

Bazı Benzotiyazol Türevlerinin Mutajenik Aktivitelerinin Umu Test Sistemi İle
Belirlenmesi

Harika Emeksiz

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Mayıs 2013

Determination Of Mutagenic Activities Of Some Benzothiazole Derivatives By
Salmonella Umu Test

Harika Emeksiz

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

May 2013

Bazı Benzotiyazol Türevlerinin Mutajenik Aktivitelerinin Umu Test Sistemi İle
Belirlenmesi

Harika Emeksiz

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Mediha CANBEK

Mayıs 2013

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Harika Emeksiz'in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Bazı Benzotiyazol Türevlerinin Mutajenik Aktivitelerinin Umu Test Sistemi İle Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Mediha CANBEK

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye: Doç. Dr. Mediha CANBEK

Üye: Doç. Dr. Adnan AYHANCI

Üye: Doç. Dr. Funda TAY

Üye: Yard. Doç. Dr. Ünal ÖZELMAS

Üye: Yard. Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Çevremizde biyolojik aktiviteleri henüz bilinmeyen çok sayıda sentetik kimyasal madde bulunmaktadır. Bu kimyasalların mutajenik potansiyellerinin ortaya konması gerekmektedir. Çünkü mutajen olduğu saptanan birçok bileşiğin aynı zamanda kanserojen olduğu bilinmektedir. Bu da insan sağlığı açısından son derece önemlidir.

Bu çalışmada yeni sentezlenen 2 farklı benzotiyazol türevi olan N-(4-benzotiyazol-2-il)-2-metoksifenil)-2-(4-klorofenoksi) asetamit ile N-(4-(benzotiyazol-2-il)-3-klorofenil)-2-(4-klorofeniltiyo) asetamit' in Umu test sistemi ile genotoksik potansiyelleri çalışıldı. Benzotiyazol türevi bileşiklerin 5 ayrı dozu (10, 100, 1000, 2500 ve 5000 µg/ml) DMSO (Dimetilsülfoksit) da çözülerek hazırlandı. Bu dozlar test organizması olarak kullanılan *Salmonella thyphimurium* NM 2009 ve NM 3009 suşları ile sınıandı ve verdiği enzim aktivitesi değerleri pozitif mutajen olarak kullanılan 4NQO (4-Nitrokinolin-1-oksit) ile karşılaştırıldı.

Elde ettiğimiz verilere göre; N-(4-benzotiyazol-2-il)-2-metoksifenil)-2-(4-klorofenoksi) asetamit türevinde direkt mutajenik etki görülmedi. N-(4-(benzotiyazol-2-il)-3-klorofenil)-2-(4-klorofeniltiyo) asetamit türevinde ise pozitif mutajenle karşılaştırıldığında anlamlı bir artış görüldü. Bu benzotiyazol türevi orta dereceli mutajen olarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler: SOS/Umu-testi, SOS cevabı, Mutajenite, Benzotiyazol türevleri

SUMMARY

Around us, there are many synthetic chemical substances of which biological activities are not known. These chemicals' mutagenic potentials should be exhibited. Because, many compounds that were identified as mutagen are known to be carcinogenic.

In this study, genotoxic potentials of N-(4-benzothiazole-2-yl)-2-methoxyphenyl)-2-(4-chlorophenoxy) acetamite and N-(4-(benzothiazole-2-yl)-3-chlorophenyl)-2-(4-chlorophenylthio) acetamite, that are recently synthesised 2 different benzotiazol derivative, are studied via Umu test system. 5 different doses (10, 100, 1000, 2500 and 5000 µg/ml) of benzotiazol derivative compounds were prepared by solving in DMSO (Dimetilsulfoxide). These doses were tested via *Salmonella thyphimurium* NM 2009 and NM 3009 strains which are used as test organisms, and enzyme activity values obtained were compared with 4NQO (4-nitroquinoline-1-oxide) that is used as positive mutagen.

According to the values we've obtained, there weren't seen a direct mutagenic effect on N-(4-benzothiazole-2-yl)-2-methoxyphenyl)-2-(4-chlorophenoxy) acetamite derivative. As for N-(4-(benzothiazole-2-yl)-3-chlorophenyl)-2-(4-chlorophenylthio) acetamite derivative, a significant increase was observed compared to positive mutagen. We observed this benzotiazol derivative as a moderate mutagen.

Keywords: SOS/Umu-assay, SOS response, Mutagenicitiy, Benzothiazole derivatives

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın hazırlanmasında, pratik ve teorik kısımlarında yapıcı eleştirileri, bilgi ve deneyimi ile araştırmamın yürütülmesi ve değerlendirilmesinde bana her zaman yol gösteren, yardımlarını esirgemeyen danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Mediha CANBEK' e, test edilen kimyasal maddeler konusunda yardımlarından dolayı Sayın Doç. Dr. Funda TAY' a, yardımlarını esirgemeyen Sayın Yard. Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU' ya, tezimin tüm aşamalarında değerli bilgi ve fikirlerinden yararlandığım Araş. Gör. Emre CEYHAN' a ve her konuda desteğini esirgemeyen arkadaşım Ahmet ÖZEN' e teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca her konuda beni destekleyen, beni yönlendiren ve her zaman yanımda olan sevgili aileme en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
 1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	 1
 2.GENEL BİLGİLER.....	 4
2.1 Benzotiyazol.....	4
2.2 Umu Test Sistemi.....	6
2.3 Mutasyonlar.....	11
2.3.1 Kromozom mutasyonları.....	12
2.3.1.1 Kromozom sayı değişimleri (genom mutasyonları).....	12
2.3.1.2 Kromozom yapı değişimleri (kromozom mutasyonları).....	15
2.3.2 Gen mutasyonları ve sınıflandırılması.....	19
2.4 Mutajenlerin DNA' ya Etki Şekilleri.....	22
2.4.1 Fiziksel mutajenler.....	22
2.4.2 Kimyasal mutajenler.....	23
2.4.2.1 Baz analogları.....	23
2.4.2.2 Alkilleyici kimyasallar.....	24
2.4.2.3 DNA bazlarını değişime uğratan kimyasallar.....	25

İÇİNDEKİLER (devam)

2.4.2.4 Aromatik mutajenler.....	26
2.5 DNA Onarım Mekanizmaları.....	26
2.5.1 Direkt onarım ya da hasarın geri döndürülmesi.....	26
2.5.1.1 Fotoreaktivasyon.....	26
2.5.1.2 O-6-Metilguanin onarımı.....	27
2.5.1.3 Basit tek zincir kırıklarının ligasyonu.....	27
2.5.2 Eksizyon (kesip-çıkarma) onarımı.....	28
2.5.3 Rekombinasyon onarım.....	29
2.5.4 SOS onarımı.....	30
2.5.5 Hataya eğimli onarım.....	31
2.5.6 Yanlış eşleşmeleri düzeltme onarımı.....	32
2.6 Ksenobiyotiklerin Biyotransformasyonu.....	33
2.7 Diğer Kısa Zamanlı Bakteriyel Test Sistemleri.....	35
2.7.1 Ames testi.....	37
2.7.2 S.O.S kromotest sistemi.....	37
2.7.3 Bakterilerde Fluctuation testi.....	37
2.7.4 Bacillus subtilis onarım testi.....	38
2.7.5 Profaj indüksiyon testi.....	38
3. MATERYAL ve METOT.....	39
3.1 Materyal.....	39
3.1.1 Kimyasal maddeler.....	39
3.1.2 Deneyimizde araştırılan benzotiyazollerin tanıtılması.....	39
3.1.3 Besi ortamları, çözeltiler ve tamponlar.....	41
3.2 Metot.....	44
3.2.1 Umu-Test sisteminde kullanılan bakteri suşları.....	44
3.2.2 Bakteri suşlarının genetik işaretlerinin kontrolü.....	45
3.2.3 Test suşlarının saklanması.....	46
3.2.4 Test suşlarının üreme eğrilerinin çıkarılması.....	46

İÇİNDEKİLER (devam)

3.2.5 Sitotoksik etkinin saptanması.....	47
3.2.6 β -Galaktozidaz aktivitesinin ölçülmesi.....	47
3.2.7 Test edilecek kimyasalların konsantrasyonlarının hazırlanması.....	47
3.2.8 Umu deneylerinin yapılması.....	48
3.2.9 Umu test sonuçlarının yorumlanması.....	49
4. BULGULAR.....	51
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	55
6. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1 Tiyazolun genel formülü.....	5
2.2 Benzotiyazolun genel formülü	5
2.3 Umu test sisteminin moleküler genetik seviyedeki prensibi.	10
2.4 Terminal delesyon (a) ve İnterkalar delesyon (b)	16
2.5 Duplikasyon ile kromozom yapısının değişmesi	17
2.6 Parasentrik (a) ve Perisentrik (b) İnversiyon oluşumu	18
2.7 Karşılıklı translokasyon	19
2.8 5-bromourasilin adenin ve guaninle eşlenmesi.....	24
2.9 Etilmetan sülfonat (EMS) tarafından guaninin 6-etilguanine dönüştürülmesi ve 6 etilguaninin timinle eşlenmesi	25
2.10 Bir timin dimerinin fotoreaktivasyon ile onarımı	27
2.11 Bir timin dimerinin kesip çıkarma onarımıyla yok olması.....	29
4.1 <i>S.thyphimurium</i> NM 2009 ve NM 3009 suşunun A maddesi ve pozitif mutajenle verdiği β -galaktozidaz enzim aktivitesinin doza bağlı grafiği.....	52
4.2 <i>S.thyphimurium</i> NM 2009 ve NM 3009 suşunun B maddesi ve pozitif mutajenle verdiği β -galaktozidaz enzim aktivitesinin doza bağlı grafiği.....	53
4.3 <i>S.thyphimurium</i> NM 2009 ve NM 3009 suşunun 4NQO maddesi ile verdiği β -galaktozidaz enzim aktivitesinin doza bağlı grafiği	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
2.1 Mutajenlerin saptanması için geliştirilen kısa zamanlı test sistemleri ve bunların dayandığı genetiksel ve biyokimyasal yollar.....	36
3.1 Benzotiyazollerin açık-kapalı formülleri ve fiziksel parametreleri.....	40
4.1 <i>S.thyphimurium</i> NM 2009 ve NM 3009 suşunun Umu test sistemi ile benzotiyazol türevlerindeki ünite hesapları.....	50

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

CAS	: Chemical Abstracts Service
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
EEA	: European Environment Agency
EPA	: Environmental Protection Agency
JCCC	: Johnson Country Community College
NR	: Nitroredüktaz
ONP	: O-nitrofenole
ONPG	: O-Nitrophenly- β -D-galaktopyranoside
O-AT	: O-Asetiltransferaz
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
S.G.M	: Sanayi Genel Müdürlüğü
Xgal	: 5-bromo-4 chloro-3-indolyl- β -D-galactoside
4NQO	: 4-nitroquinoline 1-oxide
WHO	: World Health Organization

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kimyasal madde üretimini içine alan kimya sektörü oldukça geniş bir ürün yelpazesine sahiptir. Sektör; temizlik ürünleri, boyalar, kozmetik ürünler, ilaçlar, gübreler ve tarım ilaçları, laboratuvar kimyasalları, termoplastikler gibi organik ve inorganik birçok kimyasal madde üretmektedir (S.G.M ., 2012/1).

Yeni kimyasal madde sentezi ve izolasyonu sürekli bir büyüme göstermektedir (Binetti et al., 2008). Amerika Kimya Derneğinin (American Chemical Society) bir bölümü olan CAS (Chemical Abstracts Service) veri tabanında 1907 yılından günümüze kadar 68 milyonun üzerinde organik ve inorganik madde ve 64 milyondan fazla kimyasal dizin kayıtlıdır. Veri tabanı güncellenerek her gün 4.500’ den fazla yeni kayıt eklenmektedir (CAS, 2012).

Son çeyrek yüzyıldaki hızlı sanayileşme ve özellikle nükleer teknolojinin yaygınlaşması doğa kirlenmesine yeni boyutlar getirmiş ve sağlıklı yaşam için çevrenin korunmasının kaçınılmaz bir gereksinim olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle plastikler ve radyoaktif maddeler gibi biyodegradasyona yavaş uğrayan endüstri ürünleri doğadaki ekolojik dengeyi olumsuz etkilemektedir. Çevre kirlenmesinde rol oynayan organik ve inorganik toksik maddelerin sağlık üzerine olan zararlı etkileri bunların organizmaya girmeleriyle oluşmaktadır (Dökmeci, 1988).

Çevremizde biyolojik etkileri bilinmeyen ve sayıları milyonları bulan sentetik ve doğal kimyasal madde bulunmaktadır. Bu kimyasallar hayatımızın önemli bir parçasıdır. Günlük yaşamda hayatımızı doğrudan ya da dolaylı olarak etkilemektedir.

İnsanlar; sperm sayısında azalmalara, genital kusurlara, sinir gelişimi bozulmalarına, obeziteye ve kansere neden olan birçok kimyasala maruz kalmaktadır (EEA, 2010). Dünya genelinde kanser kardiyovasküler hastalıklardan sonra en yaygın ölüm nedenidir (Ferlay et al., 2008; American Cancer Society, 2008; Sekar et al., 2011).

Dünya çapında, 2008 yılında tahmini 12,7 milyon kanser tanısı konulmuş ve 7,6 milyon kişi kanser sebebiyle hayatını kaybetmiştir. Dahası, 2030 yılında 21,4 milyon yeni kanser vakası ve 13,2 milyon kanser kaynaklı ölüm beklenmektedir (American Cancer Society, 2012) .

WHO (Dünya Sağlık Örgütü) ya göre dünya genelindeki tüm kanserlerin %19' luk (1,3 milyon ölüm) kısmı çevresel faktörlere dayandırılmaktadır (WHO, 2011). Bu nedenle kimyasalların potansiyel riskleri ve olumsuz etkilerini değerlendiren genotoksisite çalışmaları gittikçe önem kazanmaktadır (Şekeroğlu, 2011). Genotoksisite testleri esas olarak kanserden korunmada, çevresel etkenlerin, endüstriyel kimyasalların etkisini araştırmada, ilaçların piyasaya sürülmeden önce toksik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada kullanılmaktadır. Bu nedenle birçok in vivo ve in vitro genotoksisite testi geliştirilmiş ve bu testler 1970' lerden beri kullanılmaktadır (Bedir vd, 2004).

Uzun süreli karsinojenite deneyleri potansiyel tehlikeli karsinojenleri ve karsinojenlerin doz-yanıt ilişkisini belirlemek amacı ile yapılır. Ayrıca tümörlerin yanı sıra preneoplastik lezyonları incelemek için tasarlanmıştır (EPA, 2005)

Araştırmacılar, deney hayvanlarında karsinojenite çalışmalarının uzun sürmesi, pahalı olması ve birçok hayvan kullanmayı gerektirmesi nedeni ile maliyeti düşük, daha çabuk sonuç alınan kısa zamanlı mutajenite testleri geliştirmişlerdir.

Bakteri ve memeli hücre kültürlerinin oluşturduğu çoğu kısa zamanlı testler öncelikle tehlike teşhisi için dizayn edilmişlerdir. Bu testler risk değerlendirmesinde yalnızca başlangıç noktasını oluşturmaktadırlar. Maruz kalma koşulları altında gözlenen etkilerin insanlar için ilgili olsun ya da olmasın farmakokinetik, farmakodinamik ve diğer etkenlere bağlı olarak in vivo da incelenmesi gerekir (Eastmond et al., 2009).

Bakteriyel test sistemlerinde mutajen olduğu saptanan bir çok bileşiğin aynı zamanda kanserojen olduğu da görülmüştür (Maurici et al., 2005; Vural, 2005).

Karsinogen ve mutajenlerin neden olduğu DNA hasarı tiplerini saptamada bakteriyel test sistemleri kullanılmaktadır. Kısa zamanlı bakteriyel test sistemleri, karmaşık kimyasal örneklerdeki mutajenik bileşiklerin ve metabolik aktivasyon sonucu ortaya çıkan reaktif bileşiklerin saptanmasında analitik araçlar haline gelmişlerdir (Diril vd., 1997).

Bununla birlikte kısa zamanlı test sistemlerinin hiçbirisi karsinogenleri mutajen olarak belirlemede mükemmel değildir. Çünkü bu testlerin her biri yalnızca birkaç mutajeni tanımlayabilir (Mortelmans and Rupa, 2004; Olaharski et al., 2006; Witte et al., 2007; Benigni and Bossa, 2011).

Kimyasal maddeler vücuda farklı şekillerde alınabilir. Bunlardan biri de çeşitli amaçlarla kullanılan ilaçlar şeklindedir. Bu çalışmada ilaç hammaddesi olarak kullanılması amaçlanan 2 farklı benzotiyazol türevinin mutajenik etkisinin olup olmadığı Umu test yöntemi ile araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Benzotiyazol

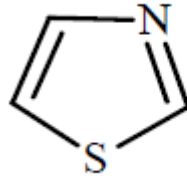
Heterosiklik bileşikler halkalarında en az iki farklı atom bulunan siklik yapıya sahip bileşiklerdir. Nitrojen, sülfür ve oksijen en yaygın heteroatomlardır. Doğada çok yaygın olarak dağılan ve yaşam için farklı şekillerde gerekli olan bileşiklerdir. Şekerlerin bir çoğu ve onların türevleri, C vitamini de dahil, bir oksijen atomu içeren altı üyeli (piran) ya da beş üyeli formları (furan) vardır. B vitamininin birçok çeşidi nitrojen atomu bulunan heterosiklik halkaya sahiptir. Aminoasit metabolizması ile ilgili, piridin türevi olan B₆ vitamini (piridoksin) örnek olarak gösterilebilir (Achson, 2009).

Benzotiyazol zayıf bazlı, çeşitli biyolojik aktiviteleri olan ve son günlerde bilimsel merak uyandıran heterosiklik bir bileşiktir. İlaç keşfi çalışmaları ile tıbbi kimyada ve biyoorganik araştırmalarda geniş ölçüde kullanılır (Yadav et al., 2011).

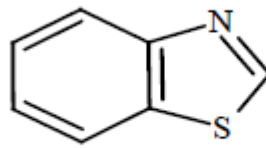
Benzotiyazol heterosiklik tiyazol taşıyan kaynaşmış membran halkalarından oluşur. Tiyazolun çekirdek yapısını sülfür ve nitrojen atomları oluşturur. Farmakolojik ve biyolojik olarak etkin olan bileşiklerdir (Yadav et al., 2011).

Tiyazol yapısal olarak tiyofen ve piridin ile ilgilidir (Şekil 2.1). Fakat kendine has özellikleri çoğu içinde benzemektedir. Tiyazol ilk olarak Hantzsch ve Waber tarafından 1887 yılında tanımlanmıştır. Popp 1889 yılında yapısını doğrulamıştır. Tiyazol' un numaralandırılmasına sülfür atomundan başlanır.

Benzotiyazolun temel yapısı tiyazolun 4,5 pozisyonundan benzen halkasıyla kaynaşması ile oluşur (Şekil 2.2). İkisi birlikte benzotiyazolun ana çekirdeğini oluşturur (Shivaraj et al., 2010).



