metabolic activation in the Ames test, the micronucleus test and the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 746 (2012), 15– 20.
- Gulluce, M., Agar, G., Baris, O., Karadayi, M., Orhan, F. and Sahin, F., 2010. Mutagenic and Antimutagenic Effects of Hexane Extract of some *Astragalus* Species Grown in the Eastern Anatolia Region of Turkey. *Phytotherapy Research* 24 (7), 1014-1018.
- Ha, M.S., Ha, S.D., Choi, S.H. and Bae, D.H., 2013. Exposure assessment of synthetic colours approved in Korea. *Food Additives & Contaminants*, 30(4), 643-653.

- Hamer, P. W., McGeachie, J. M., Davies, M. J. and Grounds, M. D., 2007. Blackwell Science Ltd Evans Blue Dye as an *in vivo* marker of myofibre damage: optimising parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. *Journal of Anatomy*, 200, 69–79.
- Hassan, A.A., 2014. Removal of Reactive Red 3B from aqueous solution by using treated orange peel. *International Journal of Civil Engineering and Technology*, 5(3), 160-169.
- İzbrak, A., Sümer, S. ve Diril, N., 1989. Yaygın olarak kullanılan bazı boya ların mutajenik etkilerinin test edilmesi. *Hacettepe Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 10, 29-37.
- Karadayı, M., 2010. *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare*'den elde edilen bazı etken maddelerin Ames/Salmonella ve E. coli WP2 test sistemleri ile mutajen ve antimutajen özelliklerinin belirlenmesi.Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
- Karadayı, M., Barış, Ö. and Güllüce M., 2012. *Salmonella* as a Unique Tool for Genetic Toxicology. *Salmonella a diversified superbug*, Ed: Y. Kumar. *Janeza Trdine 9, Croatia*. 255-276.
- Khan, R., Bhawana, P. and Fulekar, M.H., 2013. Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 12, 75–97
- Khera, K.S. and Munro, I.C., 1979. A review of the specifications and toxicity of synthetic food colors permitted in Canada. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 6, 81–133.
- Kirpnick, Z., Homiski, M., Rubitski, E., Repnevskaya, M., Howlett, N., Aubrecht, J. and Schiestl, R.H., 2005. Yeast DEL assay detects clastogens. *Mutation Research*, 582, 116-134.
- Koçak, G., 2011. *Bacillus subtilis* ile reaktif black 5 boyar maddesinin renk giderim kinetiğinin araştırılması. Y.Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Konicki, W., Sibera, D., Mijowska, E., Lenzion-Bielun, Z. and Narkiewicz, U., 2013. Equilibrium and kinetic studies on acid dye Acid Red 88 adsorption by magnetic ZnFe₂O₄ spinel ferrite nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 398, 152–160.
- Korkmaz, B., 2005. Bazı 2-Süstitüe perimidin bileşiklerinin mutajenik aktivitelerinin Ames mutajenite testi ile belirlenmesi. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.
- Kuru, M. ve Gözükara, S.E., 2001. *Genetik*. Palme Yayıncılık No:186, 360 s, Ankara.
- Lima, R.O.A., Bazo, A.P., Salvadori, D.M.F., Rech, C.M., Oliveira, D.P. and Umbuzeiro, G.A., 2007. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. *Mutation Research*, 626, 53–60.
- Malik, P.K., 2003. Use of activated carbons prepared from sawdust and rice-husk for adsorption of acid dyes: a case study of Acid Yellow. *Dyes and Pigments*, 56 (2003), 239–249
- Mansour, H.B., Corroler, D., Barillier, D., Ghedira, K., Chekir, L. and Mosrati, R., 2007. Evaluation of genotoxicity and pro-oxidant effects of the azo dyes: Acids

