

Delvosid'in *Mus musculus* Üzerine Toksik Etkisi

Pınar GÖÇ RASGELE

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Danışman: Prof.Dr. Fisun KAYMAK
2008 - EDİRNE

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Delvosid'in *Mus musculus* Üzerine Toksik Etkisi

Pınar GÖÇ RASGELE

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman: Prof.Dr. Fisun KAYMAK

2008

EDİRNE

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Delvosid'in *Mus musculus* Üzerine Toksik Etkisi

Pınar GÖÇ RASGELE

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 18/09/2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından kabul edilmiştir.

Danışman
Prof.Dr. Fisun
KAYMAK

Prof.Dr. Kayıhan Z.
KORKUT

Prof.Dr. Tülin
AKTAÇ

Prof.Dr. Feruzan
DANE

Yrd.Doç.Dr. Nuray
ÖZKAPITAN

ÖZET

Tezin cinsi: Doktora

Tezin Adı: Delvosid'in *Mus musculus* Üzerine Toksik Etkisi

Hazırlanıldığı Üniversite: Trakya Üniversitesi

Enstitü: Fen Bilimleri

Ana Bilim Dalı: Biyoloji

Bu çalışmada koruyucu gıda katkı maddesi olan Delvosid'in fare kemik iliği hücrelerinde kromozom aberasyonları (KA), mikronukleus (MN); sperm hücrelerinde sperm aberasyon test yöntemleri kullanılarak toksik etkileri araştırıldı. Bunlara ilave olarak, bazı karaciğer enzimlerinin ve total proteinin kandaki değerleri, total testosteron seviyesi araştırılarak toksik aktiviteleri değerlendirildi.

KA, sperm aberasyon yöntemi, karaciğer enzimleri, total protein ve total testosteron düzeylerini tayin etmek için, erkek ve dişi fareler Delvosid'in farklı konsantrasyonları ile (200, 400 ve 800 mg/kg) 6, 12 ve 24 saat, MN yöntemi için ise 24, 48 ve 72 saat süre ile muamele edildi. Delvosid, kullanılan konsantrasyonlarda KA frekansını arttırmazken, MN frekansını ve anormal sperm sayısını arttırdı. MI, PCE/NCE oranını ve total testosteron seviyesini ise anlamlı olarak azalttı. Karaciğer enzimleri üzerinde çok önemli değişikliklere neden olmadı.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, Delvosid, fare kemik iliği hücrelerinde; KA frekansını arttırmadığı için klastojenik değildir, ancak MN oluşumunu indüklediği için aneujeniktir. Sperm hücrelerinde morfolojik değişikliklere neden olduğu ve testosteron düzeyini azalttığı için ise germ hücresi mutajeni olarak kabul edilebilir.

2008, 102 sayfa

Anahtar Kelimeler: Delvosid, fare kemik iliği, Kromozom Aberasyonları, Mikronukleus, Sperm Aberasyonları, Karaciğer Enzimleri, Testosteron

ABSTRACT

Type of thesis: PhD

Name of thesis: Toxic effect of Delvocid on *Mus musculus*

University: Trakya University

Institute: Natural and Applied Science

Department: Biology

In this study, the toxic effects of Delvocid, food additive, were investigated in mice bone marrow cells using chromosome aberrations (CA), micronuclei (MN) and sperm head abnormalities. In addition some liver enzymes, total protein and total testosterone were tested in periferal blood.

Male and female mice were treated with different concentrations of Delvocid (200, 400 ve 800 mg/kg) for 6, 12 and 24 hours in CA and sperm head abnormality tests, liver enzymes, total protein and total testosterone; for 24, 48 and 72 hours in MN test. Delvocid did not increase CA frequency at any of concentrations, increased significantly MN and anormal sperm frequencies. It reduced mitotic index (MI), PCE/NCE ratio and total testosterone values significantly. It did not cause significant changes on liver enzymes.

It was concluded that as Delvocid did not induce CA frequency, it is not clastogenic but it is aneugenic due to induction MN formation and may be regarded as a potential germ cell mutagen due to induction sperm head abnormalities and reduction testosterone values.

2008, 102 pages

Key Words: Delvocid, mice bone marrow, Chromosome Aberrations, Micronuclei, Sperm Aberrations, Liver enzymes, Testosterone

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması ve gerçekleştirilmesinde, beni yönlendiren ,fikir ve bilgisini paylaşan, zamanını vererek tezin oluşumunda yardımlarını esirgemeyen değerli hocam T.Ü. Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Fisun KAYMAK'a, çalışmam sırasında bölümümüzdeki imkanlardan yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Tülin AKTAÇ'a, sonuçların istatistiksel analizini yapan T.Ü. İstatistik ve Çeviri Bürosu öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Nesrin Turan'a, tezimin gerçekleşmesinde her türlü yardımı sağlayan, Genel Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Dr. Fulya Dilek Gökalp Muranlı'ya ve katkıda bulunan tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Her zaman yanımda olduklarını hissederek manevi destek aldığım Dr. Emine ÖZÇELİK'e, aileme ve sevgili eşim Gökhan RASGELE'ye sonsuz teşekkürler.

Bu çalışma Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklenen "Delvosid'in *Mus musculus* Üzerine Toksik Etkisi" başlıklı 751 nolu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir. Desteklerinden dolayı Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu yetkililerine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	IV
ABSTRACT	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. KROMOZOM ABERASYONLARI (KA)	6
2.2. MİKRONUKLEUS (MN)	9
2.2.1. MN tekniğinin gelişimi	11
2.2.2. Fare kemik iliği MN yöntemi	12
2.2.3. Periferik kan ile MN yöntemi	14
2.2.4. Sitokinezi-blok MN yöntemi	15
2.3. SPERM ABERASYON YÖNTEMİ	15
2.3.1. Sperm hücrelerinin üretimi (Spermatogenez)	16
2.3.2. Sperm nukleusunun oluşumu	18
2.3.3. Sperm morfolojisi	18
2.3.4. Spermatogenezi uyaran hormonal faktörler	19
2.4. KARACİĞER ENZİMLERİ	20
2.5. GIDA KATKI MADDELERİ	23
2.5.1. Koruyucu gıda katkı maddeleri	25
2.6. DELVOSİD	32
2.6.1. Natamisin'in özellikleri ve yapısı	34
3. MATERYAL METOD	36
3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN KİMYASAL MADDELERİN HAZIRLANIŞI	36
3.1.1. Konsantrasyonların seçimi	36
3.1.2. Delvosid konsantrasyonları ve kimyasal özellikleri	37
3.1.3. Pozitif kontrol konsantrasyonu	38
3.1.4. Sörensen fosfat tamponunda giemsa boyasının hazırlanışı	38
3.1.5. Kolşisin hazırlanışı	38
3.1.6. Hipotonik solüsyon hazırlanışı	39
3.2. KROMOZOM ABERASYON YÖNTEMİ	39
3.2.1. Boyama işlemi	40

3.3. MİKRONUKLEUS YÖNTEMİ	40
3.3.1. Boyama işlemi	41
3.4. SPERM ABERASYON YÖNTEMİ	42
3.4.1. Boyama işlemi	42
3.5. DAİMİ PREPARATLARIN İNCELENMESİ	43
3.5.1. KA yöntemine göre hazırlanan preparatların incelenmesi	43
3.5.1.1. Mitotik indeks (MI)	43
3.5.2. MN yöntemine göre hazırlanan preparatların incelenmesi	44
3.5.2.1. PCE ve NCE'lerin farklı boyanması	44
3.5.3. Sperm aberasyon yöntemine göre hazırlanan preparatların incelenmesi	45
3.6. TESTOSTERON HORMONUNUN ÖLÇÜLMESİ	46
3.7. KARACİĞER ENZİMLERİNİN ÖLÇÜLMESİ	47
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	47
4. SONUÇLAR	48
4.1. KROMOZOM ABERASYON (KA) YÖNTEMİ	48
4.2. MİKRONUKLEUS (MN) YÖNTEMİ	58
4.3. SPERM ABERASYON YÖNTEMİ	65
4.4. TOTAL TESTOSTERON	70
4.5. KARACİĞER ENZİM AKTİVİTELERİ	72
5. TARTIŞMA	75
KAYNAKLAR	85
ÖZGEÇMİŞ	102