Şekil 2.1 Tiyazolun genel formülü (Yadav et al., 2011)



Şekil 2.2 Benzotiyazolun genel formülü (Yadav et al., 2011)

Benzotiyazol türevi bileşiklerin biyolojik aktiviteleri 1950' li yıllardan beri incelenmekte ve halen çeşitli biyolojik özelliklerinin araştırılması devam etmektedir (Yılmaz, 2008). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, benzotiyazol halka sistemi taşıyan bileşiklerin antibakteriyel (Turan- Zitouni et al., 2003; Tomi et al., 2012) ve antifungal (Ryu et al., 2003; Singh et al., 2009; Gupta et al., 2010) etkilerinin yanı sıra antiallerjik ve antiinflamatuvar (Ban et al., 1998; Singh et al., 2009; Venkatesh and Pandeya, 2009), antimikrobiyal (Maharan et al., 2007; Gupta et al., 2009; Gupta et al., 2010), antikanser (Hutchinson et al., 2001; Wang et al., 2006; Kini et al., 2007; Tay et al., 2012), antihelmintik (Sreenivasa et al., 2009; Munirajasekhar et al., 2011) ve antidiyabetik (Pattan et al., 2005) etkiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Benzotiyazol halkaları, sinir koruyucu (Cao et al., 2002; Ramirez et al., 2003), muskarinik reseptör inhibitörü (Jung et al., 2000), Lck enzimi (Das et al., 2003) ve ayrıca HIV- proteaz ve revers transkriptaz (Akbay et al., 2003; Nagarajan et al., 2003) gibi faydalı fizyolojik etkinliği olan çeşitli doğal ve sentetik bileşikte bulunur.

2- aril benzotiyazol gibi çeşitli benzotiyazoller eşsiz yapılarından dolayı kabul görürler. Bunlar radyoaktif amiloid görüntüleme ajanı (Reddy et al., 2007) ve antikanser ajanı (Heo et al., 2006) olarak kullanılırlar.

2-(4-aminofenil) benzotiyazol güçlü ve selektif antitümör ajanı olarak kullanılan yeni bir sınıftır. Hücre kültüründe sitotoksik cevapta karakteristik özellik gösterir (Yadav et al., 2011).

Yapılan çalışmalarda bazı amino benzotiyazol türevlerinin metabolik aktivasyona bağlı olarak (Sato et al., 2000) ya da DNA hasarı oluşturarak (Brantley et al., 2003) mutajenik etkiye sahip olduğu öne sürülmüştür.

Bazı fenil benzotiyazol türevleri in vivo insan lenfositlerinde sitotoksik ve zayıf mutajen özellik göstermiştir (Tüylü and Zeytinoğlu, 2004). Diğer bir çalışma da ise bazı benzotiyazol türevleri *Salmonella thyphimurium*' un T100 suşunda mutajen olduğu bildirilmiştir (Zeytinoğlu et al., 2006).

Amino gruplu benzotiyazol türevleri örneğin 6- aminobenzotiyazol aromatik amin olarak sınıflandırılır. Bunlardan çoğunun mutajenik etkilerinin ve karsinojenik potansiyellerinin gösterilmesinden bu yana mutajenik bileşik gibi karakterize edilmesi kabul edilmiştir (Beland and Kadlubar, 1990).

2.2 Umu Test Sistemi

Bir çok kısa zamanlı genotoksisite testi endüstriyel kimyasalların ya da su, hava, doğal kimyasal gibi çevresel örneklerin karsinojenitesinin belirlenmesinde kullanılabilirler ve hayvan karsinojenite testlerine nazaran ucuz oldukları ve çabuk uygulanabildikleri için avantajlıdırlar (Tennant et al., 1987; Zeiger, 1987).

Salmonella Umu testi, DNA' ya zarar veren etkileri tespit etmek için SOS cevabındaki *umuC* geninin indüksiyonunun kalorimetrik olarak ölçüldüğü kısa zamanlı testlerden birisidir (Oda et al., 1985; Hamer et al., 2000). Umu testinde, *Salmonella thyphimurium* TA1535/pSK1002 (gram negatif, fakültatif anaerobik, *Enterobacteriaceae*) mutant suşu kullanılır (Wittekindt et. al ., 2000).

Bu test Ames testi kullanılarak test etmenin zor olduğu yiyecek, atık su gibi örneklerin incelenmesinde ekonomik ve çabuk uygulanması gibi avantajlara sahip olması nedeniyle kullanılabilir (Yasunaga et al., 2006). Genotoksik kimyasallarla hem Ames hemde Umu test sisteminde yapılan çalışmalar, Umu testi ile Ames testinin duyarlılığının yaklaşık olarak eşit olduğunu göstermiştir (Reifferscheid and Heil, 1996; Yasunaga et al., 2004).

Farklı DNA hasarlarına neden olan ajanları saptamak için Ames test sisteminde birkaç test suşuna gerek varken, Umu test sisteminde bu işlem tek bir suşla gerçekleştirilebilir. Bu nedenle Umu test sistemi pratikte çok daha fazla avantaja sahiptir. Aminoasit, üre, serum ve yiyecekleri kapsayan farklı çevresel örnekler bu test sistemi ile taranabilir. Ayrıca Umu test sistemi, Ames test sisteminde miktar olarak toksik olabilecek kimyasalları test etmeye olanak sağlar, çünkü Umu testinde hücrelerin canlı kalması zorunlu değildir (Diril vd, 1997).

Umu testi, kimyasal genotoksisiteyi saptamak için DNA hasarı tarafından oluşturulan *umuC-lacZ* geninin indüksiyonunu kullanır (Oda et al., 1985; Reifferscheid and Heil, 1996). Bunun RecA promatör protein ve LexA represör protein olan iki regülatör proteinin kontrolü altındaki *umuC* genini içeren SOS cevabı olduğu bilinmektedir (Yasunaga et al., 2006).

SOS cevabı, hücrenin potansiyel ve ölümcül stresler karşısında kendini korumasına yardımcı olan metabolik bir alarm sistemidir. Eğer DNA da çok sayıda hasar meydana gelmiş ve bu hasarlar replikasyona kadar diğer onarım mekanizmaları ile onarılmamış ya da replikasyon sırasında giderilmemişse, SOS cevabın indüklenmesiyle birlikte SOS onarımı devreye girer. Bu sırada hücrede DNA onarımında rol alan bazı

proteinlerin miktarında bir artış gözlenir. İndüklenmiş proteinlerin bir kısmı DNA polimeraz III' ün replike edemediği DNA lezyonlarını replike edebilen, özelleşmiş bir replikasyon sisteminin parçasıdır. Bu replikasyonda hata oranı yüksektir. Bununla birlikte SOS onarımı, replikasyon engelini aşan ve en azından birkaç mutant hücrenin yaşamasına izin veren biyolojik bir kazançtır (Oda et al., 1992).

Umu Testinin prensibi DNA' ya hasar veren ve karsinojen potansiyele sahip ajanların umu operonu tarafından tanınmasıdır. *E. coli* CSH26/pSK1002 suşundan pSK1002 plazmidi (*umuC-lacZ* geni taşıyan) hazırlanıp, önce *S. typhimurium* SJ10002 suşuna modifiye edilmiş olup, sonrasında hazırlanan plazmid *S. typhimurium* TA1535 (hisG46, rfa uvrB) suşuna transforme edilerek *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 suşu elde edilmiştir. TA1535/pSK1002 suşu ürettiği bir bileşik gen ile β -galaktozidaz aktivitesini, umu operon ekspresyonunun seviyesini ölçebilmektedir. *umuC-lacZ* bileşik geninde; umu operon, DNA-hasar ajanları tarafından etkilenecek RecA ve LexA genleri tarafından genetik olarak düzeltilir (Ono et al., 2000). Bu mekanizma Şekil 2.3 de gösterilmiştir.

Genotoksinler çeşitli DNA hasarı meydana getirdiğinde DNA tamir işlemiyle (genel tamir ya da postreplikasyonel tamir) tek zincirli DNA (ssDNA) oluşturulur ve daha sonra RecA proteininin aktivitesi LexA bölgesinde artar (Walker, 1984; Sassanfar and Roberts, 1990; Smith and Walker, 1998; Janion, 2001).

Bu nedenle, Umu testi sadece SOS cevabı oluşturma potansiyeline sahip genotoksik ajanların ortaya çıkarılmasında kullanılır (Yasunaga et al., 2006).

Umu test sisteminde kullanılan bakteriler

Bu test sisteminde kullanılan suşların tümü β galaktosidaz aktivitesi için hibrit bir protein oluşturan *umuC-lacZ* füzyonuna sahip pSK 1002 plazmidini taşır. Umu test sisteminde kullanılan atasal suşu oluşturmak için bu plazmid, kesip çıkarma onarım mekanizması hatalı (uvrB mutasyonu), birçok kimyasal için daha kolay geçirgenliğe sahip (rfa mutasyonu) ve laktoz operonunda doğal bir delesyon gibi üstün özellikleri

olan *Salmonella thyphimurium* TA 1535 içine yerleştirilmiştir. Bu özellikler sayesinde testin duyarlılığı arttırılmış ve Umu test için atasal suş olan *Salmonella thyphimurium* TA 1535/pSK1002 suşu oluşturulmuştur.

Çevrede çok geniş bir dağılım gösteren nitroarenlerden bazılarının hayvan deneylerinde karsinogeniteye neden olduğu ve bakteriyel testlerde de güçlü mutajen olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte bu nitroarenlerin SOS cevabı temel alan test sistemlerinde, diğer bakteriyel test sistemlerine göre daha zayıf bir genotoksik etki meydana getirdiği görülmüştür. Bu nedenle nitroarenlere karşı Umu testinin duyarlılığını arttırmak için çeşitli test suşları geliştirilmiştir.

Nitroarenlerin birçoğunun genotoksik etkilerini gösterebilmeleri için bakteriyel bir nitroredüktaza (NR) gereksinimleri vardır. Çünkü bakteriyel nitroredüktazlar nitroarenleri arilhidroksilamin ara metabolitine indirgeyerek onları mutajenik hale sokar. Daha sonra bu arilhidroksilamin türevleri 0-asetiltransferaz (0-AT) bakteri ya da memeli hücre sistemlerindeki reaktif elektrofillere dönüşürler. Dolayısıyla NR ve 0- AT enzimleri, nitroarenlerin mutajenik aktivitesindeki anahtar basamakları katalizler (Diril vd, 1997).

2.3 Mutasyonlar

DNA moleküllerinin bilgiyi depolama, eşleme, aktarma ve deşifre etme becerisi genetik fonksiyonunun temelini oluşturur. Fakat DNA' nın hatalar yapması da aynı oranda önemlidir (Klug vd, 2009).

DNA replikasyonu hatalara karşı birçok önlem alınmasına rağmen mükemmel bir işlem değildir (Pasternak, 2005). Normal bir insan hücresinde replikasyon esnasında meydana gelen hata (DNA polimerazın yanlış nükleotid yerleştirmesi) oranı 10^{-10} , hata okuma (proofreading) mekanizmasına rağmen ortaya çıkan hata oranı 10^{-8} dir (Debeleç-Bütüner ve Kantarcı, 2006). Sık görülmemekle birlikte bir veya daha fazla baz çiftini etkileyen hatalar oluşabilir. Buna ek olarak çeşitli kimyasallar, ultraviyole ışın, radyasyon ve radyoaktif bileşikler gibi dış etkenler DNA molekülünün nükleotit dizisini kalıcı olarak değiştirebilirler. Genetik maddedeki bir değişiklik mutasyon olarak tanımlanır (Pasternak, 2005; Lewis, 2009; Hartwell et al, 2011; Reece et al., 2011).

Mutasyon terimi ilk kez 1901 yılında, Hugo De Vries tarafından *Oenothera lamarckiana* (akşamsefası) ile yaptığı çaprazlamada gözlemlediği varyasyonu tanımlamak için kullanılmıştır (Öner, 2003).

Mutasyonlar somatik hücrelerde ya da germ hücrelerinde olabilir. Germ hücrelerinde olanlar kalıtılabilir, kalıtımla geçebilir ve genetik hastalıklar kadar genetik çeşitliliğin ve evrimin de temelini oluştururlar. Somatik hücrelerde olanlar lokalize hücre ölümüne, hücresel fonksiyon değişikliğine ve tümör oluşumuna yol açabilirler (Klug vd, 2009).

Bunun yanında mutasyonlar her zaman zararlı olmaz. Çünkü genelde mutasyon devamlı değişen çevreye uyum sağlayan bir gelişmedir (Vural, 2005).

Mutasyonların etkilerinin ve çeşitlerinin büyük değişkenliğine göre genetikçiler birkaç farklı şekilde sınıflayabilirler (Klug vd., 2009; Tüylü vd., 2009; Lewis, 2009). En geniş anlamda mutasyonlar iki temel grupta incelenebilir. Bunları “kromozom mutasyonları” ve “gen mutasyonları” olarak sıralayabilir. Kromozom mutasyonları da “kromozom sayı değişimleri” ve “kromozom yapı değişimleri” şeklinde iki gruba ayrılabilir (Tüylü vd., 2009)

2.3.1 Kromozom mutasyonları

2.3.1.1 Kromozom sayı değişimleri (genom mutasyonları)

İnsan eşey hücrelerinde 23 adet kromozom bulunur ve bu sayı insan için haploid (n) sayıdır. Ayrıca, haploid kromozom takımına genom da denir. Fakat genom terimi kimi yazarlarca “herhengi bir insanın genetik kuruluşu” olarak tanımlanır. İnsanın somatik hücrelerindeki sayının ya da haploid kromozom sayısının iki katıdır yani diploid ($2n = 46$) dir. Kromozom sayısındaki artış ya da azalışlar temel kromozom sayısının ($n = 23$) tam katları kadar oluyorsa buna öploid (“euploidy”) ve sayıya da öploid (“euploid”) denir. Oysa kromozom sayısındaki temel kromozom sayısının katları kadar olmayan artma ya da eksilmeler anöploid (“aneuploid”) adını alır ve olguya da anöploid (“aneuploidy”) denir. Poliploidi (“polyploidy”) de bir öploid durumudur ve temel sayının ikiden daha çok artması durumunda ($3n$, $4n$, $5n$ gibi) kullanılır (Satı, 2005).

Ökaryotik organizmaların kromozom sayısında meydana gelen mutasyonlar iki grupta toplanır

A. Euploidi

Bu durumda hücrelerdeki kromozom sayısı, o organizmada türü için normal olan haploid sayının, yani temel gametik sayının tam katı kadar artmıştır (Satı, 2005).

1. Monoploidi

Normalde diploid olan hayvan ve bitki hücrelerinde ender olarak bazı bireylerin hücrelerinde sadece bir takım yani n sayıda kromozom bulunur. Bu olaya monoploidi, böyle bireylere monoploid denir. Monoploidler genellikle döllenmemiş yumurtanın gelişmesiyle oluşurlar. Bu olay kendiliğinden olabileceği gibi dış etkenlerle de gerçekleşebilir (Temizkan, 1996). Arılarda dişilerin diploid, erkeklerin haploid sayıda kromozom takımına sahip olması monoploidi örneğidir (Tüylü vd, 2009).

2. Poliploidi

Hücre bölünmesi sırasında, sitoplazma bölünmesinin gerçekleşmediği durumlarda, replike olmuş kromozomların bir çekirdek içinde iki takım halinde kalmasıyla olur. Hücrelerin kromozom takım sayısı artmış olan organizmalara poliploid adı verilir. Poliploidlerin adlandırılması içerdikleri kromozom takım sayısına göre, triploid ($3n$), tetraploid ($4n$) ve pentaploid ($5n$) şekilde yapılır. Daha çok bitkilerde görülür ve birkaç tipi vardır (Tüylü vd, 2009).

a) Autopoliploidi

Aynı türe ait kromozomların takım sayısı artışları ile bir tür içinde görülen kromozom sayısı değişimleridir. Mayoz bölünme sırasında kromozom ayrılması gerçekleşmeyen $2n$ kromozomlu bir gamet, normal bir gametle birleştiğinde triploid bireyler ortaya çıkabilir. Diploid (AA) yapıdaki bir türün triploid (AAA), tetraploid (AAAA) ve daha fazla sayıda poliploid formları oluşabilir (Tüylü vd, 2009; JCCC, 2012).

b) Allopoliploidi

Birbirine çok yakın olan iki farklı türün melezlenmesi (AAxBB) ile elde edilen kromozom takım sayısı artışlarına denir. AB, AABB, AA ve ABBB gametlerine sahip türler oluşabilir. Allopoloid bitkiler doğal ya da deneysel olarak meydana getirilebilirler (Tüylü vd, 2009; JCCC, 2012).

c) Endopoliploidi

Diploid olabilecek bazı hücrelerin poliploid olma durumudur. Bu tip hücrelerde replikasyon ve kromozomların ayrılması çekirdek bölünmesi olmadan gerçekleşir. Endomitoz sonucu oluşur. Doğal olarak oluşan endopoliploidiye $4n$, $8n$ ya da $16n$ kromozom takımı içeren insan da dahil omurgalı canlıların karaciğer hücre çekirdekleri örnek olarak verilebilir (Klug et al., 2012)

B. Aneuploidi

Hücre bölünmesi sırasında, kromozomların ayrılmasında meydana gelen hatalar nedeniyle, normal kromozom takımında, bir ya da birden fazla kromozom eksilmesi ya da artması durumudur (Tüylü vd, 2009; Klug et al., 2012).

1. Monosomi

Aneuploidinin en sık rastlanan durumudur. Organizmanın kromozom sayısının baştaki kromozom takımının tam katı olmama durumudur. Burada normal diploid takımında bir kromozom eksik ya da fazladır. Bir kromozom eksikliği $2n-1$ yapısını oluşturur ve monosomi olarak adlandırılır. İnsanlarda $45+XO$ (Turner Sendromu) olduğu gibi monosomi görülmesine rağmen, otozomlardaki monosomi insan ve hayvanlarda genellikle tolere edilemez (Klug et al., 2012).

2. Nullisomi

Homolog kromozom çiftinden her iki kromozomun eksik olması durumudur. Bu tip bireyler $2n-2$ formülü ile gösterilir (Tüylü vd, 2009).

3. Trisomi

Herhangi bir kromozomdan hücrede iki tane bulunması gerekirken üç tane olmasıdır. Trizomi, otozomal kromozomlarda görüldüğü gibi cinsiyet kromozomlarında da görülür. Down sendromu $45+XX(Y)$ ve Klinefelter sendromu $44+XXY$ örnek olarak verilebilir (Tekşen, 2006; Tüylü vd, 2009).

4. Tetrasomi

Bir kromozomdan iki yerine dört tane olması şeklinde ortaya çıkar. Bu tip bireyler $2n + 2$ formülü ile gösterilir (Tüylü vd, 2009).