- yellow 17, violet 7 and orange 52, and of their degradation products by *Pseudomonas putida* mt-2. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1670–1677.
- Maron, D. and Ames, B. N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 113(3-4), 173–215.
- Matsuda R., Nishikawa, A. and Tanaka, H., 1995. Visualization of dystrophic muscle fibres in mdx mouse by vital staining with Evans blue: Evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. *Journal of Biochemistry*, 118, 959–964.
- Mortelmans, K. and Riccio, E. S., 2000. The bacterial tryptophan reverse mutation assay with *Escherichia coli* WP2. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 61–69.
- Mortelmans, K. and Zeiger, E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 29–60.
- Moutaouakkil, A., Zeroual, Y., Dzayri, F.Z., Talbi, M., Lee, K. and Blaghen, M., 2003. Purification and partial characterization of azoreductase from *Enterobacter agglomerans*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 413, 139–146.
- Mumcu, E., 2005. Seydi Çayı (Eskişehir) Çevresinden Toplanan Su ve Toprak Örneklerinde Ames/*Salmonella*/Mutajenite Testi İle Bor Elementinin Mutajenitesinin Araştırılması. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.
- Nam, S. and Renganathan, V., 2000. Non-enzymatic reduction of azo dyes by NADH. *Chemosphere*, 40, 351–357.
- Newsome, R. L., 1990. Natural and synthetic coloring agents. *Food Additives*, Ed: A. L. Branen, P. M. Davidson, S. Salminen. Marcel Dekker, New York, 327–345.
- Oraler, G., 1990. Genetik. İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Basımevi, 177 s, İstanbul.
- Oztaş, B., Kaya, M. and Camurcu, S., 1992. Influence of profound hypothermia on the blood-brain barrier permeability during acute arterial hypertension. *Pharmacological Research*, 26, 75–84.
- Öncül, Ö., 2009. Bazı gıda boyaalarının mutajenik potansiyellerinin Ames/Mikrozom testi ile araştırılması ve β -galaktosidaz üzerine etkileri. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Öner, C., Sümer, S., Öner, R., Ögüş, A. ve Açıık, L., 2009. Genetik Kavramlar. Palme Yayıncılık No: 506, 677 s, Ankara.
- Özbek, T., 2006. Doğu Anadolu Tıbbi Bitkilerine Ait Bazı Türlerin Ames/*Salmonella* Mikrozom Testi Kullanılarak Antimutajenik Özelliklerinin Saptanması. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Atatürk Üniversitesi, Erzurum
- Öztaş, E., 2005. Bazı 9-Süstitüe Fenantren Türevlerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames/*Salmonella*/Mikrozom Testi İle Araştırılması. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.
- Öztürk, İ., 1999. Doğal Bitkisel Boyalarla Yün Boyama. Dokuz Eylül Yayınları, 104 s, Türkiye.
- Özyurt, M., 2000. Dezenfeksiyon ve Sterilizasyon Yöntemleri, *Klinik Dergisi*, 13, 41-48.
- Petek, M., 1999. İstanbul Boğazındaki Toplam Kirliliğin Canlılardaki Mutajenik Etkilerinin, *Salmonella*/mikrozom Test Sistemi İle Araştırılması. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Deniz Bilimleri ve İşletmeciliği Enstitüsü, İstanbul.

- Pielesz, A., 1999. The process of the reduction of azo dyes used in dyeing textiles on the basis of infrared spectroscopy analysis. *Journal of Molecular Structure*, 511–512, 337–344.
- Pielesz, A., Baranowska, I., Rybak, A. and Włochowicz, A., 2002. Detection and determination of aromatic amines as products of reductive splitting from selected azo dyes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53, 42–47.
- Pierce, B.A., 2010. *Genetics: A Conceptual Approach*. W.H. Freeman & Company, 709 s, Texas, USA.
- Pokhrel, D. and Viraraghavan, T., 2004. Treatment of pulp and paper mill wastewater-a review. *Science of The Total Environment*, 333(1,3), 37–58.
- Prival, M.J. and Mitchell, V.D., 1982. Analysis of a method for testing azo dyes for mutagenic activity in *Salmonella typhimurium* in the presence of flavin mononucleotide and hamster liver S9. *Mutation Research*, 97, 103–116.
- Rosin, M.P. and Stich, H.F., 1979. Assessment of the use of the *Salmonella* mutagenesis assay to determine the influence of antioksidants on carcinogen-induced mutagenesis. *International Journal of Cancer*, 23, 722–727.
- Rosin, M.P., and Stich, H.F., 1978. The inhibitory effect of cysteine on the mutagenic activities of several carcinogens. *Mutation Research*, 54, 73–81.
- Sabnis, R.W., 2010. *Handbook of Biological Dyes and Stains; synthesis and industrial applications*. Published by John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.
- Sağsöz, S., Tosun, M. ve Akgün, İ., 2001. Sitogenetik. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi No: 703/307/59, 229 s, Erzurum.
- Santos, F.V., Tubaldini, F.R., Cólus, I.M.S., Andréo, M.A., Bauab, T.M., Leite, C.Q.F., Vilegas, W. and Varanda, E.A., 2008. Mutagenicity of Mouriri pusa Gardner and Mouriri elliptica Martius. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2721–2727.
- Sawai, J., Kojima, H., Kano, F., Igarashi, H., Hashimoto, A., Kawada, E., Kokugan, T. and Shimizu, M., 1998. Ames assay with *Salmonella typhimurium* TA102 for mutagenicity and antimutagenicity of metallic oxide powders having antibacterial activities. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 773–775.
- Saylam, A., 2006. 8-hidroksikinolinin diazolanın çeşitli karbosiklik ve heterosiklik aminlerle tepkimesinden azo bileşiklerinin sentezi ve bazı özelliklerinin incelenmesi. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Shamberger, J.R., Cynthia, L., Beaman, K.D. and Kasten, B.L., 1979. Antioxidants reduce the mutagenic effect of Malonaldehyde and β -propiolactone. *Mutation Research*, 66, 349–355.
- Sharma, R.K., Otsuka, M., Pande, V., Inoue, J. and Ramos, M. J., 2004. Evans Blue is an inhibitor of nuclear factor-kappa B (NF- κ B)-DNA binding. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14 (2004), 6123–6127.
- Skowronek, M., Roterman, I., Konieczny, L., Stopa, B., Rybarska, J., Piekarska, B., Goreck, A., Krol, M., 2000. The conformational characteristics of Congo Red, Evans Blue and Trypan Blue. *Computers & Chemistry*, 24 (3,4), 429–450.
- Soares, G.M.B., Amorim, M.T.P., Hrdina, R. and Costa-Ferreira, M., 2002. Studies on the biotransformation of novel diazo dyes by laccas. *Process Biochemistry*, 37 (2002), 581–587.