SİMGELER DİZİNİ

ALP	Alkalen Fosfataz
ALT	Alanin Transferaz
AST	Aspartat Transferaz
AO	Akridin Oranj
CHO	Çin Hamster Over
DNA	Deoksiribonukleik Asit
FISH	Floresan In Situ Hibridization
FSH	Folikül Stimulan Hormon
HGPRT	Hipoksantin Guanin Fosforibozil Transferaz
ISH	In Situ Hibridization
KA	Kromozom Aberasyonları
KKD	Kardeş Kromatid Değişimi
LD	Letal Doz
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LH	Lütein Hormon
MI	Mitotik İndeks
MMC	Mitomisin C
MN	Mikronukleus
MNNCE	Mikronukleuslu Normokromatik Eritrosit
MNPCE	Mikronukleuslu Polikromatik Eritrosit
NCE	Normokromatik Eritrosit
PCE	Polikromatik Eritrosit
RI	Replikasyon İndeksi
RNA	Ribonukleik Asit
SCE	Sister Chromatid Exchanges

1. GİRİŞ

Modern insanın yaşam biçimi ve çevre kirliliğinden kaynaklanan sorunlar, insan sağlığını tehdit edici düzeylere ulaşmıştır. Yediğimiz, içtiğimiz, kullandığımız ve çevremizde sıkça maruz kaldığımız çoğu madde, insan sağlığına zararlıdır. Kuşkusuz bu tür zararlı maddelerin başında kimyasal maddeler gelmektedir. Günümüzde 80.000 civarında kimyasal madde çeşitli amaçlar için kullanılmakta ve bu sayı her geçen yıl artmaktadır.

Kimyasal maddelerin kullanımı 1940'lerden sonra hızla artmıştır. Gıda katkı maddeleri, kimyasal madde grupları içinde en sıkı denetim altında olan gruptur. Gıda katkı maddeleri, gıdalarda mikrobiyolojik bozulmayı önleme ve dayanıklılığı artırma, besleyici değeri koruma, teknolojik işlemlere yardımcı olma, renk, görünüş, lezzet, doku gibi duyuşal özellikleri düzeltme gibi pek çok amaçla kullanılan maddelerdir. Gıda katkı maddelerinin kullanımı, insanlık tarihi kadar eskidir. İnsanoğlunun ateşi bulup çevresindeki gıda ham maddelerini pişirerek tüketmeye başladığı dönemde, ilk doğal katkı maddesi olarak tuz ve bazı bitkisel ürünler (baharatlar) kullanılmaya başlanmıştır. Yirminci yüzyıl, her konuda olduğu gibi, gıda sanayinde de çok önemli gelişmelerin yaşandığı bir dönemdir. Dünya nüfusunun hızlı artışı, insanların hayat standartlarını yükseltme eğilimi ve hızlı endüstrileşme, şehirleşme, hazır yiyeceklere talebi arttırmış, özellikle ileri gitmiş ve gelişmekte olan tüm ülkelerde, gıda maddeleri üretiminin bir sanayi kolu haline gelmesine neden olmuştur. Böylece, işlenmiş gıda ürünleri son derece çeşitlenmiş ve üretimde kullanılan gıda katkı maddelerinin sayıları da büyük bir hızla artmıştır. Günümüzde, 2000'den fazla gıda katkı maddesinin gıda sanayinde kullanımına değişik amaçlarla izin verilmiş ve kullanım birçok ülkede yasal düzenlemelerle belirlenmiştir.

Gıda katkı maddelerinin kullanımında dikkat edilecek en önemli konu insan sağlığının korunmasıdır. İnsanlar bu maddelere doğumdan ölüme kadar maruz kalabilmektedirler. Katkı maddelerini bulunduran gıdaları yüz milyonlarca kişi tükettiğinden yapılacak en ufak bir hata, insan sağlığı ile ilgili büyük sorunlar yaratabilir. Güneşli (2000) gıda katkı maddelerinin aşırı tüketiminin, bazı hastalıklarla

ilgili olarak astım, baş ağrısı, alerjik kaşıntılar, gastrik rahatsızlıklar, ishal, hiperaktiflik ve aşırı duyarlılık gibi belirtilerin ortaya çıkmasına neden olduğunu, Briggs ise (1997) gıda katkı maddelerinin sürekli alınması halinde toksik etkiler meydana geldiğini bildirmişlerdir (Sarıkaya ve Solak, 2003). Fenilketonüri, Çölyak, hemokromatozis, Wilson hastalığı gibi gıdalarla ilgili genetik hastalıklarda, bazı maddeler metabolik bozukluklardan dolayı organlarda birikir veya değişik mekanizmalarla toksisite oluşturabilirler. Gıdalarda doğal olarak bulunan bu maddelerden bazıları gıda katkılarında da bulunduğu bu hastalar için çok zararlı olabilirler (Mercangöz ve Tüylü, 2000). Çevremizdeki çeşitli kimyasal maddelerin mutasyonlara ve kansere neden olduğu da bilinmektedir.

Kimyasal maddelerin organizmada oluşturduğu hasar toksisite olarak adlandırılır. Her kimyasal madde doza bağımlı olarak toksiktir. 16. yüzyılda Paracelsus tarafından “her madde zehirdir, zehir ile zehir olmayanı ayıran dozdur” şeklinde ifade edilen bu gerçek, bugün toksikolojinin temelini oluşturmuştur. Gıda katkı maddelerinin toksik etkileri çeşitli test sistemleri ile kontrol edilir. Son yıllarda bir çok araştırmacı gıda katkı maddelerinin bitkilerde, hayvanlarda ve insanlarda meydana getirdiği toksik etkileri göstermek için çeşitli çalışmalar yapmışlardır.

Rencüzoğulları vd. (2001b) sodyum metabisülfid, Dönbak vd. (2002) borik asit ile, Gömürgen (2005) potasyum metabisülfid ve potasyum nitrat ile yapmış oldukları çalışmalarda, *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde anormal hücre yüzdesinin arttığını, mitotik indeksin anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir. Yi ve Meng (2003) ise, sülfürdioksit ve hidratlarının *Allium sativum* ve *Vicia faba*'nın MN frekansında anlamlı artış meydana getirdiğini gözlemişlerdir. Blaszczyk vd.'nin 2003 yılında yaptıkları çalışmada, insan periferel kan lenfositlerinde ethoxyquin KA'nuna neden olmuş; Blaszczyk ve Skolimowski'nin (2006) çalışmasında ise, 2,2,4,7-tetramethyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (THQ) MN testinde anlamlı sonuçlar vermemiş, comet yönteminde DNA hasarında anlamlı artışa neden olmuştur. Carballo vd. (2006) göre thiabendazole insan periferel kan lenfositlerinde sadece bir dozda mitotik indeksi anlamlı olarak azaltmış ve replikasyon indeksinde değişikliklere neden olmuştur.