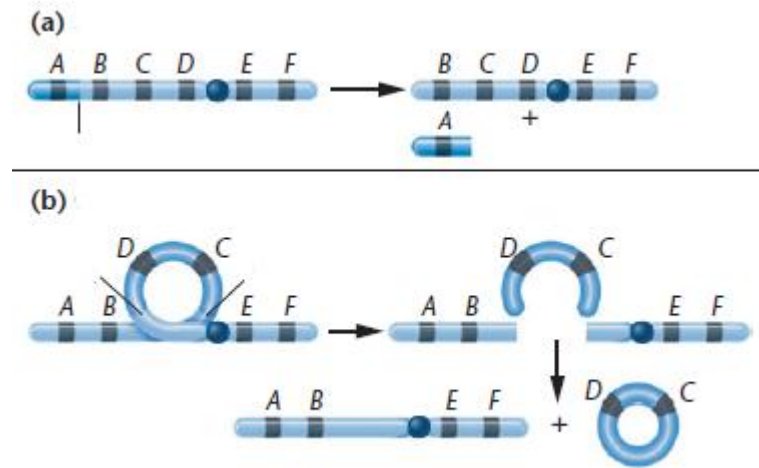
2.3.1.2 Kromozom yapı değişimleri (kromozom mutasyonları)

Kromozomlardaki yapısal değişiklikler, kromatit kollarında meydana gelen kırılmalardan kaynaklanır. Kırılmanın olduğu yere, kırılma tipine, sayısına ve kırılan parçaların tekrar birleşme özelliğine göre çok çeşitli kromozom mutasyonları meydana gelebilir. Kromozomlar nadiren kendileri kırılabilirler gibi genellikle mutajenlerin etkisi ile kırılırlar. Eşey hücrelerinde meydana gelirse kalıtımla yavrulara aktarılır. Bu mutasyonlar genel olarak dört gruba ayrılır (Tüylü vd., 2009)

A.Delesyon

Bir kromozomdan parça kopması ve bunun sonucu genetik madde kaybı olan bir mutasyon tipidir. Kopma kromozomun uç kısmında meydana gelirse *terminal delesyon*, kromozomun içinde bir bölgede oluşursa *interkalar delesyon* olarak adlandırılır (Şekil 2.4). Her iki delesyon tipinde de kopan parça mayoz ya da mitoz sırasında kaybolduğu için genetik madde kaybı söz konusudur. Kromozomun küçük bir parçası kaybolduğu

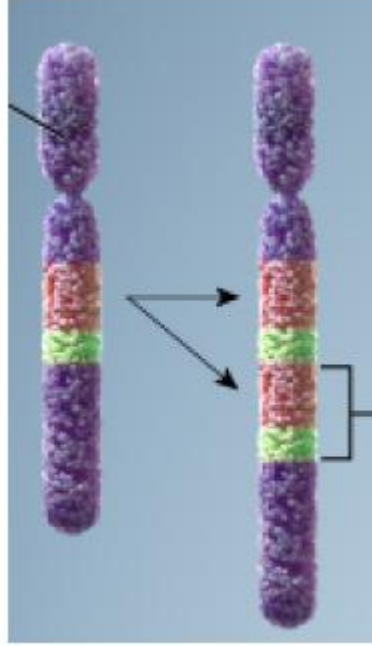
zaman organizma hayatta kalabilir. Delesyonlar gen bölgesinde meydana gelirse tolere edilemezler ve ölüme neden olabilirler. Örneğin, insanda 5. kromozomun küçük bir kısmının eksik olması durumunda cri-du-chat sendromu denilen bir hastalık ortaya çıkar (Tüylü vd, 2009; Klug et al, 2012).



Şekil 2.4 Terminal delesyon (a) ve İnterkalar delesyon (b) (Klug et al, 2012)

B. Duplikasyon

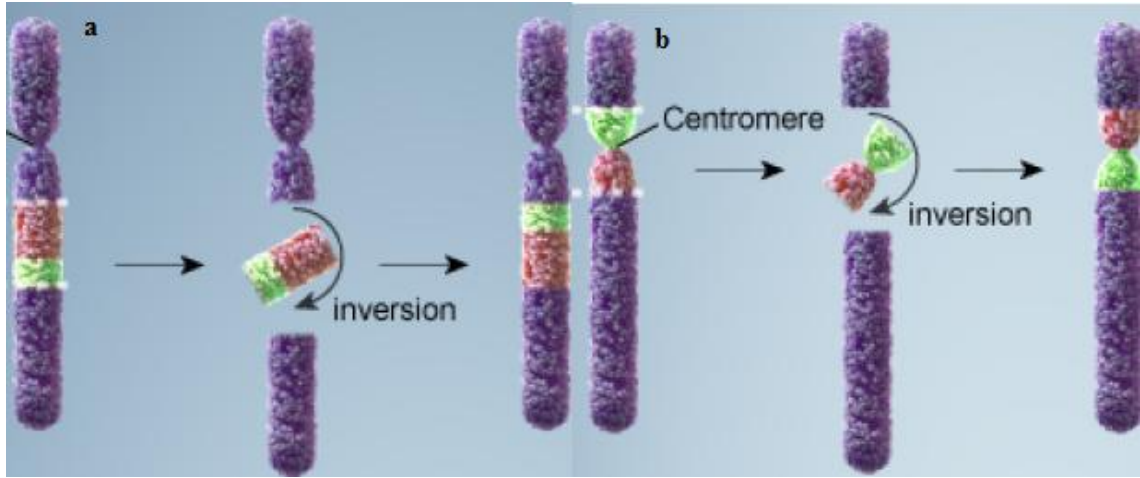
Genetik maddenin herhangi bir kısmının, genomda birden fazla sayıda bulunması ile meydana gelen mutasyon tipidir (Şekil 2.5). DNA replikasyonu ya da krossing-over sırasında homolog kromozomların eşleşmesindeki çeşitli hatalardan meydana gelebilir. Bunun sonucunda aynı DNA üzerinde bir ya da daha fazla genin birden fazla kopyası bulunur. Duplikasyonlar gen fazlalıklarına, fenotipik varyasyonlara neden olabilir (Klug et al, 2012).



Şekil 2.5 Duplikasyon ile kromozom yapısının değişmesi (NLM, 2012)

C. İnversiyon

Kromozomda kopan bir parçanın 180^0 dönüş yapması ile oluşan bir diğer kromozomal bozukluk inversiyon olarak adlandırılır. İnversiyonda genetik bilgi kaybı yoktur sadece doğrusal gen dizisi yeniden düzenlenmiştir. DNA parçacığı tekrar ters dönerek kromozomun yapısına katılır. Şekil 2.6’ da inversiyonun mekanizması gösterilmiştir. Kırılmadan önce kromozomda halkaya benzer bir yapı oluşur. Kırılma ile ortaya çıkan “yapışkan uçlar” birbirlerine yaklaşır ve tekrar birleşir. Ters çevrilen parça kısa ya da uzun olabilir, sentromeri içerebilir ya da içermeyebilir. Ters çevrilen parça sentromeri içine almışsa *perisentrik inversiyon* olarak adlandırılır. Sentromer yeni düzenlenen kromozom parçasının içinde değilse *parasentrik inversiyon* olarak adlandırılır (Klug et al., 2012).

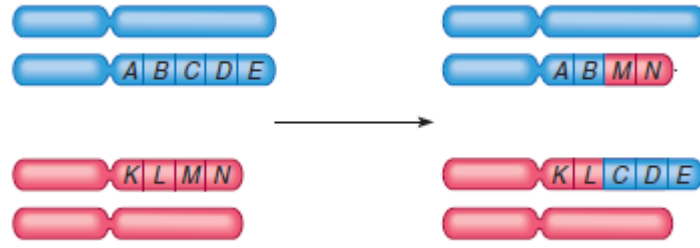


Şekil 2.6 Parasentrik (a) ve Perisentrik (b) İnversiyon oluşumu (NLM, 2012)

D. Translokasyon

Homolog olmayan kromozomlar arasında parça değişimi sonucu oluşan mutasyon tipidir. Translokasyonlar farklı şekillerde meydana gelebilirler.

- i. Basit translokasyon: Kromozomlardan birinde tek noktada kopma olur ve kopan parça başka bir kromozomun ucuna eklenir.
- ii. İnterkalar translokasyon: Kromozomlardan birinde iki noktadan kopma ile ara bölgeden kopan parça başka bir kromozomun ara bölgesine eklenir.
- iii. Karşılıklı (Resiprokal) translokasyon: İki kromozom arasında karşılıklı parça değişiminin olduğu bir durumdur (Şekil 2.7)(Tüylü vd., 2009). Bu translokasyon genetik bilginin kaybedilmemesi ya da kazanılmaması durumları ile inversiyona benzemektedir (Klug et al., 2012). Yaklaşık beşyüz kişide bir kişi karşılıklı translokasyon için taşıyıcı durumundadır (Lewis, 2009).



Şekil 2.7 Karşılıklı translokasyon (Lewis, 2009)

2.3.2 Gen mutasyonları ve sınıflandırılması

Genomdaki genlerin sayısında ve lokuslarında değişiklik olmaksızın, yapısında meydana gelen değişmelere gen mutasyonu ya da nokta mutasyonu adı verilir. Gen mutasyonları genel olarak üç şekilde meydana gelir.

A. Transisyon

Gen bölgesindeki bir pürin bazının diğer bir pürin bazı (A-G ya da G-A), bir pirimidin bazının diğer bir pirimidin bazı (C-T ya da T-C) ile yer değiştirmesi ile ortaya çıkan mutasyondur. Örneğin bazların yanlış eşleşme hataları ardından gerçekleşen DNA replikasyonu sonunda A:T baz çifti bulunması gereken yerde G:C baz çifti bulunur.

B. Transversiyon

Gen bölgesinde bir pürin bazının bir pirimidin bazı ile (A ya da G- T ya da C) bir pirimidin bazının bir pürin bazı ile (T ya da C- A ya da G) yer değiştirmesi şeklinde meydana gelen mutasyondur. Transversiyon DNA molekülünün replikasyonu sırasında meydana gelir ve replikasyon sonrasında, değişen DNA ipliğinde, A:T baz çiftinin yerine T:A ya da G:C baz çiftleri, G:C baz çifti yerine ise C:G ya da T:A baz çiftleri almış olur.

C. Çerçeve kayması (frameshift) mutasyonu

Genlerin çoğunlukla sık tekrar eden baz dizelerinin bulunduğu bölgelerde, bir ya da birkaç baz çiftinin eklenmesi yada çıkması ile meydana gelen mutasyondur. Bu tip bir mutasyon, DNA’ da baz çifti değişikliğinin olduğu yerden itibaren kodonlarda bir ya da birkaç nükleotitlik kaymaya neden olur. Bunun sonucunda kodlanan proteinin aminoasit sırası değişir ve farklı işleve sahip protein üretilebilir (Lewis, 2009; Tüylü vd.,2009; Klug et al.,2012).

Gen mutasyonları sınıflandırılması

Mutasyonların etkilerinin ve çeşitlerinin büyük değişikliğine göre genetikçiler mutasyonları birkaç farklı şekilde sınıflayabilir. Bu sınıflandırma şekilleri birbirinden tamamen ayrı değildir ve mutasyonun hangi özelliğini tanımladığına bağlıdır. Buna dayanarak üç farklı gruptandırma yapılabilir (Klug vd.,2009)

A. Kendiliğinden (spontan) olan ve uyarılmış mutasyonlar

Doğal olarak oluşan mutasyonlardır. Bu mutasyonun oluşumu ile hiçbir mutajen ilişkilendirilmemiştir ve genellikle genlerin nükleotit dizilerinde rastgele değişiklikler olarak kabul edilirler. Bu tür mutasyonların çoğu organizmada azotlu bazların yapısını değiştiren normal biyolojik ya da kimyasal işlemlerle ilişkilendirilir. Spontan mutasyonlar enzimatik DNA eşlenmesi sırasında oluşur. Genetik şifrelemede bir hata olduğunda, bu durum kodlanan proteinin aminoasit kompozisyonuna yansıyabilir. Eğer amino asit değişikliği bir proteinin yapısal ya da biyokimyasal aktivitesi için önemli ise fenotipik bir değişiklik ortaya çıkabilir.

Spontan mutasyonların aksine, herhangi bir dışsal etki ile oluşan mutasyona uyarılmış mutasyon denir. Uyarılmış mutasyonlar doğal ya da yapay ajanlar sonucu oluşabilir. Örneğin kozmik ve mineral kaynaklardan salınan radyasyon ve güneşten gelen ultraviyole radyasyonu, organizmaların çoğunun maruz kaldığı enerji kaynaklarıdır ve bu enerjiler uyarılmış mutasyonlara neden olan faktörlerdir.

Mutasyonların yapay olarak uyarıldıklarına dair ilk örnek Hermann J. Muller' in X ışınlarının *Drosophila*' da mutasyona yol açtığını rapor ettiği 1927 yılında gösterilmiştir. 1928' te Lewis J. Stadler, X ışınlarının arpa üzerinde aynı etkiyi yaptığını belirlemiştir (Klug vd., 2009).

B. Gametik ve somatik mutasyonlar

Mutasyonlar oluştukları hücre tipi ya da kromozomal bölgelere göre de somatik ve gametik mutasyonlar olarak sınıflandırılır. Somatik mutasyonlar vücutta gamet hücreleri dışında herhangi bir yerde olabilir. Somatik hücrelerde olan mutasyonlar gelecek nesillerle aktarılmazlar. Somatik hücrelerde resesif alleller oluşturan mutasyonlar organizma için nadiren önemlidir. Bu tür mutasyonların çoğunun ifadesi genellikle dominant allel tarafından maskelenir. Gametik mutasyon gametlerde oluşur. Gametik mutasyonların gelecek nesilleri etkileme potansiyelleri daha yüksektir ve bu nedenle daha da önemlidirler (Klug vd., 2009).

C. Mutasyonun diğer kategorileri

Köken veya oluşum nedenlerine ek olarak, mutasyonlar fenotipik özelliklerine göre de sınıflandırılabilir. En kolay gözlenen mutasyonlar morfolojik bir özelliği etkileyen mutasyonlardır. Görülebilen mutasyonlar olarak bilinen bu mutasyonlar normal ya da yabancıl tip fenotipi değiştirebilme özellikleri ile tanımlanırlar. Diğer bir sınıflandırmada besinsel ve biyokimyasal etkiler gösteren mutasyonlardır. Bakteri ve mantarlarda tipik bir besinsel mutasyon, bir aminoasit veya vitamini sentezlemedeki yetersizliktir. İnsanlarda orak hücre anemisi ve hemofili biyokimyasal mutasyon örnekleridir. Bu organizmalarda, bu tür mutasyonlar her zaman için özgün bir morfolojik özelliği etkilemese bile, bireyin genel sağlık durumu ve yaşam kalitesi üzerinde genel bir etkiye sahip olabilirler.

Hayvanların günlük ritimleri veya eşleşme davranışları değiştirebilen mutasyonlara *davranış mutasyonları* ve genlerin regülasyonunu yani düzenlenmesini etkileyebilen *regülatör mutasyonlar* da bir diğer sınıflandırmadır. Bir başka grupta organizmanın yaşaması için gerekli olan bir süreci etkileyen *letal (öldürücü)* mutasyonlardır. Bir genin protein kodlayan kısmındaki bir tripletteki bir nükleotitin değişmesi ile protein ürününde yeni bir triplet oluşumuna yol açan *yanlış anlamlı mutasyon (missense mutation)* ve bir diğer olası sonuçta tripletin bir durdurucu (stop) kodona dönüştüğü ve protein sentezinin sonlanmasına neden olan *anlamsız (nonsense)* mutasyondur (Klug vd., 2009).

2.4 Mutajenlerin DNA' ya Etki Şekilleri

2.4.1 Fiziksel mutajenler

Isı, ultraviyole ve X ışınları bu gruba dahildir. Fiziksel mutajenler arasında etki mekanizması en iyi çalışılmış olanı ultraviyole'dür. UV' nin 260 nm civarındaki dalga boyları nükleik asitler tarafından absorbe edilir. UV nükleik asitlerde özellikle pirimidin dimerlerine neden olmaktadır. Pirimidin dimerleri DNA replikasyonu ve transkripsiyonunu engeller. Normalde pirimidin dimerleri hücrede çeşitli mekanizmalarla tamir edilir. Bu dimerler normal mekanizmalarla tamir edilemeyecek düzeyde ise SOS denilen tamir mekanizması devreye girer. SOS, tamir esnasında hassas çalışmaz ve böylece mutasyonlara neden olur. Gamma ve X ışınları DNA' da kırıklar meydana getirir. Tek iplikte oluşan kırıklar kolayca tamir edildiği halde, her iki iplikte meydana gelen kırıklar doğru olarak tamir edilemez ve mutasyona neden olabilir. Bu nedenle ozon tabakasının korunması önemlidir (Ateş, 2002).

2.4.2 Kimyasal mutajenler

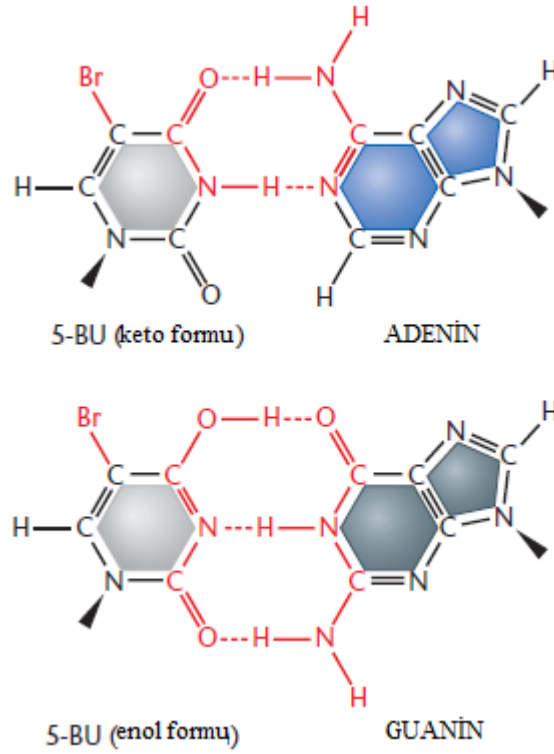
Kimyasal mutajenler etki şekillerine göre dört grupta incelenebilirler

- Baz analogları
- DNA bazlarını değişime uğratan kimyasallar
- Alkilleyici ajanlar
- Aromatik mutajenler

2.4.2.1 Baz analogları

Moleküler yapıları nükleik asitlerin yapısındaki bazlara benzeyen moleküllere baz analogları denir. Farklı iki bazla eşlenebilirler ve bundan dolayı mutasyonlara neden olurlar. Mutasyon replikasyon sırasında diziye katılan deoksiribonükleotitlerin baz analogu olmasından kaynaklanır. DNA replikasyonu sırasında, bazlara yapı olarak uygun substratlar onların yerine replikasyona katılır. Bu bileşikler deneysel olarak DNA hasarının ve bu hasarın yarattığı hücrel cevabın belirlenmesi çalışmalarında yaygın olarak kullanılır.

En yaygın olarak çalışılan baz analogları arasında halojenlenmiş 5-bromourasil, 5-fluorourasil ve 5-iyodourasil gibi türevleri yer almaktadır. Bunların tümü timin analogu olup, DNA replikasyonuna katıldıkları zaman timinin yerini alırlar ve Guanin ile eşleşirler (Şekil 2.8). Aynı şekilde adenin analogu 2-aminopürin de mutajenik özelliğe sahiptir (Ateş, 2002; Tüylü vd., 2009).