- Sun, J.X., Helgason, A., Masson, G., Ebenesersdóttir, S.S., Li, H., Mallick, S., Gnerre, S., Patterson, N., Kong, A., Reich, D. and Stefansson, K., 2012. A direct characterization of human mutation based on microsatellites. *Nature Genetics* 44, 1161–1165.
- Temizkan, G., Arda, N., 2004. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler* (2. baskı). Nobel Tıp Kitabevleri, 345 s., İstanbul.
- Tidball, J.G., Berchenko, E. and Frenette, J., 1999. Macrophage invasion does not contribute to muscle membrane injury during inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 65, 492–498.
- Toker, F., 2005. Azometin bağı içeren azo boyar monomerlerinin sentezleri ve karakterizasyonları. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Celal Bayar Üniversitesi, Manisa.
- Tort, N., 1997. Anason (*Pimpinella anisum* L.) ve pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) Tohumlarının *in vitro* ortamda sterilizasyonu üzerinde bir araştırma, *ANADOLU J of AARI*, 7(2), 41 – 50.
- Umbuzeiroa, G.A., Freemanb, H.S., Warrenc, S.H., Oliveirad, D.P., Teraoe, Y., Watanabef, T. and Claxtonc, L.D., 2005. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. *Chemosphere*, 60(1), 55–64.
- Varella, S.D., Pozetti, G.L., Vilages, W. and Varanda, E.A., 2004. Mutagenic activity in waste from an aluminum products factory in *Salmonella*/microsome assay. *Toxicology in Vitro*, 18, 895-900.
- Vargas, V.M.F., Motta, V.E.P. and Henriques, J.A.P., 1993. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water the influence of petrochemical industries. *Mutation Research*, 319, 31-45.
- Velmurugan, P., Rathinakumar, V. and Dhinakaran, G., 2011. Dye removal from aqueous solution using low cost adsorbent. *International journal of environmental sciences*, 1(7), 1492-1503.
- Victorin, K., Busk, L. and Ahlborg, U.G., 1987. Retinol (Vitamin A) inhibits the mutagenicity of o-aminoazotoluene activated by liver microsomes from several species in the Ames test. *Mutation Research*, 179,41-48.
- Weisburger, J.H., 1997. A perspective on the history and significance of carcinogenic and mutagenic N-substituted aryl compounds in human health. *Mutation Research*, 376, 261–266.
- Welsh, J. and McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, *Nucleic Acids Research*, 18 (1990), 7213– 7218.
- Wickramasnghe, R. H., 1979. Short-term Mutagenicity Test Systems for Detecting Carcinogens Report of an International Symposium in Dortmund. *International Archives of Occupational Environmental Health*, 44(1), 61-64.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18 (1990), 6531–6535.
- Xu, T., Liu, Y., Ge, F., Liu, L. and Ouyang, Y., 2013. Application of response surface methodology for optimization of azocarmine B removal by heterogeneous photo-Fenton process using hydroxy-iron–aluminum pillared bentonite. In *Applied Surface Science*, 280, 926-932.

- Yang, X.Q., Zhao, X.X., Liu, C.Y., Zheng, Y. and Qian, S.J., 2009. Decolorization of azo, triphenylmethane and anthraquinone dyes by a newly isolated *Trametes* sp. SQ01 and its laccase. *Process Biochemistry*, 44, 1185–1189.
- Yıldırım, A., Kandemir, N., 2001. Bitki Biyoteknolojisi, Ed: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S.. Bölüm 23, Genetik Markörler ve Analiz Metodları, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya. 334-363.
- Yüksel, S., 2005. Bazı Substitue Benzinidenailin Türevlerinin Mutajenik Aktivitelerinin Ames Salmonella Mikrozom Testi İle Araştırılması. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.
- Yüzbaşıoğlu, A., 2008. Defenerasyon sürecinde kas dokusunda housekeeping genlerin ekspresyon düzeyinin incelenmesi.Y. Lisans Tezi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Zeiger, E., Gollopudi, B. and Spencer, B., 2005. Genetic toxicity and carcinogenicity studies of glutaraldehyde—a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 589(2), 136–151.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında İstanbul'da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 2007 yılında girdiği Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2011 yılında biyolog olarak mezun oldu. 2011 yılında başladığı Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yüksek lisans öğrenimine halen devam etmektedir.