Toksisite deneylerinde öncelikle kemiriciler (genellikle fare, sıçan, kobay) kullanılır. Nedeni, bu hayvanların memeli hayvanlar grubunda olması, anatomi ve fizyolojilerinin iyi bilinmesi, deney süresince deney koşullarının kontrol edilebilmesi ve

istatistiki sonuçlara ulaşılabilmesi için yeterli sayıda hayvan kullanılabilmesidir. Deneysel hayvanlarında test edilecek kimyasal madde yüksek dozlar da dahil olmak üzere çeşitli dozlarda verilerek muhtemel tüm toksik etkiler araştırılır. Bu amaçla yaptıkları çalışmalarda; *Abdel Aziz vd. (1997)*; gıda endüstrisinde kullanılan eritrosinin farede spermatogenezi etkilediğini; *Horvathova vd. (1999)*; butillenmiş hidroksianizolun sıçanlarda 6-thioguanine-resistant mutasyonlarının frekansını anlamlı olarak azalttığını, *Oishi (2002)*; ilaç, kozmetik ve gıdalarda koruyucu olarak kullanılan parabenin sıçanlarda üreme fonksiyonlarını ve hormonal sekresyonu etkilediğini; *Carballo vd. (2006)* ise; gıda koruyucusu olan thiabendazoleun, CHO hücrelerinde doza bağlı olarak KKD frekansında anlamlı artışa neden olduğunu göstermişlerdir. Çin hamster hücrelerinde yapılan diğer çalışmalarda; sorbik asit ve onun potasyum tuzunun KA ve KKD (*Hasegawa vd. 1984*); potasyum sorbatın KKD (*Abe ve Sasaki, 1977*), sodyum nitritin fibroblastlarda KA'unu oluşturduğu (*Ishidate vd. 1984, Akın ve Sümer, 1991*) gösterilmiştir.

Gıdalar düşük sıcaklıkta depolansa bile, üzerlerinde toksik bileşikler (mikotoksinler) meydana gelir. Bunların meydana gelmesi insan sağlığı için bir tehdittir. Bu mikotoksinlerin bazıları kanserojenik özelliklere sahiptir. Mikotoksinlerin miselyumları gıdanın içine kadar nüfuz eder ve gıda yüzeyi iyice temizlenmiş olsa dahi bu mikotoksinlerden arındırılmış olmaz. Besinlerde mikotoksin oluşumunu önlemek için kullanılan gıda katkı maddelerinden biri etken maddesi natamisin olan Delvosid'tir. Delvosid'in meydana getirdiği antimikotik kontrol oldukça önemlidir. Natamisin, *Streptomyces natalensis* ve yakın türlerinin aerobik fermentasyonu ile meydana getirilen polien makrolid grubu bir antibiyotiktir. Ayrıca natamisin; peynir yüzeyinde, et ve sucuk-sosis gibi steril olmayan diğer ürünlerde maya ve mantarların çoğalmasını kontrol etmek için gıda katkı maddesi olarak kullanılır (*WHO, 2006*). Natamisin'in *Salmonella typhimurium* suşlarında, Salmonella/memeli mikrozom mutasyon yönteminde, fare lenfoma mutasyon yönteminde, CHO hücrelerinde KA yönteminde mutajenik etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir (*EMEA, 1998*). 2 yıl süren bir çalışmanın sonucunda Natamisin'in sıçanların üreme yetenekleri üzerine etkisi olmadığı bildirilmiştir. Oysa Natamisin, tavşanlarda ve köpeklerde düşük akut toksisiteye sahiptir (*EMEA, 1998*).

Kimyasal maddelerin genotoksik etkilerinin anlaşılmasındaki en önemli kriterlerden biri kromozom aberasyonu ve mikronukleus oluşturabilme yeteneğidir. Son yıllarda bu sitogenetik testlere ilave olarak sperm morfolojisindeki anormallikler ve total protein miktarı, bazı enzimler ve hormonların miktarındaki değişiklikler de genetik hasarın ölçülmesi için kullanılmaya başlanmıştır.

Etken maddesi Natamisin olan Delvosid'in, fare kemik iliği hücrelerinde KA, MN oluşturma yeteneği ve sperm morfolojisi üzerine olan etkisi hakkında yapılmış çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda Delvosid'in farklı konsantrasyonlarının, farklı muamele sürelerinde, farelere uygulanmasıyla kemik iliği hücrelerinde KA ve MN oluşumu, bazı karaciğer enzimlerinin ve total proteinin kandaki değerleri, sperm hücrelerinde morfolojik anormallikler ve bununla ilişkili olarak serum testosteron düzeyinin araştırılarak bu kimyasalın toksik aktivitesinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamız sonunda; Delvosid'in farklı konsantrasyon ve muamele sürelerinde fareler üzerine olan çeşitli etkileri hakkında veriler elde edilecek ve bu verilerin ışığında hangi konsantrasyonlarda toksik olabileceği saptanmış olacaktır. Günümüzde gıda katkı maddelerinin yaygın olarak kullanımı göz önüne alınacak olursa, bu çalışmadan elde edilecek bilgiler, gıda katkı maddelerinin insan sağlığındaki tehlikenin boyutlarını göstermede bize yararlı olabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

Yaşayan çeşitli organizmalar kalıtsal maddelerinin toplam miktarı ve içerdikleri nükleotidler bakımından farklıdır, yani değişik genotipe sahiptirler. Organizmaların ortak bir atadan türedikleri halde farklı genotipe sahip olmalarının nedeni atasal genotipin evrim boyunca farklı genotipleri vermek için değişikliğe uğramış olmasıdır. Genotipteki değişikliklere mutasyon denir. Mutasyon terimi ilk olarak 1890 yılında de Vries tarafından kullanılmıştır (Temizkan, 1999). Canlıda yaşam boyunca birçok premutasyon meydana gelir. DNA'da meydana gelen bu değişiklikler, molekülde oluşan değişikliği tanıyan ve daha sonra da onu düzelten sistemler tarafından en aza indirgenirler. Bazen de DNA'da meydana gelen değişiklikler düzeltilmeden kalabilirler. Bu durumda o hücrede mutasyon buna bağlı olarak kanser oluşumu hatta ölüm meydana gelebilir. Mutasyonlar doğada kendiliğinden meydana geldiği gibi mutagen adı verilen fiziksel ve kimyasal etkenler tarafından da meydana getirilebilirler. Daha dayanıklı ve verimli çeşitler elde etmek amacı ile yapay yollarla mutasyon elde etme düşüncesi ilk kez 1901'de de Vries tarafından ortaya atılmıştır (Demir, 1986).

1927'de Müler X ışınları ile *Drosophila*'da, 1928'de Standler X ve Gama ışınları ile mısırdaki yapay mutasyonlar elde etmişlerdir (Gardner vd. 1991). Auerbach, II. Dünya savaşı sırasında Mustard (hardal) gazının canlılar üzerindeki etkisini gözlemiş ve *Drosophila*'da bu kimyasal maddeyi kullanarak yeni mutantlar elde etmeyi başarmıştır (Jenkins, 1975).

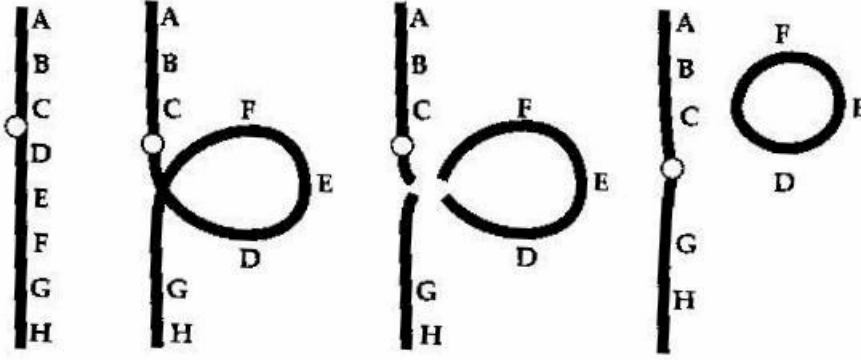
Mutajenik ajanların genotoksik etkilerinin incelenmesi için çeşitli in vitro ve in vivo kısa süreli testler geliştirilmiştir (Sato ve Tomita, 2001). Bu testlerden bazıları; in vivo fare kemik iliği kromozom aberasyon testi, mikronukleus testi, sperm morfolojisindeki anormallik testi gibi sitogenetik testlerdir. Son zamanlarda bazı biyokimyasal parametrelerdeki değişiklikler de genetik hasarın belirlenmesinde kullanılmaktadır.