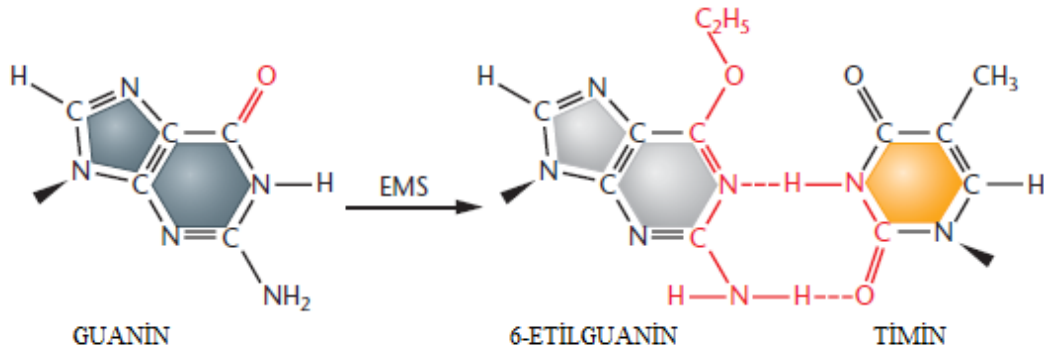


Şekil 2.8 5-bromourasilin adenin ve guaninle eşlenmesi
(Klug et al., 2012)

2.4.2.2 Alkilleyici kimyasallar

Alkilleyici ajanlar elektrofilik bileşikler olup negatif yüklü DNA ya alkil grubu eklerler. Fosfodiester bağlarındaki oksijenin alkilasyonu fosfotriesterlerin oluşumu ile sonuçlanır. Diğer yandan, alkillenme ile değişime uğrayan bazlarda şeker bağları zayıflar. Böylece bağlardaki zayıflamalar sonucu bazlarda kopmalar olur. Bu kimyasalların anlaşılacağı gibi etkileri için DNA sentezine gerek yoktur ama neden oldukları değişiklikler DNA sentezi ile sabit kılınır.

Alkilleyici kimyasallara örnek olarak hardal gazı, etil metano-sülfonat (EMS), metil metano-sülfonat (MMS), metil ya da etil nitrozamin, nitrozoguanidin (NG) gibi içinde karsinojenliği kanıtlanmış ya da şüpheli olan çok sayıda kimyasal vardır (Tüylü vd., 2009). Şekil 2.9’ da Etilmetan sülfonat (EMS) tarafından guaninin 6-etilguanine dönüştürülmesi ve 6-etilguaninin timinle eşlenmesi gösterilmiştir.



Şekil 2.10 Etilmetan sülfonat (EMS) tarafından guaninin 6-etilguanine dönüştürülmesi ve 6-etilguaninin timinle eşlenmesi (Klug et al., 2012)

2.4.2.3 DNA bazlarını değişime uğratan kimyasallar

Bu kimyasallar baz analogları gibi DNA' nın yapısına girmezler, ancak bazların yapısındaki bazı gruplarla reaksiyona girerek bazların değişmesine neden olurlar.

Nitröz asit (HNO_2), amino grubu içeren bazları deaminasyona uğratarak mutasyona neden olur. Adenin ve sitozin bazları, nitroz asidi ile deamine edildiğinde, adenin hipoksantine (HX), sitozin ise urasile dönüşür. A:T' nin G:C' ye değişimi ile ikinci replikasyon sırasında mutajenik bir transisyon oluşabilir. Nitröz asit bir bazı direkt olarak kodlamayan formuna değiştirir ve böylece etkisi için değişikliğin devamında DNA sentezi gerekli değildir.

Hidroksilamin (NH_2OH) hemen hemen her zaman sitozin ile reaksiyona girer sitozinin amino grubundaki hidrojen OH' a dönüşür. Reaksiyon sonucu oluşan türev adenin ile eşleşir. Sonuçta tek yönlü bir transisyon oluşur (Ateş, 2002; Tüylü vd., 2009).

2.4.2.4 Aromatik mutajenler

Bu gruptaki mutajenler, geniş hidrofobik yüzeylere sahiptirler. Kendileri gibi hidrofobik olan bazların arasına girerler. Komşu bazların birbirinden uzaklaşmasına neden olurlar. İki baz arasında açılmış olan mesafeye bir veya daha fazla baz ilavesi veya delesyonu olabilir. Sonuçta çerçeve kayması mutasyonu meydana gelir veya okuma çerçevesi değişir.

Akridin, profavin, fenantridin, azakuinakrin, benzakridin, kuinakrin, etidiyum bromid ve propidiyum diiyodid gibi mutajenler bu grubun önemli mutajenleridir. Kuinakrin ve azakuinakrin gibi bazıları aynı zamanda alkilleme özelliğine sahip olduğundan çerçeve kayması yanında transisyon tipi mutasyona da neden olur. Ayrıca bu tip mutajenler DNA tek zincirinin kırılmasına da neden olabilirler (Ateş, 2002).

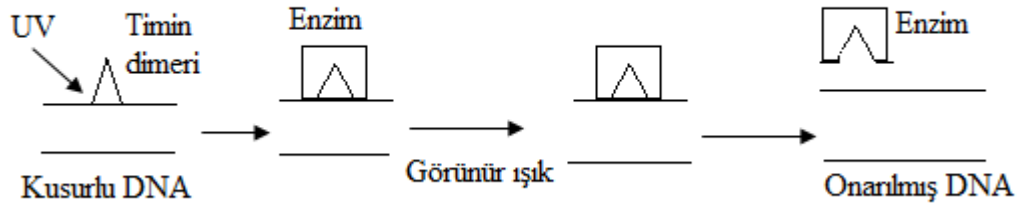
2.5 DNA Onarım Mekanizmaları

Genomik DNA' da ekzojen ve endojen etkenler sonucunda hasar meydana gelebilmektedir. Çeşitli DNA onarım mekanizmaları DNA' da meydana gelen hasarın tipine uygun olarak devreye girmekte ve hasar tamirinin gerçekleştirilmesi sonucu genomik kararlılık korunmakta ve hücre yaşamını sürdürebilmektedir (Onur vd., 2009).

2.5.1 Direkt onarım ya da hasarın geri döndürülmesi

2.5.1.1 Fotoreaktivasyon

Hasarın geri döndürülmesi onarım için en kolay yol gibi görünmesine karşın çoğu durumda termodinamik ve kinetik nedenlerden dolayı pek mümkün değildir. Bazı durumlarda enzim aracılığı (Fotoliyaz ve O-6-Metil-DNA-alkiltransferaz) ile gerçekleşen tek adımlı reaksiyonlar ile hasar onarılır. Siklobütan pirimidin dimerleri fotoliyaz enzimi tarafından ayrılarak hasar giderilir (Şekil 2.10). Reaksiyona fotoreaktivasyon denir (Debeleş-Bütünler ve Kantarcı, 2006).



Şekil 2.10 Bir timin dimerinin fotoreaktivasyon mekanizmasıyla onarımı
(Temizkan, 1999)

2.5.1.2 O-6-Metilguanin onarımı

O-6-metilguanin, alkilleyici ajanlar varlığında oluşur ve yüksek oranda mutajeniktir. O-6-metilguanin-DNA metil transferaz enzimi, DNA’ daki yanlış metillenen bazların CH_3 gruplarını kendi sistein rezidülerine transfer ederek normal guanin oluşumunu sağlar. Bunu yaparken enzim de geri dönüşümsüz olarak baskılanmış olur ve işlev dışı kalır. Bu onarımda enzimin özgünlüğü kadar sayısı önem kazanmaktadır (Onur vd ., 2009)

2.5.1.3 Basit tek zincir kırıklarının ligasyonu

X ışınları ya da peroksitler gibi bazı ajanlar DNA zincirinde basit kırıklara neden olabilmektedir. Bir zincirde meydana gelen basit kırıklar DNA ligaz enzimi ile hemen onarılmaktadır. Enzim enerji gerektiren bir reaksiyon ile 5’ fosfat grubu ile 3’ OH grubu arasındaki fosfodiester bağı oluşturarak onarımı gerçekleştirir (Klug and Cummings ., 2002; Cooper and Hausman., 2006).

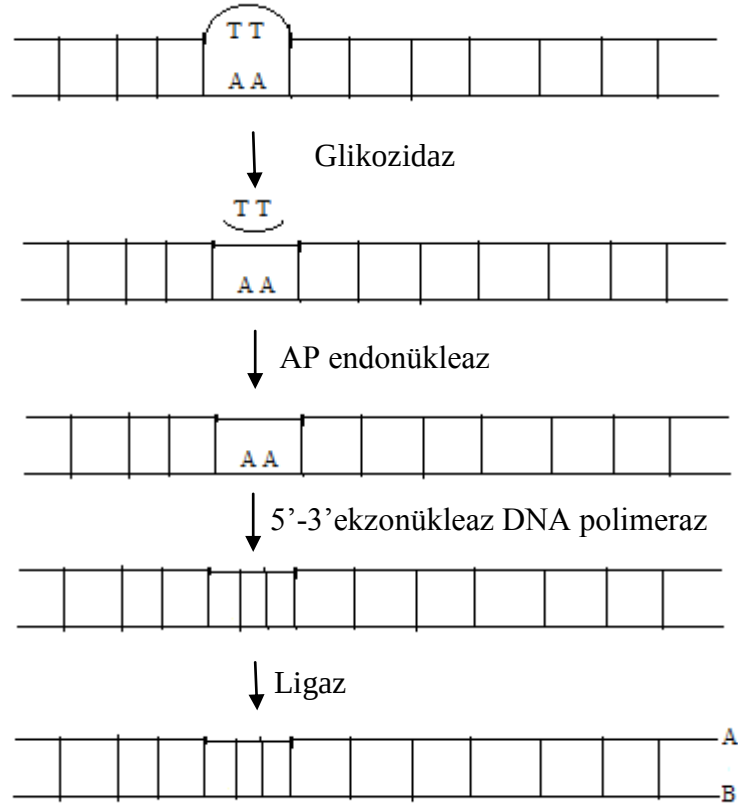
2.5.2 Eksizyon (kesip-çıkarma) onarımı

Tüm canlılarda gerçekleşen bir onarım mekanizmasıdır. Alkilleyici ajanların genotoksik etkilerini tolere edebilen bu sistem, pirimidin dimerlerini ışık gerektirmeyen bir reaksiyonla onardığı için karanlık onarım olarak da adlandırılır. Bu onarım tipinde hasarlı bölge ya da nükleotitler, endonükleaz tarafından enzimatik olarak tanınır ve kesilip çıkarılır. Oluşan boşluk DNA polimeraz ile tamamlanır ve son iki nükleotit DNA ligazın katalizlediği fosfodiester bağı ile birleşir (Tüylü vd., 2009).

Kesme-çıkarma iki şekilde meydana gelebilir:

Baz çıkarma onarımı: DNA zincirinde bulunan hatalı bir bazı DNA glikozilaz adı verilen bir enzim tanır ve şeker molekülü ile olan bağını hidrolize ederek zincirden koparır. Bunun sunucunda DNA baz dizisi üzerinde, küçük bir boşluk şeklinde meydana gelen bazını kaybetmiş apürinik ya da apirimidinik bölgeler (AP), AP endonükleaz tarafından tanınır ve iplik kesilir. Bu noktada DNA polimeraz I devreye girerek ekzonükleaz aktivitesiyle, yeni iplik sentezini yapar ve eksik olan bazın yeri, doğru nükleotitle tamamlanır. En son olarak DNA ligaz fosfodiester bağı yapımını katalizler. Şekil 2.11’ de bir timin dimerinin kesip çıkarma onarımı ile yok olması gösterilmiştir.

Nükleotit çıkarma onarımı: DNA zincirindeki hatalı bazlar, bazı özgül endonükleazlar tarafından tanınarak 12 nükleotitlik parçalar halinde kesilip çıkarılır. Sonra DNA helikaz kesilen kısmı uzaklaştırır ve oluşan boşluk DNA polimeraz aktivitesiyle tamamlanır. Bu sayede, yalnızca pirimidin dimerleri değil, DNA sarmalının bükülme ya da katlanmasını uyaran ciddi hasarlar da onarılır (Tüylü vd., 2009).



Şekil 2.11 Bir timin dimerinin kesip çıkarma onarımıyla yok olması (Temizkan, 1999)

2.5.3 Rekombinasyon onarım

Bu sistem, kesip-çıkarma hatalı bir E.coli suşunda keşfedilmiş ve ilk olarak Miroslav Radman tarafından ileri sürülmüştür. Bu sistem, hasarlı DNA' nın onarımdan kaçmasından ve tam olarak replike edilmede başarısız olmasından sonra aktif hale getirilmektedir (Klug and Cummings, 2002) .

Hücrelerde bu tip onarımda kullanılacak uygun bir DNA kaynağı genellikle bulunur. Örneğin, zarar gören bölge replikasyon çatalı oluşumuyla tek zincirde kalmışsa replikasyon sonunda yavru DNA moleküllerinden biri normal diziyi taşır. Zarar replikasyon geçirmemiş bölgede ve iki zincirde birden olsa bile, özellikle hızla üreyen bakteri hücrelerinde aynı DNA molekülünün sağlam bir kopyası bulunabilir. Gelişmiş organizmaların hücreleri de genellikle diploiddir, yani her kromozomun bir benzeri vardır. Rekombinasyon onarımının anahtarı, zarar görmüş bölgenin her iki tarafındaki

dizileri zarar görmemiş DNA molekülündeki homolog bölgeye bağlayacak enzimdir. Bu enzim kaybolmuş bilgiyi taşıyan parçayı tanıyarak kritik eşleşmeyi yaptırır (Temizkan, 1999).

Örneğin pirimidin dimeri gibi herhangi bir çeşit lezyon bulunduran DNA replike olurken, DNA polimeraz önce lezyonda duraklar ve yeni sentezlenen zincir boyunca bir boşluk bırakarak onun üzerinden atlar. Buna (tek zincir boşluklarına) bir yanıt olarak, RecA proteini rekombinasyonel bir değiş-tokuş işlemi yürüterek başlangıçta hasarsız komplementer zincirde bulunan bir segmenti (parçayı) bu boşluğa sokup onu tamamlar. Bu işlem “verici” zincirde bir boşluk bırakır. Bu boşluk daha sonra, replikasyon ilerlerken onarım sentezince doldurulur (Klug and Cummings, 2002).

2.5.4 SOS onarımı

Bakterilerde DNA’ da yapısal zarara neden olan ya da replikasyonu engelleyen birçok uygulama SOS cevap olarak adlandırılan bir seri karmaşık fenotipik değişime yol açar (Temizkan, 1999).

DNA sentezi esnasında, bir lezyonun üstünden atlamak yerine (replikasyon sonrası onarımda olduğu gibi), sistem DNA polimerazın lezyon karşısında replikasyonuna olanak veren koşulları hazırlar. Boşluk oluşturulmazken replikasyonun doğruluğundan (hatasız işlemesinden) fedakarlık edilerek uyum sağlanır. Bu nedenle sistem hataya meyilli olarak tanımlanır. Phil Hanawalt ve Paul Howard-Flanders, LexA, RecA ve uvr de dahil olmak üzere 20 kadar farklı genin ürünlerinin SOS yanıtında görev yapmak üzere DNA hasarı tarafından uyarıldığını bulmuşlardır (Klug and Cummings, 2002).

SOS genleri, bazların eşleşme özelliklerini değiştiren zararlardan çok, özellikle DNA sentezini durduracak kadar şiddetli olan zararlar tarafından teşvik edilirler. Çünkü böyle durumlarda DNA replikasyonu yapamadığı için hücrenin yaşamı tehlikeye girmektedir (Temizkan, 1999).

SOS cevapta RecA proteini aktif hale geçerek, SOS genlerinin anlatım yapmalarını engelleyen baskılayıcı protein olan LexA represörünü yok eder. Bu şekilde RecA rekombinasyonla hem de aşağı yukarı 15 kadar SOS geninin anlatımını teşvik ederek DNA onarımını kolaylaştırır.

SOS cevaptaki reaksiyonlar, *E.coli*'de onarım için temel enzim olan RecA proteini ile LexA baskılayıcısının etkileşimiyle gerçekleşir. Cevabın başlangıç aşaması zarar verici uygulama tarafından RecA'nın aktif duruma geçirilmesidir. Aktif hale geçen RecA proteaz LexA geni tarafından şifrelenen bir baskılayıcı proteinle etkileşime girer. LexA proteinin zarar görmemiş hücrelerde birçok operonda baskılayıcı olarak iş görür. LexA proteininin RecA ile etkileşimi, baskılayıcı proteinin proteolitik parçalanmasını başlatır; bu da baskılayıcının bağlı olduğu operonların çalışmasını teşvik eder (Temizkan, 1999).

RecA ve LexA, SOS devresinde karşılıklı hedeflerdir. RecA LexA'nın kesilmesini sağlayarak onun baskılayıcı etkisini yok eder. LexA ise hem RecA hem de kendi geninin anlatımını baskılar. Bu nedenle SOS cevap RecA ve LexA proteinlerde artışa yol açar. Bu devrenin hücre için esas önemi, normal biçime hızla dönebilme yeteneğine bağlanabilir. Çünkü teşvik edici işaret yok olduğunda RecA proteinin LexA'yı dengede tutma yeteneği yok olur. O andan itibaren, LexA geni yüksek düzeyde anlatım yapmaya başlar. RecA'nın yokluğunda LexA proteini kesilmemiş biçimiyle hücrede hızla birikir ve SOS genlerinin anlatımını engeller (Temizkan, 1999).

2.5.5 Hataya eğimli onarım

Özel bir uygulamayla bir veya birkaç nükleotidinde pürin kaybı meydana getirilmiş tek zincirli ϕ X174 DNA sı ile bulaştırılmış hücrelerde oluşan faj dölllerinde pürinsiz DNA molekülünün bu bozukluğu onarılır fakat genellikle bu sırada mutasyon meydana gelir; çünkü tek zincirli DNA molekülünü onarmak üzere doğru bazın seçilmesini sağlayacak bilgi yoktur. Bu nedenle böyle bir mekanizmaya hataya eğimli onarım adı verilir.

Bu onarım mekanizması hücre için büyük olasılıkla en son başvurudur; ancak doğrudan onarım için kalıp bulunmadığında kullanılır. Hatalı da olsa replikasyonun yapılması hiç yapılmamasından daha iyidir. Doğal olarak mutasyon şansı yüksektir. Hatta bu durumda DNA onarımı mutasyon nedenidir (Temizkan, 1999).

Hataya eğimli onarım mekanizmasına ilişkin önemli bir kanıt *E.coli*'de iki genin (umuC ve umuD) olaya katılmasıdır. Bu genler başlangıçta, UV ışınlanması ile meydana gelen mutagenesi engelleyen mutasyon noktaları olarak tanımlanmışlardır. Gerçekte bunlar SOS genleridir. Buna göre, ürünleri ancak hücre bir SOS cevabı teşvik edici bir uygulama gördükten sonra etkili olacak şekilde sentez edilir. UV ışığına daha fazla duyarlılık sağlayan bir geni taşıyan bakteri hücrelerinde, umuC ve umuD UV'nın DNA da meydana getirdiği kusurları onararak yaşamının devam etmesine olanak verirler. umuC ve umuD genleri SOS genleri olduğundan, RecA proteini hataya eğimli onarımda, en azından dolaylı biçimde, umuC ve umuD yi teşvik etmek için gereklidir. Bununla beraber genetik deneyler RecA proteininin hataya eğimli onarımda doğrudan iş gördüğüne de işaret etmektedir (Temizkan, 1999).

Hataya eğimli onarım, replikasyon sırasında uygun kalıp bulunmasa bile umuC ve umuD proteinlerinin bir bazın uzayan zincir içine girmesini sağlaması ile çalışır. Bu olaya *aşırma sentezi* denir. Aşırma sentezinde DNA polimera kalıp üzerinde uygun olmayan yerlere geldiğinde duraklamaz ve hatalı baz çiftleri oluşturarak da olsa sentezi devam ettirir (Temizkan, 1999).

2.5.6 Yanlış eşleşmeleri düzeltme onarımı

E.coli'de mutH, mutL ve mutS genleri tarafından şifrelenen bir yanlış eşleşmeyi düzeltme enziminin bu yanlış eşleşmeleri replikasyon sonrasında yok ettiği bilinmektedir. Bu enzim yeni replikasyon geçirmiş DNA' da yanlış eşleşmiş baz çiftlerini tanır ve yanlış nükleotidi taşıyan zincirde büyükçe bir parçayı yok eder. Daha sonrada DNA polimerazın doğru bazları yerleştirerek oluşan boşluğu kapatmasını sağlar. Bu onarıma yanlış eşleşmeleri düzeltme onarımı (hex onarımı) adı verilir. Düzeltme enzimi aynı zamanda ufak adisyon (ekleme) ve delesyonları (yok etme) da

tanır; böylece baz değişimleri kadar çerçeve kayması mutasyonlarını da engeller (Temizkan, 1999).

2.6 Ksenobiyotiklerin Biyotransformasyonu

Metabolizma, hayatın devamı için gerekli olan ve organizmada oluşan tüm kimyasal reaksiyonlar olarak tanımlanabilir. Diğer taraftan bir organizma için yabancı olan kimyasal maddelerin (ksenobiyotiklerin) kimyasal değişimleri de "metabolizma" olarak tanımlanırsa da *biyotransformasyon* terimi bu anlamda daha uygun bir deyim olmaktadır (Vural, 2005).

Besinle alınan doğal bileşikler dışında kalan ve çeşitli yollardan insan vücuduna giren kimyasal maddelere ilaçlar da dahil ksenobiyotik adı verilir. Çağdaş yaşamda ilaçtan başka, her gün insan vücuduna çeşitli şekillerde birçok ksenobiyotik girer; bunların önemli türleri besin aditifleri, insektisid ve fungusid atıkları, havayı ve suları kirleten atıklar, egzoz ve sigara dumanıdır. Biyotransformasyon enzimleri genellikle ksenobiyotiklerin zararlı etkilerini azaltmaya yönelik etkinlikleri ile vücudu onlara karşı korurlar (Kayaalp, 2002).

Yabancı kimyasal maddelerin biyotransformasyonunu kataliz eden başlıca enzimler karaciğerde yerleşmişlerdir. Bu nedenle karaciğerin, kan dolaşımı ile karaciğere gelen kimyasal maddeleri, depolanma, dağılım ve safra ile atılımlarından önce, metabolize etme kapasitesi çok etkindir. Ayrıca biyotransformasyon, karaciğer dışında sınırlı olmak üzere akciğer, böbrek ve barsakta; daha da sınırlı olarak deri, testis, plasenta ve adrenal bez de gerçekleşebilir (Vural, 2005).

İlaçların ve diğer ksenobiyotiklerin vücutta maruz kaldıkları enzimatik olaylar, kimyasal değişimin türüne göre dört ana grupta toplanır.

- Yükseltgenme
- İndirgenme
- Kopma
- Konjügasyon

Bunlardan ilk üçüne Faz I reaksiyonları denilir. Diğerine de Faz II reaksiyonu adı verilir (Kayaalp, 2002). Faz I reaksiyonları biyotransformasyonun en önemli yolunu oluşturur. Özellikle oksidasyon-redüksiyon (redoks) reaksiyonları ve bunları kataliz eden enzim sistemleri yabancı kimyasal maddelerin biyotransformasyonunda geniş yer alırlar. Bu sistemde rol oynayan en önemli enzim sistemleri ise sitokrom P-450 sistemi ve karışık fonksiyonlu amin oksidazdır (Vural, 2005).

Sitokrom P450 faz I reaksiyonları içinde en önemli enzim grubudur. Şu anda insanda 57' den fazla aktif P450 geninin olduğu bilinmektedir (Rodriguez-Antona and Ingelman-Sundberg, 2006).

Sitokrom P450 sadece bir enzim değil, aynı zamanda demir içeren izoenzimler ailesinden bir proteindir. Sitokrom P450' nin yüzlerce izoformu vardır. Bunlardan bazıları ortamda kendiliğinden bulunmasına karşın, bir kısmı uyarıyla, özellikle ekzojen kimyasal bir maddenin oluşturduğu bir uyarıya yanıt olarak sentezlenirler. Spesifik bir substratın, bir sitokrom P450 enzimi bulunur, bu spesifik özellik görecelidir. Kendi izoformu olmadığında metabolik reaksiyonun durması söz konusu değildir. Sitokrom P450 sentezinden sorumlu genler farklı kromozomlara yayılmıştır. Sitokrom P450 enzimi ile katalize edilen biyotransformasyonlar demirin oksidoredüksiyon derecesindeki değişiklikler sonucu meydana gelmektedir (Dökmeci, 2007).

Konjugasyon birçok dokuda meydana gelen bir Faz II reaksiyonudur. Enzimatik yolla glukoronik asit, sülfat, glutatyon ya da bir asetat gibi aktive olmuş bir molekülün,

bir ilacın ya da Faz I de oluşmuş bir metabolitin fonksiyonel bir grubuna bağlanması olayıdır (Dökmeci, 2007).

2.7 Kısa Zamanlı Bakteriyel Mutajenite Test Sistemleri

Bakteriyel test sistemleri; çeşitli kimyasalların potansiyel karsinojenitelerinin taranması, kompleks karışımlardan biyolojik olarak etkin bileşiklerin ayrıştırılmasında, prokarsinojenlerin öncül ya da nihai metabolitlerinin saptanmasında, vücut sıvılarının ve atıklarının test edilmesiyle insanların mutajen ve karsinojenlere maruz kalma düzeylerinin izlenmesinde, kimyasalların mutajenik etki mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalarda, konakçılar üzerine yapılan (host mediated) deneylerde, karsinojen ve mutajenlerin neden olduğu özgül DNA hasarlarının tiplerini saptamada kullanılmaktadır (Öksüzoğlu, 1997).

Mutajenlerin saptanması için geliştirilen kısa zamanlı test sistemleri ve bunların dayandığı genetik ve biyokimyasal yollar Çizelge 2.1’ de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Mutajenlerin saptanması için geliştirilen kısa zamanlı test sistemleri ve bunların dayandığı genetiksel ve biyokimyasal yollar (Akyıl, 2006).

Kısa Zamanlı Testler	İzlenen genetiksel Biyokimyasal Yol
1. <i>Salmonella typhimurium</i>	Histidin okzotrofları
2. <i>Escherichia coli</i>	Arginin-triptofan okzotrofları Profaj indüksiyonu Onarım eksikliği olan suşların büyümelerinin inhibisyonu SOS cevabı
3. <i>Bacillus subtilis</i>	DNA onarımı hatalı suşlar
4. <i>Neurospora crassa</i>	Adenin okzotrofları
5. Çin hamsteri ovaryum ve akciger hücreleri	HGPRT (Hipoksantinguanin fosforiboziltransferaz) lokusunda mutasyonlar
6. Fare karaciğeri epitel hücreleri	8-Azaguanine dirençlilik
7. <i>Drosophila melanogaster</i>	Kromozomal hatalar
8. Suriye hamsteri embriyo hücreleri	Morfolojik transformasyonlar
9. Çin hamsteri hücreleri	Kardeş kromatid değişimi
10. İnsan periferik lenfositleri	Kromozomal hatalar

2.7.1. Ames testi

Dr. Bruce Ames tarafından geliştirilmiş ve Ames testi olarak da adlandırılan *Salmonella*/mikrozom test sistemi kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılmasında en yaygın olarak kullanılan, mutojen-karsinojen etkisi en iyi bilinen ve geçerliliği en fazla kabul edilmiş kısa zamanlı bakteriyel test sistemlerinden birisidir (Maron and Ames 1983).

Bu teste, histidin operonunda bulunan çeşitli genlerdeki farklı mutasyonlar içeren *Salmonella* suşları kullanılır. Bu suşlarda meydana getirilen ilave mutasyonlar, çok çeşitli maddelere karşı bakteriyi daha duyarlı hale getirir. Bu suşlar *Salmonella typhimurium* LT2 atasal suşundan in vitro mutasyonlarla elde edilmiştir (Mortelmans and Zieger, 2000).

2.7.2 S.O.S kromotest Sistemi

S.O.S. kromotestinin temeli, *E.coli*'de hasarlı DNA da SOS cevabının uyarılmasına yöneliktir. *E.coli*'de SOS sisteminin genel reseptörleri ile gen kontrol edildiğinden S.O.S. kromotest DNA hasarlarını tespit etme olanağı sağlar (Kasamatu et al., 1996).

2.7.3 Bakterilerde Fluctuation testi

Bu testte birbirinden bağımsız gelişme gösteren küçük ve çok sayıda tekrardan oluşan mutasyon sayısı ölçülür. Bu test ilk kez Imris ve Dalbrnek tarafından bakteri mutantlarının seçici bir ortama adaptasyondan ziyade rastgele mutasyonlardan dolayı olduğunu kanıtlamak için kullanılmışlardır. Mutajen tarama testi olarak ilk kez 1974' te Voogd ve arkadaşları tarafından ve *Klebsiella pneumoniae*, *E.coli* ve *Citrobacter freundii* kullanılarak yapılmıştır. Bu testte de metabolik aktivasyon için S9 fraksiyonları kullanılabilir. Fakat S9 fraksiyonları hücrenin yapabildiği metabolik aktivasyonlarının tümünü yapamazlar. S9 yerine karaciğerden perfüzyon yolu ile elde edilen hepatositler

kullanılabilir. Fluctustion testi sıvı ortamda yapıldığından hepatositler aktivitelerini koruyabilirler (Bağcı, 1985).

2.7.4 Bacillus subtilis onarım testi

Bu test DNA ile reaksiyona giren ve DNA'ya hasar veren mutajenlere karşı DNA onarımı veya rekombinasyon yapan bakterilerin yapamayan mutant suşlara göre farklı cevap vermeleri esasına dayanmaktadır. Deneyde kullanılan iki suştan biri mutant diğeri yabancıl tip olmaktadır (Bağcı, 1985).

2.7.5 Profaj indüksiyon testi

Bu test lizojenik bakteri kromozomlarında bulunan profajın kimyasal mutajenler etkisiyle uyarılarak litik bir büyüme göstermesi ve konakçı hücreyi öldürmesi esasına dayanır.

Ilımlı fajların indüksiyonunda enfekte eden fajların birçoğu konakçı hücre içinde çoğalarak konakçıları öldürür ve çok azıda DNA'sını konakçı kromozomuna entegre ederek profaj durumuna geçer. Profaj taşıyan konakçı hücrelerine lizojen denir. Lizojenik bakterilerdeki profajlar kendiliklerinden konakçı kromozomlarından çıkıp, bağımsız olarak kendilerini çoğaltabilecekleri gibi, ısının artması, konjugasyonla alıcı bir hücreye (F⁻) geçmeleri, timin oksotroflarının timinsiz ortama aktarılmaları ve nihayet konakçı hücrelerin DNA'yı etkileyen çeşitli fiziksel ve kimyasal mutajenlere maruz bırakılmaları gibi durumlarda da uyarılarak litik büyümeye başlarlar. Profajın bu şekilde uyarılması sıklığı ölçülerek maddelerin mutajenik potansiyelleri ölçülebilir. Uyarılabilen lizojenik sistemler arasında *Escheria coli* K-12, *Micrococcus lysodeiktitous* 53-40 (H-5), *Agrobacterium tumefaciens* B6, *Bacillus megatherium* 899, *Pseudomonas sureginosa* HAC-246, *Salmonella thyphimurium* LT gal⁻ ve *Bacillus cereus* 6464 sistemleri bulunur (Bağcı, 1985).

3. MATERYAL ve METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Kimyasal maddeler

O-Nitrophenly- β -D-galaktopyranoside (ONPG), 5-bromo-4chloro-3-indoly- β -D-galaktoside (Xgal), sodium dodecyl sulfate (SDS) ve yeast extract Sigma'dan, ampicillin ve chloramphenicol Fuluka'dan; dimethyl sulfoxide (DMSO), chloroform ve β -merkaptetoetanol Merck'ten sağlanmıştır.

3.1.2 Deneyimizde araştırılan benzotiyazollerin tanıtılması

Test ettiğimiz benzotiyazol türevleri Üniversitemiz Kimya Bölümünden Doç. Dr. Funda Tay ve arkadaşları tarafından sentez edilmiştir ve ilaç hammaddesi olarak kullanılması amaçlanmaktadır. Benzotiyazollerin kimyasal yapısı ve fiziksel parametreleri Çizelge 3.1 de verilmiştir.

3.1.3 Besi ortamları, çözeltiler ve tamponlar

LB broth (sıvı ortamı)

Umu test suşlarının gecelik kültürlerinin hazırlanmasında kullanılır.

300 ml için;

NaCl	3 g
Bacto tripton	3 g
Yeast extract	1,5 g
Ampisilin	7,5 mg
Kloramfenikol	1,5 mg

TGA ortamı:

Test suşlarının üretilmesinde kullanılır.

300 ml için;

Bacto tripton	3 g
NaCl	1,5 g
Glukoz	0,6 g
Ampisilin	6 mg

M63 ortamı:

UmuC – LacZ füzyonunun indüklenebilirliğini kontrol etmek için STA ortam plaklarının hazırlanmasında kullanılır.

1000 ml için;

Difco minimal agar	15 g
KH ₂ PO ₄	13,6 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 g (KOH ile pH 7 'ye ayarlanır)

Z Tamponu:

β -galaktozidaz enzim aktivitesinin ölçülmesinde kullanılır.

1000 ml için;

Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	16,1 g
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	5,5 g
KCl	0,75 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,246 g
β -merkaptotanol	2,7 ml

Son hacim 1000'e tamamlandıktan sonra pH 7' ye ayarlanır.

STA ortamı:

UmuC – LacZ füzyonunun indüklenebilirliğini kontrol etmek için kullanılır.

1000 ml için:

Laktoz (%20' lik)	2 ml
Glukoz (%20'lik)	0,5 ml
Triptofan (%1' lik)	2 ml
Treonin (%1' lik)	2 ml
Histidin (%1' lik)	2 ml
Urasil (%1' lik)	2 ml
Tiamin (%1' lik)	2 ml
Ampisilin (%1' lik)	2 ml
Xgal (20 mg/ml DMSO)	2 ml
M63 ortamı	983,5 ml

ONPG çözeltisi (4mg/ml):

β -galaktozidaz enziminin substratı olarak hazırlandı. Fosfat tamponunun (pH=7) 100 ml'sine 400 mg ONPG eklendi.

100 ml için:

61 ml 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

39 ml 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

Fosfat Tamponu:

100 ml için:

0.1 M Na₂HPO₄·7H₂O 61 ml

0.1 M NaH₂PO₄·H₂O 39 ml

3.2 Metod

3.2.1 Umu-test sisteminde kullanılan bakteri suşları

***Salmonella thyphimurium* NM 2009**

Normalin üstünde O-Asetiltransferaz (O-AT) etkisine sahip olan bir suştur. Bu suş, O-AT geninin vektör bir plazmid olan pACYC 184 içine subklonlanmasıyla oluşturulan pMN12 plazmidinin, TA 1535 / pSK 1002 içine yerleştirilmesiyle oluşturulmuştur (Oda et al., 1993).

***Salmonella thyphimurium* NM 3009**

Normalin üzerinde O-AT ve Nitroredüktaz (NR) etkisine sahip olan bir suştur. Bu suş hem O-AT hem de NR genlerinin vektör bir plazmid olan pACYC içine subklonlanmasıyla oluşturulmuş pNM13 plazmidinin TA 1535 / pSK 1002 içine yerleştirilmesiyle oluşturulmuştur. NM 3009 suşu atasal suşa göre, O-asetiltransferaz etkisi açısından 13 misli, nitroredüktaz aktivitesi açısından ise 3 misli yüksek etkiye sahip olduğu için nitroarenlerin genotoksik aktivitesini saptamada çok büyük bir duyarlılık gösterir (Oda et al., 1993).

3.2.2 Bakteri suşlarının genetik işaretlerinin kontrolü

rfa mutasyonunun kontrolü

Bu mutasyon, bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasını kodlayan genlerde meydana gelir. Hücre duvarının lipopolisakkarit bariyerinin kısmen yok olmasını sağlayan rfa mutasyonunun sonucu normalde hücre duvarından geçemeyen büyük moleküllerinin hücre içine girişi kolaylaştırılmıştır. *Salmonella thyphimurium* NM 2009 ve NM 3009 suşunun gecelik kültüründen alınan 0,1 ml' lik örneklerden nutrient agarlı plaklara ekim yapıldı. Filtre kağıdından hazırlanmış disklere 10 ml kristal viyole çözeltisi (1 mg/ml) emdirilerek plağın ortasına yerleştirildi. Plaklar bir gece 37 °C de inkübe edildikten sonra diskin etrafında inhibisyon zonu gözlemlendi (Ames et al., 1973). Diskin etrafındaki şeffaf bölge büyük bir molekül olan kristal viyolenin bakteri içerisine girip, onu öldürmesine izin veren rfa mutasyonunun varlığını doğrulamaktadır.

uvrB mutasyonunun kontrolü

uvrB mutasyonunun varlığı bakterilerin UV ışınlarına duyarlılıklarına bakılarak kontrol edildi. Test suşlarının gecelik kültürlerinden alınan örnekler nutrient agarlı plaklara tek koloni şeklinde ekildi. 37 °C de gece boyunca üreyen koloniler steril kürdanlarla alınarak nutrient agarlı plaklara çizgi testi yöntemiyle ekildi. Bu plaklardan birinin kapağı açılıp, 15 watt'lık gr misidal UV lambası altında 33 cm uzaklıktan 8 sn süreyle ışınladı, diğer plak ise kontrol plağı olarak kullanıldı. Sonra her iki plak da 37 °C de bir gecelik inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün uvrB mutasyonu içeren suşların kontrol plağında üreyip, UV ile ışınlanmış plaklarda ise üremediği gözlemlendi (Ames et al., 1973).

UmuC-LacZ füzyonunun indüklenabilirliğinin kontrolü

UmuC-LacZ füzyonunun indüklenebilirliği 4-nitrokinolin 1-oksit (4NQO) gibi bir genetik ajan kullanılarak saptandı. Test suşlarının gecelik kültüründen alınan 0,1 ml'lik örnek, STA plaklarına ekildi ve petrinin ortasına 10 µl 4NQO (10 mg/ml) nokta şeklinde damlatıldı. 37 °C de bir gecelik inkübasyondan sonra, inhibisyon zonu çevresinde mavi bir halkanın gözlenmesi UmuC-LacZ füzyonunun indüklenebilirliğini göstermektedir.