2.1. Kromozom Aberasyonları

Kromozomların yapı ve sayısında meydana gelen değişimlere kromozom aberasyonları (KA) denir. Bu tür değişiklikler sonunda genlerin sayısı ve yerleşim düzenleri değiştii için eskisinden farklı genotipik özellikler meydana gelir. Kromatid kırık, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, halka kromozom, kardeş kromatid birleşmesi, translokasyon, inversiyon yapısal kromozom aberasyonlarıdır.

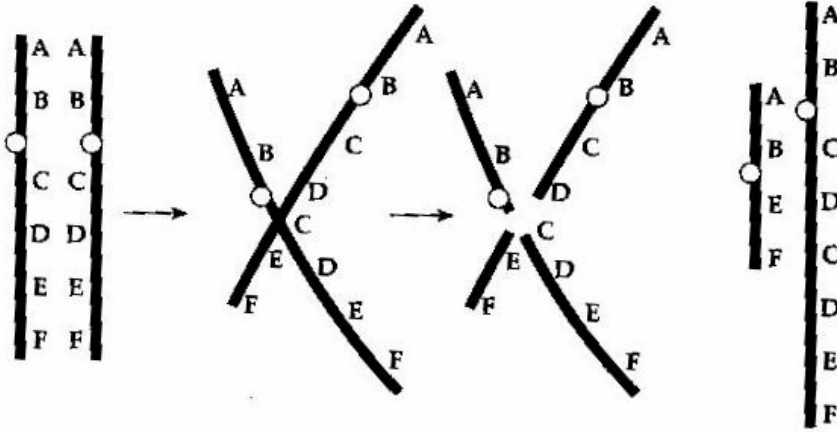
Kromatid kırığı; bir kromozomun iki kromatidinden birinde kırık meydana gelmesidir. Kırık olan parça sağlam olan kardeş kromatide çok yakın bulunur. Kromozom kırığı; bir kromozomun iki kromatidinde de kırığın oluşmasıdır. Kromozom biri sentromerli diğeri sentromersiz olmak üzere iki parçaya ayrılır. Bu parçalar ya birleşmeden kalır ve sentromersiz olan parça sonuçta kaybolur, ya kırık uçlardan yeniden birleşirler, ya da kromozom parçalarına aynı veya farklı kromozomlara ait parça bağlanır. Sonuçta kromozomların yapısında değişmeler meydana gelir. Metafaz plağında kopmuş olan, kromozomdan ayrı yerde bulunan kromozom parçasına fragment denir. Disentrik kromozomlar, iki kromozomun uç kısımlarında kromozom tipi kırık meydana gelmesi, sentrik fragmentlerin kopuk olan uçlarının birbirleriyle birleşmesi sonucu oluşur. Kromozomal kırılma sonucu oluşan iki kardeş kromatidin kırık olan uçlarının birleşmesine kardeş kromatid birleşmesi (sister union) denir. Bir kromozomun iki ucundan kromozomal kopma sonucu oluşan uçların birbirleriyle birleşmesiyle halka kromozom oluşur. Bu kromozomların kardeş kromatidlerinin zıt kutuplara çekilmesiyle her bir hücre birer halka kromozoma sahip olur.

Kromozomun bir ucundan bir parçanın kopup kaybolmasına yani tek bir noktada kırılma meydana gelmesine defisiyens, aradaki herhangi bir bölgeden parçanın kaybolmasına yani iki noktada kırılma meydana gelmesine ise delesyon denir (Şekil 2.1.1.). Bir kromozomun kendi üzerinde dönüp ilmek oluşturması sırasında, ilmeğin keşişme noktası iki yerden kırılır, iki tane sentromersiz ve bir tane sentromerli parça meydana gelebilir. Sentromerli parça sentromersiz olan diğer parça ile birleşebilir, sentromersiz olan diğer parça önce iki ucunun birleşmesiyle halka oluşturur ancak sentromeri olmadığı için daha sonra bozularak kaybolur.



Şekil 2.1.1. Delesyon (Kuru ve Gözükara, 2001)

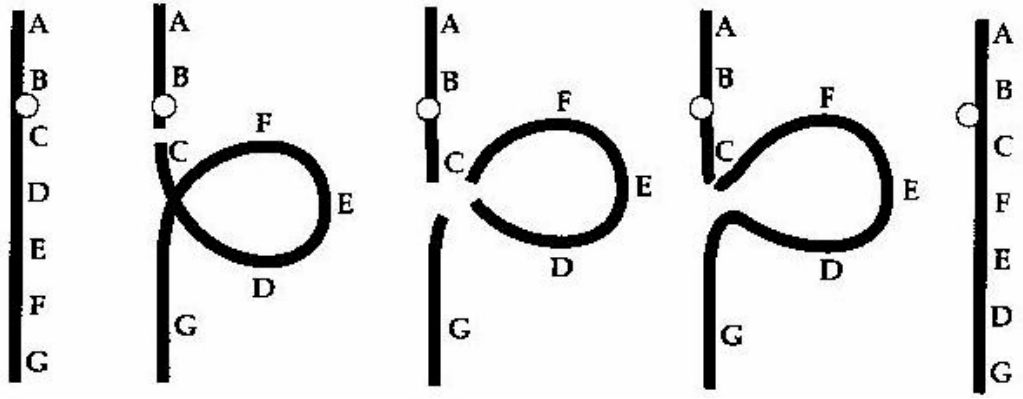
Bir kromozomun bir parçayı iki veya daha fazla sayıda taşımasına duplikasyon adı verilir (Şekil 2.1.2.). Homolog kromozomların sinapsis sırasında birbirleriyle kesişme noktalarında kırılmalar olabilir.



Şekil 2.1.2. Duplikasyon (Kuru ve Gözükara, 2001)

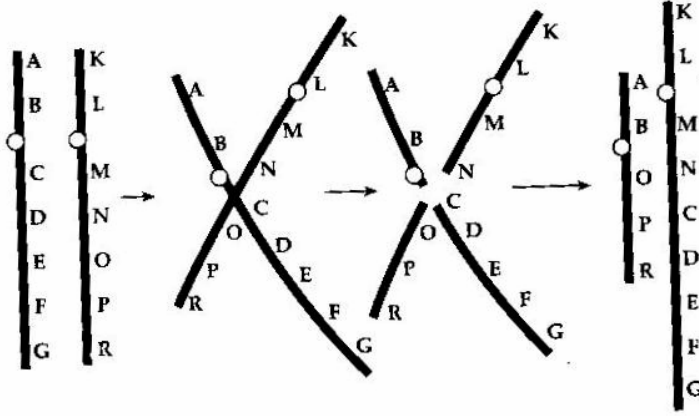
Meydana gelen sentromerli ve sentromersiz parçaların değişik şekillerde birleşmeleri sonucunda delesyonlu bir kromozomla duplikasyonlu bir kromozom ortaya çıkar. Eğer duplikasyona neden olan parça kromozoma ters çevrilmeden bağlanırsa tandem duplikasyon, ters çevrilip bağlanırsa ters tandem duplikasyon adını alır.

Bir kromozomun kırılma sonucu kopan parçasının dönerik koptuğu yere ters yönde yeniden yapışmasıyla inversiyon meydana gelir (Şekil 2.1.3.). Bu yapışan parçanın sentromeri varsa perisentrik, sentromeri yoksa parasentrik inversiyon denir. İncersiyonda bir kromozom üzerinde bulunan genlerin hiçbiri eksilmediği ya da artmadığı halde, genlerin yerleşim düzenleri değiştiği için fenotipte de değişme meydana gelir.



Şekil 2.1.3. İncersiyon (Kuru ve Gözükara, 2001)

Homolog olmayan kromozomlar arasında kromozom parçasının yer değiştirmesine translokasyon denir (Şekil 2.1.4.). Homolog olmayan iki kromozomda kopan parçaların yer değiştirmesine resiprokal translokasyon, homolog olmayan iki akrosentrik kromozomda sentromere yakın bölgede kırılmanın meydana gelmesiyle, kırılan kromozom parçaları birleşerek biri büyük diğeri küçük iki metasentrik kromozom oluşmasına Robertsonian translokasyon adı verilir.



Şekil 2.1.4. Translokasyon (Resiprokal) (Kuru ve Gözükara, 2001)

Kromozomun boyanmamış (akromatik) bölgesi, kromatid kalınlığına eşit ya da daha dar ise gap, fazla ise kromatid kırık olarak isimlendirilir. Eğer bir kromatidde gap oluşmuş ise kromatid gap, ikisinde de oluşmuş ise izokromatid gap adı verilir. Kromozomda soluk boyanan bölgeler spiral çözülmesinin olduğu bölgelerdir. Gap'a oranla daha geniş bir alanı kapsar. Kromozomların kontrole göre boylarının çok kısılması ve kalınlığının artmasına kromozom kontraksiyonu denir. Kromatid gap, izokromatid gap, spiral çözülmesi ve kromozom kontraksiyonu da anormallik sonucu meydana gelirler ancak bunlar bazı araştırmacılar tarafından anormallik olarak kabul edilmezler.

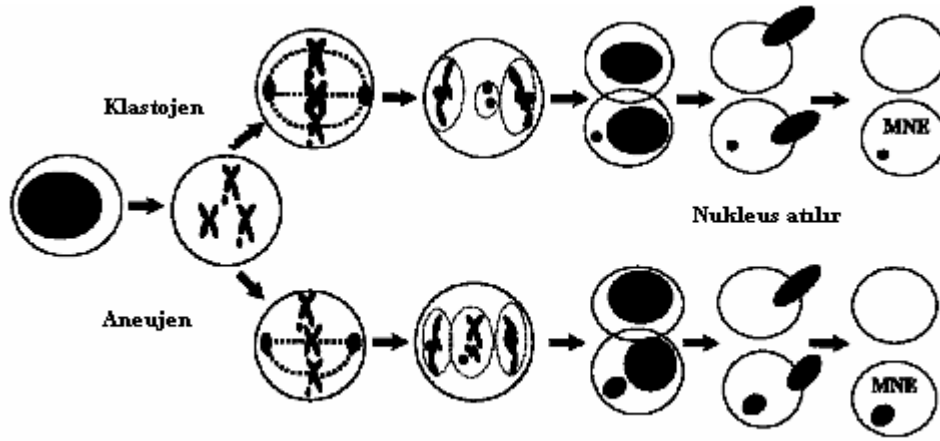
2.2. Mikronukleus (MN)

Son yıllarda DNA hasarlarının tespitinde en yaygın kullanılan iki analiz yönteminden biri kromozom aberasyon analizi, diğeri ise mikronukleus analizidir.

Mikronukleusun görülme sıklığı kromozom kırılmalarına, kayıplarına ve hücre bölünme oranına bağlıdır (Acar vd. 2001, Peace, 1998). Hücrelerde MN sayısının saptanması somatik hücrelerde genomik kararsızlığın göstergesidir.

Yavru bir hücrenin sitoplazmasında nukleusun dışında küçük bir yapı olarak görülen mikronukleus (MN), hem bir ajanın sitotoksik etkisine işaret eden tam bir kromozom, hem de genotoksik etkisine işaret eden kromozom parçası olarak ortaya çıkar.

Klastojenler, kromozom kırığı sonucu asentrik kromozom fragmentlerinden; aneujenler ise sentromer bölünme hataları ve iğ ipliği fonksiyon bozukluğu sonucunda anafaz sırasında geri kalan kromozomdan MN'ları oluştururlar (Fenech ve Morley, 1985).



Şekil 2.2.1. Mutajenler tarafından mikronukleuslu eritrositlerin meydana gelişi

Klastojenik etki sonucu oluşan ve asentrik kromozom fragmentleri içeren MN'ların, aneujenik etki sonucu oluşan tam bir kromozom içeren MN'lardan daha küçük olduğu (Şekil 2.2.1.) kabul edilmektedir (Sato ve Tomita, 2001).

2.2.1. MN tekniğinin gelişimi

MN tekniği kromozom anormalliklerine neden olan genotoksik ajanların etkisini araştırmak için geliştirilen sitogenetik bir yöntemdir. 1950'lerde bitki, 1970'lerde hayvan hücrelerinde, 1976'da kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kromozom hasarının tespitinde kullanılmıştır (Demirel ve Zamani, 2002). Yamamoto ve Kikuchi (1980), Heddle vd. (1983), Högstedt ve Karlsson (1985), Vig ve Swearngin (1986), Vanderkerken vd. (1989), Vanparys vd. (1990) yaptıkları çalışmalarda, basit ve pratik oluşu sebebiyle MN testini, kimyasal mutajenlerin hücre bölünmesi sırasında oluşturdukları toksik etkinin belirlenmesinde popüler bir yöntem olarak kullanmışlardır (Vanparys vd. 1992). Von Ledebur ve Schmid 1973'te, Heddle ve Countryman 1976'da, Högstedt ve Karlsson 1985'te geliştirdikleri modifiye metotlarla anöploidiye yol açan ajanlar ile klastojenleri birbirinden ayırmada MN'ların büyüklük farkından yararlanmışlar; klastojenlerce oluşturulan MN'ların asentrik kromozom fragmentleri içeren küçük, aneujenlerce meydana gelenlerin ise tam kromozom içerdiklerinden daha büyük MN'lar olduğunu göstermişlerdir (Demirel ve Zamani, 2002). Eastmond ve Tucker (1989) aynı amaçla antikinetokor antikorumları kullanarak kinetokor pozitif MN'lerin tam bir kromozom, kinetokor negatif MN'lerin ise asentrik kromozom fragmenti içerdiğini ve bu yöntemin anöploidiyi uyaran ajanları klastojenlerden ayırmada daha kesin bir yol olduğunu vurgulamışlardır (Demirel ve Zamani, 2002). Daha sonra 1985 ve 1986 yıllarında, Fenech ve Morley tarafından Sitokinezi-Blok (Cytokinesis-Blocked) Metodu geliştirilmiştir (Demirel ve Zamani, 2002). MN araştırmalarında in situ hibridizasyon (ISH) tekniği, ilk defa kromozomların sentromerini tanımlamak için Norppa vd (1993) tarafından uygulanmıştır. Floresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniği ile de MN oluşturan kromozomların her birinin kimliğini belirleyebilecek teknolojik gelişmeler sağlanmıştır (Demirel ve Zamani, 2002).

2.2.2. Fare kemik iliği MN yöntemi

Kemik iliği, hematopoietik bir dokudur. Hematopoietik hücrelerin çoğalması sırasında bir kimyasalın uygulanması, mitotik iğ ipliklerinin inhibisyonuna ya da kromozom hasarına neden olabilir (OECD, 2005).