3.2.3 Test suşlarının saklanması

Genetik işaretleri doğrulanmış olan *S.thyphimurium* NM 2009 ve *S.thyphimurium* NM 3009 test suşlarının bu özelliklerini kaybetmeden uzun süre saklanabilmeleri için bu suşların donmuş örnekleri hazırlandı. Bunun için *S.thyphimurium* NM 2009 ve *S.thyphimurium* 3009 suşlarının LB ortamındaki gecelik kültürüne 1/10 olacak biçimde DMSO (Dimetilsülfoksit) eklenerek yavaşça karıştırılır ve daha sonra 1,5 ml' lik soğuğa dayanıklı plastik tüplere dağıtılarak kuru buz içerisinde hemen dondurulur ve -70 °C lik derin dondurucuya kaldırılır (Oda et al., 1993).

3.2.4 Test suşlarının üreme eğrilerinin çıkarılması

S.thyphimurium NM 3009 test suşlarının üreme eğrileri çizilerek, zamana karşılık absorbans (OD₆₀₀) değerleri ve ml'deki canlı bakteri sayısı verilmiştir. Dolayısıyla kültürün (OD₆₀₀) değeri okunarak ml'deki canlı bakteri sayısını tahmin etmek mümkün olmuştur. *S.thyphimurium* NM 3009 için ise donmuş kültürden alınan 0,1 ml örnek, 20 ml LB ortamı içeren 50 ml' lik erlene ekildi ve 37 °C lik etüvde 110 rpm'de gece boyu inkübe edildi. Ertesi sabah absorbansı yaklaşık 1,4 olan gecelik kültürden 6 ml alınarak 300 ml TGA ortamı bulunan 500 ml' lik tek bir erlene ekim yapıldı (1/50 oranında) ve 37 °C de, 175 rpm de inkübe edildi.

3.2.5 Sitotoksik etkinin saptanması

Umu test sisteminde kullanılan kimyasal, bakteri kültürü ile inkübe edildikten sonra OD₆₀₀ de bakteri yoğunluğu okunur ve kontrole göre yoğunluğu düşürülen dozlar sitotoksik olarak tanımlanır.

3.2.6 β -Galaktozidaz aktivitesinin ölçülmesi

β -Galaktozidaz aktivitesi Quillardet ve Hofnung (1985)' ın yöntemine göre saptandı. Buna göre β -Galaktozidaz aktivitesinin ölçülmesi için ayrılan tüplere 1,35 ml Z tamponu eklenerek 37 °C lik su banyosunda 5-10 dk inkübasyonla sıcaklığın eşit olması sağlandıktan sonra ONPG (4mg/ml) çözeltisinden 0,3 ml eklenerek reaksiyon başlatıldı. Renk oluşumu için uygun bir süre beklendikten (10-120 dk) sonra her tüpe 1 M Na₂CO₃ eklenerek reaksiyon durduruldu. Test tüpleri 420 nm de okundu ve bu değerler ünite hesaplarında kullanıldı.

3.2.7 Test edilecek kimyasalların konsantrasyonlarının hazırlanması

Test edilecek kimyasallar dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözüldü. Kimyasalların maksimum çözündükleri konsantrasyonlar saptandı ve kimyasalların genotoksisitesini saptamak için genellikle kimyasalların maksimum çözündükleri en yoğun konsantrasyondan başlandı (Von der Hude et al., 1988; Reifferscheid et al., 1991). Bu konsantrasyondan başlayarak 1/10 oranında seri sulandırma yapıldı. Doza bağlı genotoksik etki enzim aktivitesi hesaplanarak ölçüldü. Kimyasalların maksimum çözündükleri konsantrasyonlar, genellikle bakteriler için sitotoksik olarak bulundu. Sitotoksik olan konsantrasyonların kesin bir şekilde görülebilmesi için kimyasalların maksimum çözüldüğü konsantrasyonlardan farklı miktarlarda alındı (10 μ l, 15 μ l, 20 μ l gibi) ve miktar artışına bağlı olarak sitotoksik etkininde arttığı gözlemlendi. 1/10 seri sulandırım yapılarak hazırlanmış olan farklı konsantrasyonlardaki kimyasal değer bir ya da iki noktada enzim aktivitesinde normalin üzerinde bir artış gösterdiyse bu konsantrasyonların altında ve üstünde yer alan ara konsantrasyonlar hazırlanarak

indüksiyonun doğruluğu saptandı. Deneyimizde bu ara konsantrasyonlar 1/2, 1/4 ve 1/8 oranında sulandırım yapılarak hazırlandı.

Çalışılan nitroarenlerden pozitif kontrol olarak kullanılan 4NQO DMSO'da çözülmüştür. 4QON'nun genotoksik etkisini çalışmak için ilk olarak 4QON'nun maksimum çözüldüğü konsantrasyondan başlayarak 1/10 oranında seri sulandırma yapıldı. Bu ilk deneylerde sitotoksik noktadan (maksimum çözüldüğü nokta 150 µg/assay) hemen sonraki ilk noktada (15µg/assay) enzim aktivitesinde normale göre bir artış görüldü. Bu ilk deneylerden sonra 150 µg'dan başlayarak 1/2 (75µg), 1/4 (37,5µg) ve 1/8 (18,75µg) oranında sulandırım yapılarak 15 µg/assay ve 1,5 µg/assay arasındaki ara konsantrasyonlar hazırlanıp yeni deneyler yapıldı.

Sonuçları konsantrasyon açısından değerlendirebilmek için aynı konsantrasyonlardaki kimyasalların bu test sisteminde yaklaşık olarak eşit sayıdaki bakteri yoğunluğu ile yüz yüze gelmesine çalışıldı. Bunun için 600 nm deki absorbansı yaklaşık 0,25-0,30 olan kültürün 0,9 ml sine 30 µl kimyasal eklendi.

3.2.8 Umu deneylerinin yapılması

S.thyphimurium NM 2009 ve *S.thyphimurium* NM 3009 suşlarının donmuş örneklerinden, 1 ml alınarak, 20 ml broth içeren 50 ml' lik erlenlere ekim yapıldı ve gece boyu inkübe edildi. Gecelik kültür TGA broth ile 1/50 kez dilue edilerek, 175 rpm' de 37 °C de OD₆₀₀ değeri 0,25 ile 0,3 olana kadar inkübe edildi. Daha sonra bu kültürler 0,9 ml' lik kısımlar halinde, farklı konsantrasyonlardaki kimyasalın 30 µl' sini içeren steril tüplere eklendi ve 3,5 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, farklı konsantrasyonlardaki kimyasalın sitotoksitesini saptamak amacı ile OD₆₀₀ de her tüpün bakteri yoğunluğu spektrofotometrede okundu. β-Galaktozidaz aktivitesini ölçmek için hazırlanmış bir seri tüpe, absorbansı okunan kültürlerin 0,2 ml' si alınarak enzim assay' e başlandı. 0,2 ml kültür içeren her tüpe 1,8 ml Z tamponu, 50 µl %1' lik SDS ve 10 µl saf kloroform eklenerek vortekslendi. Ardından reaksiyonu başlatmak için ortama 0,2 ml ONPG (4 mg/ml) çözeltisi eklendi ve tekrar vortekslendi. Renk oluşumu

için su banyosunda belirli bir süre beklendikten sonra (10-60 dk) reaksiyon 1 ml Na_2CO_3 çözeltisi ile durduruldu.

Test tüpleri 420 ve 550 nm de okundu ve bu değerler ünite hesaplamalarında kullanıldı.

3.2.9 Umu test sonuçlarının yorumlanması

Umu test sistemini uyguladığımızda aldığımız değerler formülde yerine konup hesaplandı. Çizelge ve grafiklerde sonuçlar doza göre sıralandı. β galaktozidaz enzim aktivitesi Miller (1972)' in ünite formülüne göre hesaplandı. Buna göre;

$$\text{Ünite} = 1000 \times (A_{420} - 1.75 \times A_{550}) / (t. v. A_{600}) \text{ şeklinde hesaplandı.}$$

t = reaksiyon süresi

v = deneyde kullanılan kültürün miktarı

A_{600} = deneyde kullanılan kültürün yoğunluğu

β galaktozidaz , β galaktozit' leri hidroliz eden bir enzimdir. Bu enzim aktivitesi ONPG gibi renksiz substratların hidrolizi ile oluşan renkli ürünlerin spektrofotometrik olarak okunması ile kolaylıkla saptanabildi. β galaktozidaz varlığında ONPG, galaktoza ve O-nitrofenole (ONP) dönüşür. O-nitrofenol sarı renklidir ve 420 nm de absorbansı ölçülür. 420 nm deki okuma gerçekte O-nitrofenolün absorbansı ile hücre kalıntıları tarafından oluşturulan ışık saçılımının bir kombinasyonudur. Bu durum, başka bir dalga boyunda (örneğin 550 nm) okuma yapılarak elde edilen absorbans ile düzeltilebildi. Çünkü 550 nm de sadece hücre kalıntılarının ışık yayılımı vardır ve O-nitrofenolden gelen bir katılım yoktur. 420 nm deki ışık yayılımı 550 nm deki ile orantılıdır.

Sonuçta ışık dağılımını kompanse etmek için bir düzeltme faktörü kullanılarak, O-nitrofenolün absorbansı doğru olarak hesaplandı. β galaktozidaz aktivitesinde kontrole göre en az 2 katlık bir artışın gözlenmesi, Umu test sisteminde, kimyasalın genotoksisite açısından pozitif olarak değerlendirilebileceğini gösterdi.

Bu çalışmada iki farklı benzotiyazol türevinin mutajenik aktivitesi *Salmonella typhimurium* ' un NM 2009 ve NM 3009 mutant suşları ile araştırıldı. Her doz, ayrı ayrı test edilmiştir. Sonuçlar, standart hataları ile birlikte ortalamaları, alınarak istatistiksel açıdan *One-Way ANOVA* testi ile değerlendirilmiştir.

Bu amaçla “SPSS-WINDOWS” paket programı kullanılmıştır. *Salmonella typhimurium* ' un NM 2009 ve NM 3009 mutant suşlarındaki deney sonuçları ve pozitif kontrolden elde edilen sonuçlar izelge 4.1 verilmiştir. Çizelgede, test maddelerinin her doz için β -galaktozidaz enzim aktivitesi değerinin ortalamaları “ortalama (X) $\pm$ standart sapma (SD)” şeklinde gösterilmiştir.

4. BULGULAR

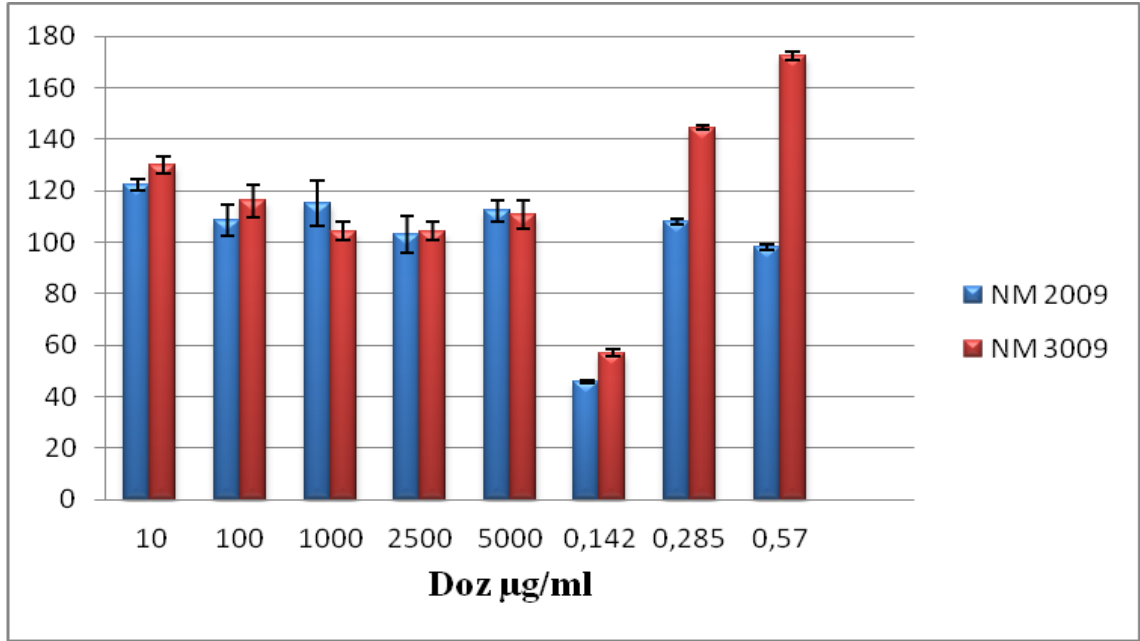
Çizelge 4.1 *S.thyphimurium* NM 2009 ve NM 3009 suşunun Umu test sistemi ile benzotiyazol türevlerindeki ünite hesapları

Test Bileşiği	Denenen Doz	Ünite Hesabı NM 2009 X ±SD	Ünite Hesabı NM 3009 X ±SD
A Maddesi	10 µg	122,36 ±4,128	129,99 ±5,818
N-(4-benzotiyazol-2-il)-2-	100 µg	108,54 ±10,823	116,15 ±10,853
metoksifenil)-2-(4-	1000 µg	115,15 ±15,609	104,33 ±6,201
klorofenoksi)asetamit	2500 µg	103,06 ±12,731	104,33 ±6,201
	5000 µg	112,15 ±7,523	110,79 ±9,557
B Maddesi	10 µg	272,34 ±20,451	346,74 ±23,923
N-(4-(benzotiyazol-2-il)-3-	100 µg	291,97 ±5,619	300,14 ±10,175
klorofenil)-2-(4-	1000 µg	215,91 ±21,223	259,19 ±25,734
klorofeniltiyo)asetamit	2500 µg	220,92 ±24,971	271,14 ±12,164
	5000 µg	251,55 ±31,566	285,63 ±30,987
4 NQO Pozitif Mutajen	0,142 µg	45,97 ±1,05	56,98 ±2,469
	0,285 µg	108,13 ±1,988	144,49 ±1,601
	0,570 µg	98,1 ±1,539	172,4 ±2,884

X: β-galaktozidaz enzim aktivitesinin ortalama değerleri

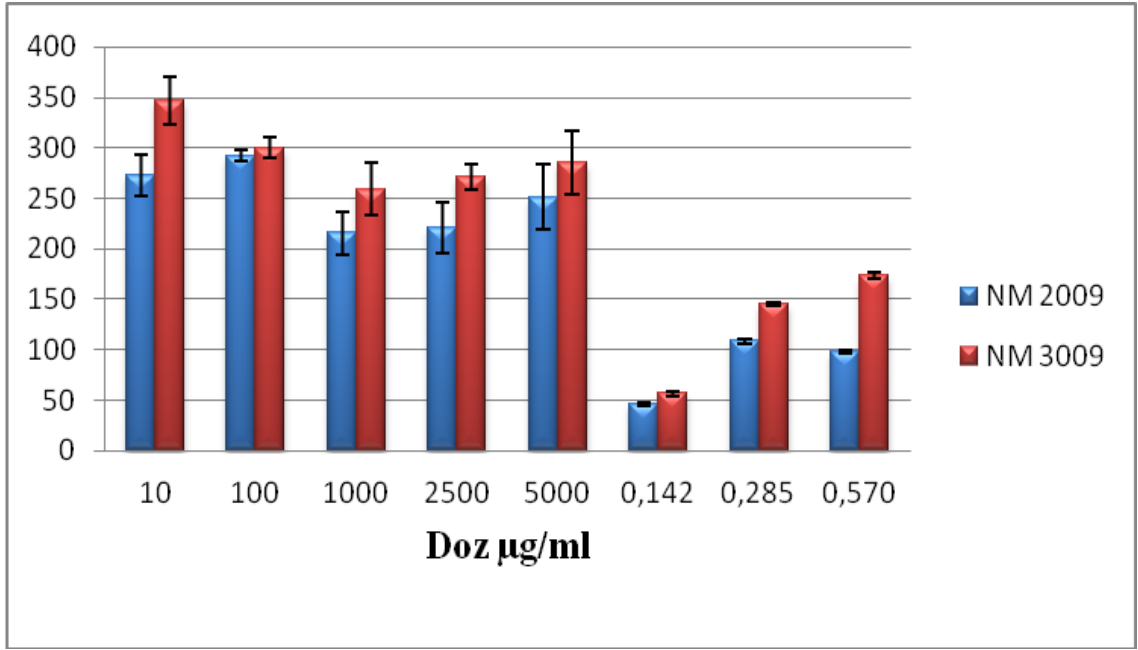
SD: Standart sapma

p< 0,05



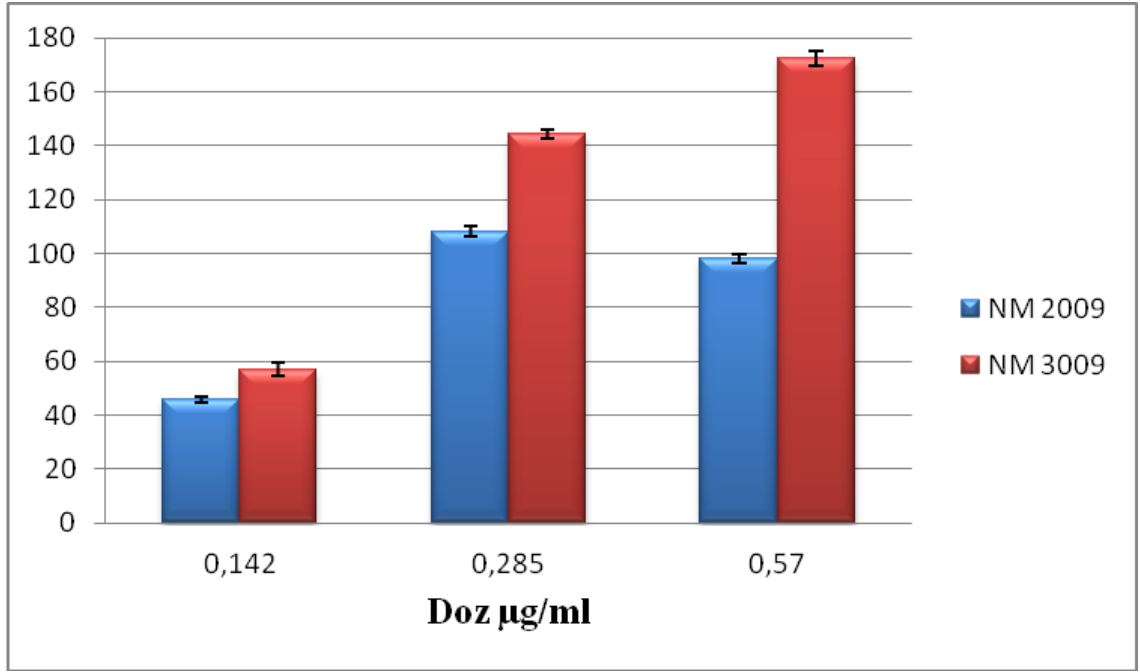
*p < 0,05 düzeyinde anlamlı

Şekil 4.1 *S.typhimurium* NM 2009 ve NM 3009 suşunun A maddesi ve pozitif mutajenle verdiği β -galaktozidaz enzim aktivitesinin doza bağlı grafiği



*p<0,05 düzeyinde anlamlı

Şekil 4.2 *S.typhimurium* NM 2009 ve NM 3009 suşunun B maddesi ve pozitif mutajenle verdiği β -galaktozidaz enzim aktivitesinin doza bağlı grafiği



Şekil 4.3 *S. typhimurium* NM 2009 ve NM 3009 suşunun 4NQO maddesi ile verdiği β-galaktozidaz enzim aktivitesinin doza bağlı grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Yaşadığımız yüzyılda insan sağlığında biyolojik, genetik ve fiziksel yapı gibi etkenlerin yanı sıra çevresel etkilerin de önemli bir yer tuttuğu vurgulanmaktadır. Çevremizde biyolojik etkileri bilinmeyen ve sayıları milyonları bulan sentetik ve doğal kimyasal madde bulunmaktadır. Endüstriyel devrimle birlikte çevremizdeki kimyasal maddelerin sayısında önemli bir artış görülmektedir (Somay, 2009)

Bu kimyasal maddeler bugünkü çağdaş yaşamın vazgeçilmez gereksinimleridir. Faydalarının yanında, çeşitli nedenlerle gerek doğrudan maruz kalma gerekse kullanımları sonucu çevreye yayılarak insanlara ve tüm ekosisteme zarar verebilirler (Vural, 2005). Çevresel faktörlerin, diyetin ve davranışsal faktörlerin insanlarda kanser oluşumunda % 70- 90 oranında etkili olduğu tahmin edilmektedir (Klaassen, 2008).