Fare kemik iliği MN testi, ilk olarak 1970’de Boller ve Schmid, 1973’te Heddle tarafından kullanılmıştır (Kirsch-Volders vd. 2003). Test, kimyasal bileşikler aracılığıyla kromozomal hasardan oluşan küçük nükleusun (MN) belirlenmesi temeline dayanır. Oluşan MN sitoplazmada kalır.

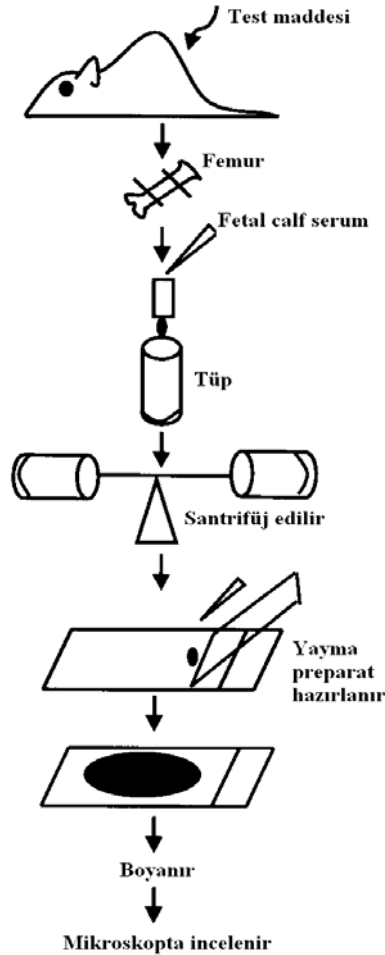
Fare kemik iliği MN testinde eritrositler kullanılır. Eritroblastlar PCE’lere dönüştüğünde mitozdan yaklaşık 6 saat sonra nükleuslarını kaybederler ve MN’u belirlemek daha kolay olur (Mavournin vd. 1990). MN yüzdesini belirlemek için, polikromatik (PCE) ve normokromatik eritrositler (NCE) incelenir (Vijayalaxmi ve Venu, 1999). Eritropoez sırasında meydana gelen nükleus hasarını belirlemek için kullanılan bu eritrositler, boyanma özelliklerinden dolayı kolaylıkla ayırt edilebilirler (Rabbani vd. 2005).

PCE, yeterince gelişmemiş, olgunlaşmamış eritrosittir, gelişimin ara safhasındadır hala ribozomları vardır. NCE, olgun eritrosittir, ribozomları yoktur ve periferik siklusta yaklaşık bir ay kalırlar (Mavournin vd. 1990). PCE’ler, May Grünwald-Giemsa ile maviye, akrinin oranj ile kırmızıya boyanırlar. NCE’ler ise May Grünwald-Giemsa ile kırmızı renk alırken, akrinin oranj ile boyanmazlar.

MN’ların değerlendirilmesi bazı kriterlere göre yapılmaktadır: MN’un çapı, eritrosit nükleusunun yarısından daha az olmalıdır. Şekli yuvarlaktır fakat bazen oval, halka ya da badem şeklinde olabilir (Schmid, 1975). MN’un sınırları genellikle açıktır.

Heddle vd. (1983) göre, eritrosit popülasyonunda MN’un %6’dan fazla olması kullanılan kimyasal maddenin genotoksitesini (Rabbani vd. 2005); PCE/NCE oranındaki azalma ise, sitotoksitesini belirler. Schmid’e (1975) göre ise, normal kemik iliğinde PCE/NCE oranı genellikle 1:1’dir (Çelik vd. 2003). Nükleuslu hücrelerin olgunlaşması ve bölünmesi üzerine sitotoksik etkiler meydana geldiğinde, kemik iliğinde boşluk oluşması sebebiyle, PCE/NCE oranında azalma olabilir (Schmid,1976; Gollapudi vd. 1984). Ayrıca yeni olgunlaşan NCE’ler, periferik kana anında salınamayabilir ve kemik iliğinde kalır (Von Ledebur ve Schmid, 1973).

Sıçan kemik iliğinde PCE'lerin yaşam süresi: 10 ve 33 saat arası olduğundan (Cole vd. 1979; Salamone ve Heddle 1983) ve MN'lu PCE sayısı aneujenler ve klastojenler için sırasıyla 6 ve 10 saate arttığı için (Cole vd. 1981, Hart ve Hartley-Asp,1983, Vanderkerken vd. 1989), aneujenik veya klastojenik kimyasallar ya da onların reaktif metabolitleri muameleden 24 ve 48 saat sonra kemik iliğinde belirlenebilirler (Vanparys vd, 1992). Bu nedenle, farede in vivo MN testinde, bir kimyasal maddenin toksik etkisini belirleyebilmek için, kimyasal madde uygulandıktan sonra, 12 ve 72 saat aralığından en az üç muamele süresi kullanılır (OECD 1983, EEC 1984) (Şekil 2.2.2.1.).

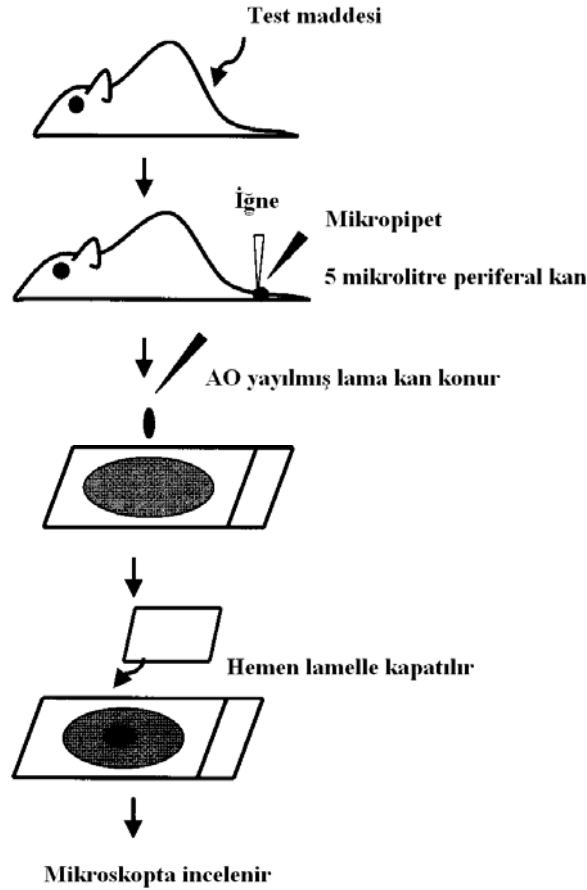


Şekil 2.2.2.1. Kemik iliği yöntemi: Kimyasal madde uygulanır, muamele süresinin sonunda hayvan sakrifiye edilir, fetal calf serum ile femurdan kemik iliği çıkarılır, santrifüj edilir, süpernatant atılır, pipetaj yapılır, yayma preparatlar hazırlanır, fiksasyon ve boyama işleminden sonra mikroskopik inceleme yapılır.

2.2.3. Periferal kan ile MN yöntemi

Periferal kan ile MN yöntemi, ilk kez farelerde MacGregor vd. tarafından 1980’de geliştirilmiştir. Bununla birlikte periferal kanda olgunlaşmamış eritrosit miktarı azdır, bu nedenle MN değerlendirmesi çok zordur. Periferal kandaki olgunlaşmamış eritrositleri ayırdetmeyi Hayashi vd. 1990’da geliştirdikleri akrinin oranj floresan metodu ile kolaylaştırmışlardır. Periferal kan yönteminde, aynı hayvan bir çok kez kullanılarak hayvan sayısının sınırlı olması sağlanır. Bu yöntemde;

- AO solusyonu lam üzerine homojen olarak yayılır
- 5 µl periferal kan kuyruğun kesilmesiyle alınır
- Kan herhangi bir antikoagülan kullanmadan AO’lu lamın ortasına konur ve hemen bir lamelle kapatılır(Hayashi vd. 1990) (Şekil 2.2.3.1).



Şekil 2.2.3.1. Periferal kan yöntemi

Tanisho vd. (1998), Hayashi vd. (1998), Peace ve Succop (1999), Saotome vd.'ne (1999) göre hayvan kanının kullanıldığı bu metod, insanlara, balıklara, kabuklu deniz hayvanlarına ve hatta böceklere uygulanabilir (Sato ve Tomita, 2001).

2.2.4. Sitokinezi-blok MN yöntemi

Sitokinezi-blok MN yöntemi, Fenech ve Morley tarafından 1986'da geliştirilmiştir. Fenech vd.'nin 1999'da, Kirsch-Volders vd.'nin 2003'te yaptıkları çalışmalara göre, hücre kültürüne mitoz sırasında sitoplazma bölünmesini durduran aktin inhibitörü cytochalasin-B ilave edilmesiyle çekirdek bölünmesi tamamlanır, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştiremeyen çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilir ve MN bulunduran hücrelerin oranı saptanabilir. İncelenen alanda, kültür süresi içinde ikinci bölünmesini tamamlayan 4 çekirdekli hücrelere de rastlanabilir; ancak MN sayımında Heddle ve Countryman'in (1976) kriterleri kullanıldığından bu hücrelerde görülen MN'ler değerlendirme dışı bırakılır. Heddle ve Countryman'in kriterlerine göre:

1. MN çapının esas çekirdeğin 1/3'ünden küçük olması;
2. Boya alma yoğunluğunun esas çekirdek ile aynı olması;
3. Sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MN'lerin sayılması esas alınmaktadır (Demirel ve Zamani, 2002).

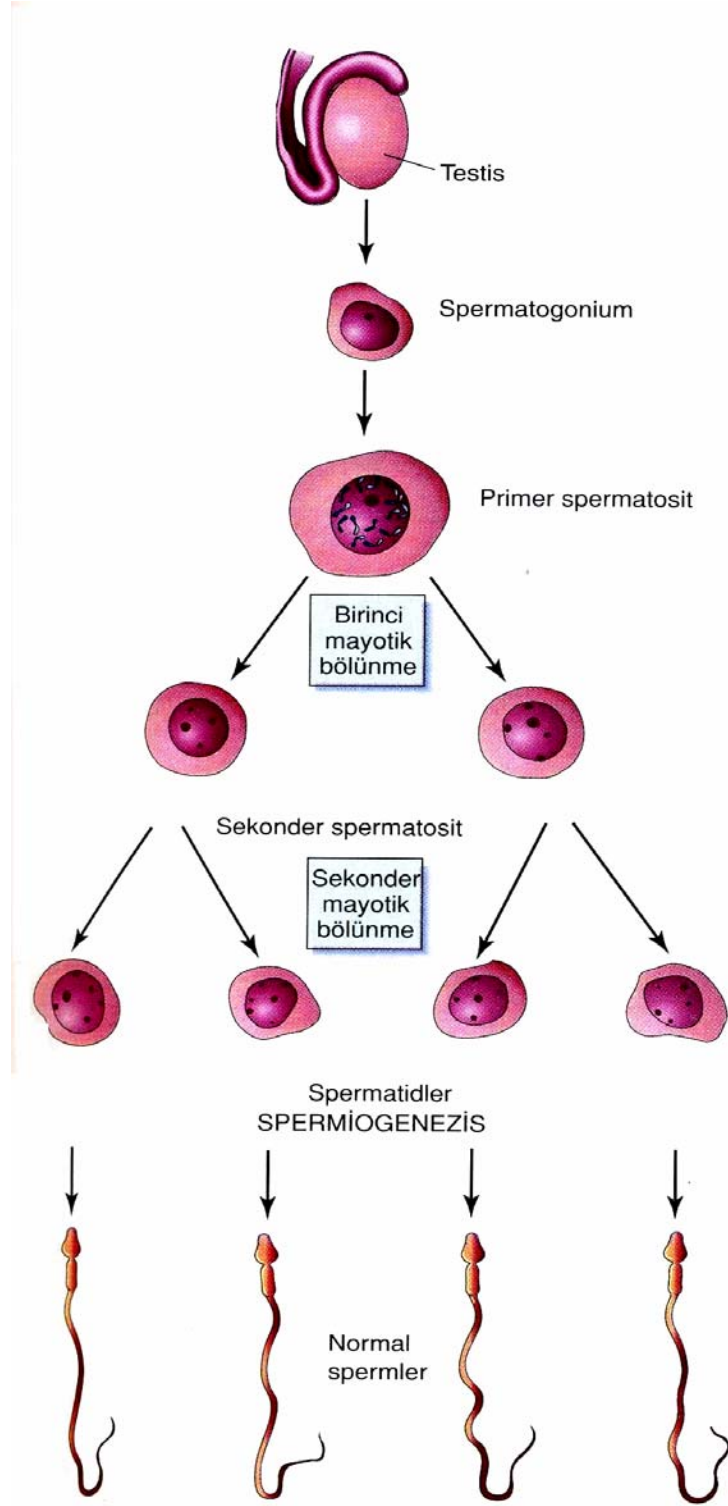
2.3. Sperm Aberasyon Yöntemi

Sperm aberasyon yöntemi, insanların dahil olduğu memelilerin erkek üreme hücrelerinde genetik hasarı değerlendirmek için kullanılan bir yöntemdir (Lu vd. 2005). Wyrobek ve Bruce tarafından 1975 yılında geliştirilmiştir. Sperm morfolojisinde

anormalliğin meydana gelmesi, erkek germ hücresindeki genetik hasarı gösterir (Clode ve Anderson, 1988). Sperm başı anormallikleri; küçük delesyonlar, nokta mutasyonlar (Wyrobek ve Bruce, 1975), ya da protein anormalliğinden (Brinkworth vd. 1987) ileri gelir (Anand ve Mithilesh, 2002). Bruce ve Heddle'ye (1979) göre ise; morfolojik anormallikler, testiküler DNA'daki değişimler sebebiyle meydana gelebilir, sonucunda da spermatozoanın farklılaşması bozulur.

2.3.1. Sperm hücrelerinin üretimi (Spermatogenez)

Spermatogenez, primitif germ hücrelerinin (spermatogonia) spermatozoa ve sperme dönüşmesi sırasındaki olayları açıklar. Fötal hayatta testis seminifer tübüllerinde **spermatogonium** inaktif durumdadır. Birkaç mitoz bölünme sonrasında spermatogonium büyür ve aşamalı bir gelişme sonrası seminifer tübül içindeki en büyük germ hücresi olan **primer spermatosit** dönüşür. Bundan sonra her primer spermatosit birinci mayoz bölünmeye girer ve primer spermatositin yarısı büyüklüğündeki 2 adet haploid **sekonder spermatositi** oluşturur. Daha sonra sekonder spermatosit ikinci mayoz bölünmeye geçer ve bunun sonunda dört adet haploid kromozumlu **spermatid** oluşur. Spermatidlerden de dört adet olgun sperm oluşur. Spermatidlerden spermilerin oluşmasına **spermiogenezis** denir (Moore ve Persaoud, 2002) (Şekil 2.3.1.1).