Bir maddenin karsinogenik potansiyelinin mutajenik kapasitesi ile yakından ilgili olması ve son yıllarda karsinogenik olan birçok maddenin mutajenik, benzeri şekilde mutajenik olan birçok maddenin de karsinogenik olduğu gösterilmiştir (Vural, 2005). Kimyasal maddelerin mutajenik etkileri ile karsinogenik potansiyelleri arasındaki bu kuvvetli ilişki kimyasalların kanserojen potansiyellerini değerlendiren çok sayıda in vivo ve in vitro deney sistemi kullanılmasına neden olmuştur (Klaassen, 2008).

Bu sistemlerinden birisi de 1985 yılında Oda ve arkadaşları tarafından geliştirilen kısa zamanlı testlerden olan Umu test sistemidir. Karmaşık çevresel örneklerin, atık suların ve yiyeceklerin oluşturduğu birincil hasarları tespit etmek üzere birçok çalışmada Umu-testi referans test olarak kullanılır (Wittekindt et al., 2000; Yasunaga et al., 2006).

Umu testinde umu-C-lacZ genine sahip pSK1002 plazmidi taşıyan *Salmonella thyphimurium* TA1535 mutant suşu kullanılır. Umu-C operon bakteri DNA' sındaki genotoksik lezyonlara yanıt olarak indüklenir (Dizer et al., 2002; Mamindy-Pajany et al., 2011).

Bu teste, β -galaktozidaz enzim aktivitesinin kolorometrik olarak spektrofotometrede ölçülmesi sonucu mutajen ajanlar test bakterilerinin hazırlanmasından sonra 3-4 saat içerisinde kolayca belirlenebilmektedir (Şenel vd, 2012).

Test parametreleri açısından en iyi standardize edilmiş ve mutajen-karsinojen etkisi en iyi bilinen kimyasallar ile geçerliliği en fazla kabul edilmiş ve en yaygın kullanılan kısa zamanlı test sistemlerinden birisi olan Ames (*Salmonella*/mikrozom) testi ile Umu testin kimyasal genotoksinleri belirlemede benzer özelliğe sahip oldukları gösterilmiştir (Wittekindt et al., 2000; Yasanuga et al., 2006).

Salmonella kısa zamanlı test sistemlerinde, bir maddeye mutajen denilebilmesi için testte kullanılan mutant bakteri üzerindeki bozuklukların mutajen ajanlarla tamir edilmesi gerekmektedir. Bu tamir sonucu bakteride meydana gelecek üreme oranının, negatif kontrol grubundaki üreme oranının en az iki katı olması gerekmektedir. Üreme oranı iki kat fazla değilse fakat üreme oranı madde konsantrasyonundaki artışla paralellik gösteriyorsa bu durumda da bu maddeye mutajen denilebilir (Ames et al., 1973).

Bu çalışmada N-(4-benzotiyazol-2-il)-2-metoksifenil)-2-(4-klorofenoksi) asetamit (A maddesi) ile N-(4-(benzotiyazol-2-il)-3-klorofenil)-2-(4-klorofeniltiyo) asetamit (B maddesi) isimli iki farklı benzotiyazol türevinin mutajenik etkileri, kısa zamanlı mutajenite testi olan Umu-test (*Salmonella thyphimurium* TA1535/pSK1002) ile araştırıldı.

Benzotiyazol türevlerinin farklı dozları (5000 μ g, 2500 μ g, 1000 μ g, 100 μ g ve 10 μ g) *S. thyphimurium* NM 2009 ve *S. typhimurium* NM 3009 mutant suşları ile sınıandı.

N-(4-benzotiyazol-2-il)-2-metoksifenil)-2-(4-klorofenoksi) asetamit (A maddesi) olarak isimlendirilen benzotiyazol türevinin yapısı ve bağlı gruplar Çizelge 3.1 de rahatlıkla görülebilir. Bu bileşiğimizde R grubunda fenil halkasına ikinci konumda bağlı metoksi ve R¹ grubunda dördüncü konumda bağlı Cl bulunmaktadır. Bu maddeden hazırlanan 5 farklı dozun *Salmonella thyphimirium* NM 2009 suşu ile ölçülen β -galaktozidaz enzim aktivitesi $122,36 \pm 4,128$ 'in üzerine çıkmamıştır. Bu veri pozitif mutajenle karşılaştırıldığında enzim aktivitesinde anlamlı bir artış olmamıştır. Yine aynı şekilde *Salmonella thyphimirium* NM 3009 suşu ile ölçülen β -galaktozidaz enzim aktivitesi $129,99 \pm 5,818$ ' in üzerine çıkmamış ve pozitif mutajenle karşılaştırıldığında anlamlı bir artış görülmemiştir (Şekil 4.1). Sonuçları değerlendirdiğimizde; kimyasalların bakterilerin makromoleküler DNA' sı ile reaksiyona girmediğini ve onların gen yapılarına etki ederek enzim sentezini attırmadığını söyleyebiliriz.

Ceyhan (2001), yapmış olduğu çalışmada Kinoksalinin 11 farklı türevinin mutajenik aktivitesini Umu test sistemi ile araştırmıştır. Yapısında metoksi ve Cl bulunan 2,3 bis (p-metoksi fenil) 6- klor kinoksalin bileşiğinin *Salmonella thyphimirium* NM 2009 ve *Salmonella thyphimirium* NM 3009 suşlarında direkt mutajen olduğunu göstermiştir. Bizim yapmış olduğumuz çalışmada elde ettiğimiz sonuçlara benzememektedir.

Mercangöz ve Tüylü (2000) yaptıkları çalışmada ilaç etken maddesi olarak kullanılması amaçlanan 2, 4, 5 tri fenil imidazol ve dokuz türevinin mutajenik etkilerini Ames/Salmonella/Mikrozom test sistemiyle araştırmışlar ve bileşiğin yapısında farklı konumlarda metoksi grupları bulunan imidazol türevlerini *Salmonella thyphimirium* TA 98 suşunda mutajen bulmuşlardır. Zeytinoğlu ve ark (2006) metoksi grubu bağlı benzotiyazol türevi ile yapmış oldukları çalışmada Ames/Salmonella/Mikrozom test sistemini kullanmışlar ve O-demetilasyona uğrayan metoksi grubunun toksisiteden sorumlu olduğunu göstermişlerdir. Her iki çalışmada da elde edilen sonuçlar bizim çalışmamızda bulduğumuzla benzerlik göstermemektedir. Bu farklılığı her iki test sisteminin genotoksisiteyi tespit etmek için farklı mekanizmalar kullanmaları ile açıklayabiliriz.

N-(4-(benzotiyazol-2-il)-3-klorofenil)-2-(4-klorofeniltiyo) asetamit (B maddesi) olarak isimlendirdiğimiz benzotiyazol türevinin R grubunda fenil halkasına üçüncü konumda bağlı Cl ve R¹ grubunda dördüncü konumda bağlı Cl bulunmaktadır. B maddesinin hazırlanan 5 farklı dozunda *Salmonella thyphimirium* NM 2009 suşunda en yüksek β -galaktozidaz enzim aktivitesi $291,97 \pm 5,615$ ölçülmüştür. Yine aynı şekilde *Salmonella thyphimirium* NM 3009 suşunda en yüksek β -galaktozidaz enzim aktivitesi $346,74 \pm 23,923$ ölçülmüştür. Pozitif kontrolle karşılaştırıldığında 2 katlık bir artış olmamış fakat kimyasalımızı orta mutajen olarak nitelendirecek şekilde bir artış belirlenmiştir (Şekil 4.2).

Yüksel (2005) yapmış olduğu çalışmada 8 Benzinidenilin türevlerinin mutajenik etkileri Ames/Salmonella/Mikrozom test sistemini ile araştırmış ve yapısında Cl bulunduran 4-Kloro benzinidenilinin *Salmonella thyphimirium* TA 100 (S9'suz) suşunda mutajen olduğunu göstermiştir.

Yapılan bir diğer çalışmada 3 farklı arıtma tesisinden klorlama işlemi öncesi ve sonrası alınan su örneklerinin genotoksitesitesi Ames testi ile çalışılmış, klorlama işleminden sonra alınan su örneği Ames testinin her iki suşunda da mutajen bulunmuştur (Rincón-Bedoya et al., 2013).

Bununla beraber literatürdeki çalışmalarda para konumunda Cl taşıyan bileşiklerin mutajen olmadığı da bildirilmiştir (Hrelia et al., 1999; Somay, 2009).

Aromatik yapıya sahip bileşikler pek çok çalışmada mutajenik olarak rapor edilmiştir (Glende et al., 2002; Beningni and Passerini, 2002; Morales et al., 2006). Bileşimlerin farklı konumlarındaki nitro gruplarının mutajenik aktiviteyi etkilediği önceki çalışmalarda rapor edilmiştir (Hrelia et al., 1998; Mital, 2009). Nitrobenzenler ve aminobenzenler ile yapılan bir çalışmada Ames testi uygulanmış ve *Salmonella typhimuriumun* TA 98 ve TA 100 suşları kullanılmıştır. Test edilen 14 kimyasalın 10 tanesi mutajenik bulunmuştur (Abmann et al., 1997).

Sato ve ark (2000) yaptıkları çalışmada ana yapısını 6-aminobenzotiyazolun oluşturduğu yeni bir benzotiyazol türevi ve MAO-A inhibitörü olan E2011 ve türevlerini Ames/Salmonella/Mikrozom test sistemi ile araştırılmışlar. E2011' in metabolik yollardan biri olan dekarboksillenmeye uğrayarak mutajenik aminlere dönüştüğünü ve genotoksisiteden sorumlu olduğunu vurgulamışlardır (Sato et al., 2000). Lefevre ve ark (1997) çalışmalarında benzotiyazol türevi olan 6-dimetilaminofenilazo bileşiğinin rat karaciğerinde mutajen olduğunu göstermişler (Lefevre et al., 1997).

Başka çalışmalarda metil grubunun mutajen olduğu vurgulanmıştır (Vikse et al., 1993; Dalgaard et al., 1994; Bogen 1994; Hrelia et al., 1998; Mital, 2009). Zeytinoğlu ve ark (2006) yapmış oldukları çalışmada benzotiyazolun ikinci pozisyonundaki fenil grubuna bağlı lipofilik metilin mutajenik olduğunu göstermişler ve nedenini de metil grubunun alkolik ya da asidik bileşikler gibi oksidatif metabolitlere dönüşmesi şeklinde açıklamışlardır.

Bazı kimyasallar için rutin bakteri testlerinde mutajenik potansiyeli belirlemek ya çok zordur ya da mümkün değildir (Venit et al., 1985; Reifferscheid and Heil, 1996).

Bir maddenin veya kompleks bir karışımın mutajenitesi, o maddenin direkt kendi yapısal özelliğinden kaynaklanabileceği gibi canlı bünyesine girerek buradaki enzim sistemleriyle muamelesi sonucu da mutajen etki kazanabilir. Diğer taraftan, bir madde mutajen etkiye sahipken, canlı enzim sistemleriyle muamelesi sonucu yapısal değişikliklerden dolayı mutajen etkisini kaybedebilir (Şenel, 2006).

Kısa zamanlı mutajenite test sistemlerinin hiçbiri tek başına yeterli değildir. Çünkü bu testlerin her biri sadece birkaç mutajen tipini tanımlayabilmektedir. Bu nedenle iyi bir genotoksisite değerlendirmesi için bu test sistemlerinden bir kaçının bir arada uygulandığı bakteri test sistemleri kullanılmalıdır (Dizer et al., 2002).

Çalışmamızda kimyasallarımızdan N-(4-benzotiyazol-2-il)-2-metoksifenil)-2-(4-klorofenoksi) asetamit direkt mutajen görülmedi. N-(4-(benzotiyazol-2-il)-3-klorofenil)-2-(4-klorofeniltiyo) asetamit ise orta mutajen olarak belirlendi.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abmann, N., Emmrich, M., Kampf, G. ve Kaisher, M., 1997, Genetoxic Activity of Important Nitrobenzenes and Nitroanilines in the Ames Test end their Structure Activity Relationship, *Mutation Research*, 395, p.139-144
- Achson, A., 2009, An introduction to the chemistry of heterocyclic compounds. 3rd ed., Willy-Intersciences
- Akbay, A., Ören, İ., Temiz-Arpacı, Ö., Akı-Şener, E., Yalçın, İ., 2003, Synthesis and HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitor Activity of Some 2,5,6-Substituted Benzoxazole, Benzimidazole, Benzothiazole and Oxazolo(4,5-b(pyridine Derivatives, *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, 53(4), p. 266-271.
- Akyıl, D., 2006, Farklı tipteki fungusitlerin muhtemel mutajeniteleri üzerine bir çalışma, Yülsek Lisans Tezi
- American Cancer Society, 2008, *Cancer Facts and Figures 2008 second edition*, <http://www.cancer.org/> son ziyaret: 15.09.2012
- American Cancer Society, 2012, *Cancer Facts and Figures 2012*, <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveillance/documents/document/acspc-031941.pdf> / son ziyaret: 03.02.2013
- Ames, B.N., Lee, F.D., ve Durston, W.E., 1973, An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70, p.782-786.
- Ates, A., 2002, “Moleküler Biyoloji”, 9. Bölüm, Selçuk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Konya, s. 124-133.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bağcı, H., 1985, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Yaz Okulu Moleküler Biyoloji Ders Notları.
- Ban, M., Taguchi, H., Katsushima, T., Takahashi, M., Shinoda, K., Watanabe, A., Tominaga, T., 1998, Novel antiallergic and antiinflammatory agents. Part II: Synthesis and pharmacology of TYB-2285 and its related compounds, Bioorg Med Chem ,6(7), p. 1009.
- Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B.Ş., Alvur M., 2004, “DNA hasarı analizinde μ - FADU ve Comet yöntemlerinin karşılaştırılması”, Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 2 (3): 97-103,
- Beland, F.A., Kadlubar, F.F., 1990, Metabolic activation and DNA adducts of aromatic amines and nitroaromatic hydrocarbons, in C.S. Cooper, P.L. Grover(eds), Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis I, Springer, p.267-325.
- Benigni, R., Bossa, C., 2011, Alternative strategies for carcinogenicity assessment: an efficient and simplified approach based on in vitro mutagenicity and cell transformation assays, Mutagenesis, 26(3), p.455-460
- Benigni, R., Passerini, L., 2002, Carcinogenicity of the aromatic amines: from structure–activity relationships to mechanisms of action and risk assessment, Mutation Res, 511, p. 191-206
- Binetti, R., Costamagna, F.R., Marcello, I., 2008, Exponential growth of new chemicals and evolution of information relevant to risk control, Ann Ist Super Sanita, 44(1), p.13-15

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Brantley E., Stinson S., Kohlhagen G., Antony S., Sausville E. & Pommier Y. 2003. Anti-tumor 2-(4-amino-3-phenyl)- 5-fluoro-benzothiazole (5F203, NSC 703786) induces single- strand breaksand DNA-protein cross-links in sensitive MCF- 7 breast cancer cells. Clin. Cancer Res, 9(16), p.6075
- Bogen, K.T., 1994, Applicability of alternative models of revertant variance to Ames-test data for 121 mutagenic carcinogens, Mutat. Res. 322, p. 265-273.
- CAS (Chemical Abstracts Service), 2012, <http://www.cas.org/content>, son ziyaret: 28.10.2012
- Cao, Y.J., Dreixler, J.C., Couey, J.J., Houamed, K.M., 2002, Modulation of recombinant and native neuronal SK channels by the neuroprotective drug riluzole, Eur.J.Pharmacol, 449, p.47.
- Ceyhan, E., 2001, 2,3-Difenil Substitue Kinoksalin'in 11 Farklı Türevinin Mutajenik Aktivitesinin Umu Test Sistemi İle Araştırılması,Yüksek Lisans Tezi.
- Cooper, G.M., Hausman, 2006, Hücre Moleküler Yaklaşım, s.192-230 .
- Dalgaard, L., Hjortkjaer, R.K., Regnier, B., Nordholm, L., 1994, Pharmacokinetics of the neuroprotective glutamate antagonist NBQX (6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxaline-2,3-dione) in mice, rats, and dogs. Interactions with probenecid, Drug Metab. Dispos. 22, p. 289-293
- Das, J., Moquin, R.V., Lim, J., Liu, C., Doweyko, A.M., DeFex, H.F., Fang, F., Pang, S., Pitt, S., Shen, D.R., Schieven, G.L., Barrish, J.C., Wityak, J., 2003, Discovery of 2-Amino-heteroaryl-benzothiazole-6-anilides as Potent p56^{lck} Inhibitors, Bioorg.Med.Chem.Lett,13, p. 2587-2590.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Debeleç-Bütüner, B., Kantarcı, G., 2006, Mutasyon, DNA hasarı, Onarım Mekanizmaları ve Kanslerle İlişkisi, Ankara Ecz. Fak. Derg, 35(2), s.149-170.
- Diril, N., Durusoy, M., Öksizoğlu, E., Öztürk, K., Karagöz, E., Kırtıloğlu, E., 1997, Uygulamalı Moleküler Biyoloji Teknikleri, Hacettepe Üniversitesi Yaz Okulu Ders Notları, s.71-88
- Dizer, H., Wittekindt, E., Fischer, B., Hansen, P.D., 2002, The cytotoxic and genotoxic potential of surface water and wastewater effluents as determined by bioluminescence umu-assays and selected biomarkers, Chemosphere, 46, p.225-233
- Dökmeci, İ., 1988, Toksikoloji, Akut Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, s.488
- Dökmeci, İ., 2007, Farmakoloji İlaçlar ve Etkileri, Alfa Yayınları, İstanbul, s.109-115
- Easmond, D.A., Hartwig, A., Anderson, D., Anwar, W.A., Cimino, M.C., Dobrev, I., Douglas, G.R., Nohmi, T., Phillips, D.H., Vickers, C., 2009, Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme, Mutagenesis, 24(4), p. 341–349
- EEA, 2010, The European environment, State and outlook 2010, Synthesis, State of the Environment Report 1/2010, European Environment Agency. Son ziyaret: 10.10.2012
- EPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2005, Guidelines for Carcinogen Risk Assessment, <http://www.epa.gov/cancerguidelines/> son ziyaret: 25.11.2012

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ferlay, J., Parki, D.M. and Steliarova-Foucher, E., 2008, Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*, 46(4), p.765-81.
- Glende, C., Schmitt, H., Erdinger, L., Engelhardt, G., Boche, G., 2001, Transformation of Mutagenic Aromatic Amines into Non-Mutagenic Species by Alkyl Substituents Part I, Alkylation Ortho to the Amino Function, *Mutation Research*, 498, p. 19-37.
- Gupta, S., Ajmera, N., Gautam, N., Sharma, R., Gautam, D., 2009, Novel synthesis and biological activity study of pyrimido [2,1-b] benzothiazoles, *Ind J Chem.* 48B, p.853-858.
- Gupta, S.D., Moothy, N.S.H.N., Sanyal, U., 2010, Synthesis, Cytotoxic Evaluation, *In Silico* Pharmacokinetic and QSAR Study Of Some Benzothiazole Derivatives, *Int J Pharmacy Pharm Sci*, 2(3), p. 57-62
- Hamer, B., Bihari, N., Reifferscheid, G., Zahn, R.K., Muller, W.E.G., Batel, R., 2000. Evaluation of the SOS/umu-test post-treatment assay for the detection of genotoxic activities of pure compounds and complex environmental mixtures, *Mutation Research*, 466, p. 161–171.
- Hartwell, L.H., Hood, L., Goldberg, M.L., Reynolds, A.E., Silver, L.M., 2011, *Genetics: From Genes To Genomes*, Fourth Edition.
- Heo, Y., Song, Y., Kim, B., Heo, J.A., 2006, highly regioselective synthesis of 2-aryl-6-chlorobenzothiazoles employing microwave-promoted Suzuki-Miyaura coupling reaction. *Tetrahedron Letters*, 47, p.3091-3094

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hutchinson, I., Chua, MS., Browne, H.L., Trapani, V., Bradshaw, TD., Westwell, A.D., 2001, Synthesis and Pharmaceutical Properties of Antitumor 2-(4-Aminophenyl) benzothiazole Amino Acid Prodrugs, J Med Chem. 44, p.1446-1449.
- Hrelia, P., Fimognari, C., Maffei, F., Spinelli, D., Lamartina, L., Sarva, M.C., Forti, G.C., 1999, Influence of nitroreductase and O-acetyltransferase on the mutagenicity of substituted nitrobenzothiophenamines in *Salmonella typhimurium*, 118, p. 99-111.
- Hrelia, P., Fimognari, C., Maffei, F., Brighenti, B., Garuti, L., Burnelli, S. ve Cantelli-Forti, G., Synthesis, 1998, Metabolism and Structure Mutagenicity Relationships of Novel 4-Nitro-(Imidazoles and Ryzoles)in Salmonella Typhimurium, Mutation Research, 397, p. 293-301
- Janion, C., 2001. Some aspects of the SOS response system-A critical survey, Acta Biochimica Polonica, 48, p.599–610.
- Jung, M.H., Choi, S.W., Park, J.G., Cho, K.W., Kong, J.Y., 1999, Studies of Muscarinic Receptor Agonists, 2-(1-Methyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin-4-yl) benzoxazoles/benzothiazole, Korean J. Med. Chem, 9(2), p.56
- JCCC, 2012, <http://staff.jccc.edu/pdecell/evolution/mutations/mutation.html>. son ziyaret: 23.12.2012
- Kasamatu, T., Kohda, K. ve Kawazoa, Y., 1996, Comparison of Chemically Induced DNA Breakage in Cellular and Subcellular Systems Using the Comet Assay, Mutat. Res., 369, p. 1-6 .
- Kayaalp, O., 2002, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe-Taş, Ankara, s.43-55

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kini, S., Swain, S., Gandhi, A., 2007, Synthesis and Evaluation of novel Benzothiazole Derivates against Human Cervical Cancer cell lines, Ind J Pharm Sci. Jan-Feb, p. 46-50.
- Klaassen, C.D., 2008, Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 7nd edition, McGraw-Hill Com. p.362
- Klug, W.S; Cummings, M.R., 2002, Genetik Kavramlar, Palme Yayıncılık, s.477-481.
- Klug, W.S; Cummings, M.R, Spencer, C.A, 2009, Genetik Kavramlar, Palme Yayıncılık, s.361-378.
- Klug, W.S; Cummings, M.R., Spencer, C.A, Palladino, M.A 2012, Concepts Of Genetic, Tenth Edition, Pearson Education, Inc
- Lefevre, PA. Tinwell, H., Ashby, J., 1997, Mutagenicity of the potent rat hepatocarcinogen 6BT to the liver of transgenic (lacI) rats: consideration of a reduced mutation assay protocol. Mutagenesis, 12 (1), p.45-47
- Lewis, R., 2009, Human Genetics: Concepts and Applications 9th Edition, McGraw-Hill Co.
- Maharan, M., William, S., Ramzy, F., Sembel, A., 2007, Synthesis and in vitro Evaluation of new benzothiazole derivatives as schistosomicidal agents, Molecules, 12, p. 622-633.
- Maurici, D., Aardema, M., Corvi, R., et al. 2005. Carcinogenicity. *Altern. Lab. Anim.* 33, Suppl. 1, p. 177-182.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Maron, D.M., Ames, B.N., 1983, Revised methods for the mutagenicity test, *Mutant. Res.* 113, p.173-215.
- Mamindy-Pajany, Y., Hamer, B., Romeo, M., Geret, F., Galgani, F., Durmiši, E., Hurel, C., Marmier, N., 2011, The toxicity of composted sediments from Mediterranean ports evaluated by several bioassays, *Chemosphere*, 82(3), p. 362-369
- Mercangöz, A., Tüylü, B., 2000, 2, 4, 5 Tri (Süstitüe) Fenil Imidazol ve TürevlerininMutajenik Etkilerinin Ames/Salmonella Test Sisteminde Saptanması, *Türk J Biol*, 24, s. 57-64
- Mital, A.,2009, Synthetic Nitroimidazoles: Biological Activities and Mutagenicity Relationships, *Sci Pharm*, 77, p.497-520
- Munirajasekar, D., Himaja, M., Mali Sunil, V., 2011, Synthesis And Anthelmintic Activity Of 2-Amino-6-Substituted Benzothiazoles, *IRJP* 2(1), p. 114-117
- Morales, A.H., Perez, M.A.C., Combes, R.D., Gonzalez, M.P., 2006, Quantitative structure activity relationship for the computational prediction of nitrocompounds carcinogenicity, *Toxicology*, 220, p.51-62
- Mortelmans, K., Zeiger, E., 2000, The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455, p.29-60
- Mortelmans, K., Rupa, S.D., 2004, Current issues in genetic toxicology testing for microbiologists, *Adv Appl Microbiol*, 56, p.379-401.
- Nagarajan, A., Kamalraj, S., Muthumary, J., Reddy, B., 2009, Synthesis of biological active benzothiazole substituted thiazolidinone derivatives via cyclization of unsymmetrical imines, *Ind J Chem.* 48B, p.1577-1582.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- NLM (National Library Of Medicine), 2012, <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/> , Son Ziyaret:15.09.2012
- Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T., Shinagawa, H., 1985, Evaluation of a new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. Mutation Research 147, p. 219–229
- Oda, Y., Shimada, T., Watanabe, M., Ishidate, Jr.M., Nohmi, T., 1992, A sensitive umu test system for the detection of mutagenic nitroarenes in *Salmonella typhimurium* NM 1011 having a high nitroreductase activity, Mut. Res, 272, p.91-99
- Oda, Y., Yamazaki, H., Watanabe, M., Nohmi, T. and Shimada, T., 1993, Highly Sensitive Umu Test System For The Detection of Mutagenic Nitroarenes In *Salmonella typhimurium* NM 3009 Having High Oacetyltransferase and Nitroreductase Activities Environ and Molecular Mutagenesis, 21, p.357-364
- Olaharski, A., Sotelo, R., Solorza-Luna, G., Gonsebatt, M.E., Guzman, P., Mohar, A., Eastmond, D.A., 2006. Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis, Carcinogenesis, 27, p.3317-43.
- Ono, Y., Somiya, I. ve Oda, Y., 2000, Identification of a carcinogenic heterocyclic amine in river water., Water Research, 34(3), p.890-894.
- Onur, E., Tuğrul, B., Bozyiğit, F., 2009, DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları, Türk Klinik Biyokimya Dergisi, 7(2), s. 61-70.
- Öksüzöğlü E., 1997, ‘‘Bazı Bitki Büyüme Hormonlarının Mutajenitesinin *Salmonella*/mikrozom ve SOS Kromotest Sistemleri ile Araştırılması’’, Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Öner, C., 2003, “Genetik Kavramlar”, Palme Yayıncılık, 6. baskıdan çeviri, Türkiye, 455-467p.
- Pattan, S., Suresh, C., Pujar, V., Reddy, V., Rasal, V., Koti, B., 2005, Synthesis and antidiabetic activity of 2-amino[5”(4-sulphonylbenzylidene)-2, 4-thiazolidinenone]-7-chloro-6-fluorobenzothiazole, Ind J Chem. 44B, p.2404-2408.
- Pasternak, J.J , An Introduction To Human Molecular Genetics: 2nd edition A JOHN WILEY & SONS, INC., PUBLICATION
- Quillardet, P., Hofnung, M.,1985, The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins:procedures, Mutat. Res. 147, 65{78.
- Ramirez, A.D, Wong, S.K.F.,Menneti, F.S., 2003, Pramipexole inhibits MPTP toxicity in mice by dopamine D3 receptor dependent and independent mechanisms. *Eur JPharmacol* 475 p. 29–35.
- Reddy, P., Lin, Y., Chang, H., 2007, Synthesis of novel benzothiazole compounds with an extended conjugated system, *Arcivoc*. Xvi, p. 113-12
- Reece, J.B., Urry, L.A., Cain,M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P.V., Jackson, R.B., 2011, Campbell Biology, 9nd edition
- Reifferscheid, G., Heil, J., 1996. Validation of the SOS/umu test using test results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data, *Mutation Research*, 369, p. 129–145.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Reifferscheid, G., Heil, J., Oda, Y., Zahn, R.K., 1991, A microplate version of the SOS/umu test for rapid detection of genotoxins and genotoxic potentials of environmental samples. *Mutation Res.* 253, p. 215-222
- Rincón-Bedoya, E., Velásquez, N., Quijano, J., Bravo-Linares, C., 2013, Mutagenicity and genotoxicity of water treated for human consumption induced by chlorination by-products, *J Environ health*, 75(6), p.28-36
- Rodriguez-Antona, C., Ingelman-Sunberg, M., 2006, Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer, *Oncogene*, 25, p.1679-1691
- Ryu, C.K., Choi, K.U., Shim, J.Y., You, H.J., Chae, M.J., 2003, Synthesis and antifungal activity of 6-arylthio-/6-arylamino-4,7-dioxobenzothiazoles, *Bioorg Med Chem*, 11(18), p. 4003.
- Sanayi Genel Müdürlüğü, Sektörel Raporlar ve Analizler Serisi, Kimya Sektörü Raporu, 2012/1, <http://www.sanayi.gov.tr/DocumentList.aspx>. Son ziyaret: 12.10.2012
- Sassanfar, M., Roberts, J.W., 1990. Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli* the involvement of DNA replication, *Journal of Molecular Biology* , 212, p.79–96.
- Satı, G.L., 2005, İnsan Sperminde Kromozomal Yapı Anomalileri İle Hücrel Olgunlaşmanın İlişkisi, Yüksek Lisans Tezi
- Sato, G., Asakura, S., Hakura, A., Tsutsui-Hiyoshi, Y., Kobayashi, N., Tsukidate, N., 2000, Assessment of potential mutagenic activities of a novel benzothiazole MAO-A inhibitor E2011 using *Salmonella typhimurium* YG1029, *Mutation Research*, 472, p.163-169.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sekar, V., Balbudhe, C., Sivakumar, P., Perumal, P., 2011, Synthesis, Characterization and in vitro anticancer evaluation of some 6-substituted 2-aminobenzothiazole derivatives, IJPRD, 4(03), p. 332-337
- Singh, H.P., Sharma, C.S., Gautam, C.P., 2009, Synthesis and Pharmacological Screening of Some Novel 2-arylhydrazino and 2-aryloxy- Pyrimido [2,1-b] Benzothiazole Derivatives, Am-Euras. J. Sci. Res. 4 (4), p. 222-228
- Shivaraj, H., Gazi, S., Patil, S., Surwas, S., 2010, Synthesis and biological evaluation of some benzothiazole derivatives. Asian J Research Chem, 3(2), p. 421-427.
- Smith, B.T., Walker, G.C., 1998, Mutagenesis and more: umuDC and the Escherichia coli SOS response, Genetics, 148, p.1599–1610.
- Sreenivasa, M., Jaychand, E., Shivakumar, B., Jayraj Kumar, K., Vijaykumar. J., 2009, Synthesis of bioactive molecule flurobenzothiazole comprising potent heterocyclic moieties for anthelmintic activity, Arch Pharm Sci and Res. 1(2), p.150-157.
- Somay, T., 2009, İlaç Etken Maddesi Olarak Tasarlanmış Bazı Nitrolu Bilişiklerin Umu-Test Sistemi İle Genotoksik Potansiyellerinin Saptanması, Yüksek Lisans Tezi
- Şekeroğlu-Atlı, Z., Şekeroğlu, V., 2011, Genetik Toksisite Testleri, TUBAV Bilim Dergisi, 4(3), s. 221-229
- Şenel, Ü., 2006, Tekstil Endüstrisinde Kullanılan Sentetik Boyarmaddelerin Mutajenik Etkilerinin Umu-Test İle Araştırılması, Doktora Tezi

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Şenel, Ü., Sur, H.İ., Demirtaş, M., 2012, Tekstil Endüstrisinde Kullanılan Bazı Sentetik Direkt Boyarmaddelerin Mutajenik Etkisinin Umu-Test İle Araştırılması, KSÜ Doğa Bil. Derg.15(1) s.13-19
- Tay, F., Yurtaş, L., Demirayak, Ş., 2012, Synthesis of some N-[4-(benzothiazole-2yl)phenyl]-2-aryloxyacetamide derivatives and their anticancer activities, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 27(4), p.515-520.
- Tekşen, F., 2006, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Ders Kitabı, Ankara Üniversitesi Sağlık Eğitim Fakültesi Yayınları 4, s.71
- Temizkan, G., 1999, Genetik, İstanbul Üniversitesi Yayınları, s. 131-147
- Tennant, R.W., Margolin, B.H., Shelby, M.D., Zeiger, E., Haseman, J.K., Spalding, J., Caspary, W., Resnick, M., Stasiewicz, S., Anderson, B., Minor, R., 1987. Prediction of chemical carcinogenicity in rodent from in vitro genetic toxicity assays, Science 236, p. 933–941.
- Turan-Zitouni, G., Demirayak, Ş., Ozdemir, A., Kaplancıklı, Z.A., Yıldız, M.T., 2003, Synthesis of some 2-[(benzazole-2-yl)thioacetyl amino]thiazole derivatives and their antimicrobial activity and toxicity. *Eur J Med Chem* 39, p. 267-272.
- Tomi, I.H.R., Tomma, J.H., Al-Daraji, A.H.R., Al-Dujaili, A.H, 2012, Synthesis, characterization and comparative study the microbial activity of some heterocyclic compounds containing oxazole and benzothiazole moieties, Journal of Saudi Chemical Society, Baskıda
- Tüylü, B.A., Zeytinoğlu, H., 2004, Tox. Appl. Pharm, 197, p.257

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tüylü, BA., Sivas, H., İncesu, Z., Ergene, E., 2009, Genetik , Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir, 1953(1), s.184-188.
- Venkatesh, P., Pandeya, S.N., 2009, Synthesis, Characterisation and Anti-Inflammatory Activity Of Some 2-Amino Benzothiazole Derivatives, Int.J. ChemTech Res.1(4), p.1354-1358
- Venitt,S., Baker, R., Liber, H., Matsushima, T., Probst, G., Zeiger, E., Summary report on the performance of the bacterial mutation assays, in: J. Ashby, F.J. de Serres, M. Draper, M. Ishidate Jr., B.H. Margolin, B.E. Matter, M.D. Shelby (Eds.), Progress in Mutation Research, Vol. 5, Evaluation of Short-Term Tests for Carcinogens, Elsevier, Amsterdam, 1985, pp. 11–23.
- Vikse, R., Knapstad, A., Klungsoyr, L., Grivas, S., 1993, Mutagenic activity of the methyl and phenyl derivatives of the food mutagen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoxaline (IQx) in the Ames test, Mut. Research, 298(3), p. 207-214
- Vural, N., 2005, Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 73, s. 1, 42-92.
- Von der Hude, W., Behm, C., Gürtler, R. & Basler, A. (1988) Evaluation of the SOS chromotest. *Mutat. Res.*, 203, 81–94
- Walker, G.C., 1984. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damaged in Escherichia coli, Microbiological Reviews, 48, p.60–93.
- Wang, M., Gao, M., Mock, B., Miller, K., Sledge, G., Hutchins, G., Zheng, Q., 2006, Synthesis of C-11 labelled fluorinated 2-arylbenzothiazoles as novel potential PET cancer imaging agent, Bioorg Med Chem. (14), p.8599-8607.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Witte, I., Plappert, U., Wall H.D., Hartmann, A., 2007, Genetic Toxicity Assessment: Employing the Best Science for Human Safety Evaluation Part III: The Comet Assay as an Alternative to In Vitro Clastogenicity Tests for Early Drug Candidate Selection, *Toxicological Sciences* 97(1), p. 21–26
- Wittekindt, E., Fisher, B. ve Hansen, P.D., 2000, Genotoxicity assay: umutest(ISO/DIS 13829,2000). Institute for Ecology and Biology, Department of Exotoxicology, Berlin University of Tecnology, Germany.
- WHO, 2011, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs350/en/index.html>. Son ziyaret: 19.11.2012
- Yadav, P.S., Senthilkumar, G.P., Devrakash., 2011, Benzothiazole: Different Methods of Synthesis and Diverse Biological Activities, *International Journal of Sciences and Drug Research*, 3(1), p. 1-7.
- Yasunaga, K., Kiyonari, A., Oikawa, T., Abe, N., Yoshikawa, K., 2004, Evaluation of the Salmonella umu test with 83 NTP chemicals, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44, p.329–345.
- Yasunaga, K., Kiyonari, A., Nakagawa, M., Yoshikawa, K., 2006, Investigation into the ability of the Salmonella umu test to detect DNA damage using antitumor drugs, *Toxicology in vitro*, 20, p.712-728

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yılmaz, S., 2008, Bazı Yeni 2-Süstitüe Benzotiyazol Türevlerinin Sentezi, Yapılarının Aydınlatılması ve Mikrobiyolojik Etkileri Üzerine Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi
- Yüksel, S., 2005, Bazı Süstitüe Benzinidenilin Türevlerinin Mutajenik Aktivitelerinin Salmonella Mutajenite Testi İle Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi
- Zeiger, E., 1987. Carcinogenicity of mutagens: predictive capability of the Salmonella mutagenesis assay for rodent carcinogenicity. Cancer Research 47, p.1287–1296.
- Zeytinoğlu, H., Mercy, A., Tüylü, B., Ergene, E., 2006, Synthesis and Genotoxic Activities of Five 2- Aryl- Substituted-Benzothiazole Derivatives, Rev.Chim.,57(12), p.1247-1252