Şekil 2.3.1.1. Spermatogenez (Moore ve Persaoud, 2002)

2.3.2. Sperm nukleusunun oluşumu

Spermatogenezin son aşamasında spermatid nukleusunun yeniden şekillendiği ve kondanse olduğu görülmektedir. Önce histon karakterinde olan nükleer proteinler transisyon proteinleri ile; bu proteinler de protamin ile yer değiştirmektedirler. Bu olay sperm nukleusunun sıkı bir şekilde paketlenmesini ve dış etkenlere karşı kendini korumasını sağlar. Sonuç olarak; sperm olgunlaşması sırasında önce gevşek yapıda olan kromatin (DNA+nükleer proteinler) daha sonra sıkı bir şekilde paketlenerek daha sağlam bir yapı oluştururlar (İrez vd. 2007).

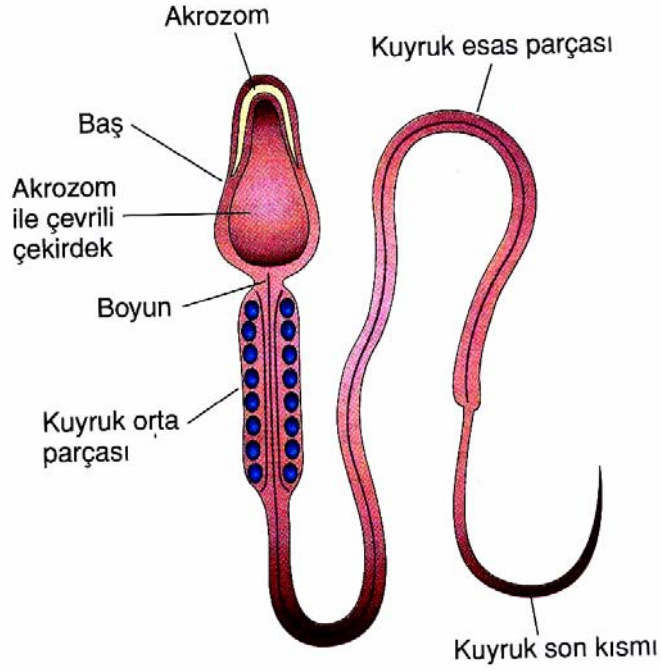
2.3.3. Sperm morfolojisi

Olgun sperm, bir baş ve kuyruktan oluşan, serbest yüzebilen, aktif olarak hareketli bir hücredir. Spermin başı ile kuyruğunun birleştiği yere boyun denir. Spermin baş kısmında nukleus, ince bir sitoplazma ve çevrelerinde hücre zarı bulunur. Başın 2/3 ön dış tarafında Golgi aygıtından oluşan kalın bir başlık, akrozom bulunur (Şekil 2.3.3.1.). Şapka şeklindeki bu kese yapısının içinde bir çok enzim vardır. Bunlar, dokuların proteoglikan filamentlerini sindirebilen hiyalüronidaz ve proteinleri sindirebilen güçlü proteolitik enzimleridir. Bu enzimler spermin ovuma girmesi ve onu fertilize etmesinde önemli rol oynarlar.

Flagellum adı verilen kuyruk kısmında üç önemli bileşen bulunur:

- 11 mikrotübülün oluşturduğu, aksonem de denilen merkezi bir iskelet,
- Aksonemi kuşatan ince bir hücre zarı,
- Kuyruğun proksimal kısmında aksonem çevresinde mitokondri topluluğu.

Kuyruğun öne ve arkaya hareketleri spermin motilitesini sağlar. Bu hareket aksonemayı oluşturan ön ve arka tübüller arasındaki ritmik kayma hareketi ile sağlanır. Bu olay için gerekli enerji, kuyruğun gövdesindeki mitokondrilerde sentezlenen adenozin trifosfattan sağlanır.



Şekil 2.3.3.1. Sperm Morfolojisi (Moore ve Persaoud, 2002)

2.3.4. Spermatogenezi uyaran hormonal faktörler

Spermatogenez üzerine etkili olan hormonlar testosteron, lütein hormon, folikül uyarıcı hormon, östrojenler ve büyüme hormonudur.

- Testosteron, testislerde interstisyumda bulunan Leydig hücrelerinden salgılanır. Sperm yapımında testisin germinal hücrelerinin bölünme ve gelişimleri için gereklidir.
- Lutein hormon, ön hipofiz bezinden salgılanır, Leydig hücrelerini uyarak testosteron salgılanmasını sağlar.
- Folikül uyarıcı hormon da ön hipofiz bezinden salgılanır. Sertoli hücrelerini uyarır. Bu uyarı olmaksızın spermatidlerin spermelere dönüşümü (spermiyogenez) olanaksızdır.

- FSH tek başına spermiyogenez için yeterli değildir. FSH spermatogenezi başlatan, testosteron ise devam etmesini sağlayan hormonlardır. İnterstisyel hücreler tarafından testosteron salgılanabilmesi için LH'a ihtiyaç duyulduğundan; spermatogenezin meydana gelmesi için hipofiz ön lobundan hem FSH hem de LH salgılanması şarttır.
- Östrojenler, folikül uyarıcı hormon ile uyarılan sertoli hücrelerinde testosterondan yapılır. Muhtemelen spermiyogenez için gereklidirler.
- Büyüme hormonu, testislerin temel metabolik işlevlerinin kontrolü için gereklidir. Büyüme hormonu, özellikle spermatogonyumların erken bölünmesini hızlandırır. Hipofize bağlı cücelikte olduğu gibi, hormonun yokluğunda spermatogenez ciddi boyutlarda yetmezlik gösterir ve infertiliteye neden olur (Guyton ve Hall, 2007).

2.4. Karaciğer Enzimleri

Memelilerde organ fonksiyonlarını test etmek, fonksiyonel hasarları saptamak için serum enzim aktiviteleri klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda bu testler, özellikle çevre biyolojisi ve çevresel kirlenmelerinin canlılar üzerine olan etkilerini incelemek isteyen araştırmacılar tarafından da kullanılmaya başlanmıştır (Mayer vd. 1992). Genelde çevre kirlenmesine neden olan maddeler doku hasarlarına yol açarak hücrel enzimlerin salınımına ve bunun sonucunda da serum enzim konsantrasyonlarında artışa neden olurlar (Mayer vd. 1992).

Organizma için gerekli olan birçok maddenin sentez ve metabolize edildiği organ karaciğerdir (Küçükyurt vd. 1990, Noyan 1993, Tortora ve Grabowski 1996, Marshall ve Bangert 1995). Karaciğerde meydana gelebilecek morfolojik değişimler organizmadaki metabolik olayları da etkilemektedir (Küçükyurt vd. 1990). Hücre zarının geçirgenliğinin değişmesi veya hücrenin parçalanması sonucu bazı karaciğer enzimlerinin kana salınması nedeni ile transaminazlar, alkalin fosfataz, laktat

dehidrogenaz gibi hücrel enzimlerin serumdaki aktiviteleri artmaktadır (Küçükyurt vd. 1990, Gözükara 1990, Akın vd. 1992).

Toksik maddeler büyük oranda karaciğerde detoksifiye edilir (Aras ve Ersen, 1992). Toksik maddeler nedeni ile karaciğerin detoksifiye yeteneği azalır, protein sentezi inhibe olur ve karaciğer hücrelerindeki harabiyet sonucu, serumda bu organın harabiyeti için belirteç olarak kullanılan enzimlerin aktivitelerinde artış gözlenir (Aras ve Ersen, 1992). Protein miktarlarındaki azalmanın ise bu maddelerin DNA ve RNA sentezlerini inhibe etmelerinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir (Karayılanoğlu vd. 1991).

Kimyasal maddelerin etkisine maruz kalan kişilerin karaciğer fonksiyonları ile ilgili olarak elde edilen sonuçlar bu kişilerin kimyasallardan olumsuz yönde etkilendiklerini, karaciğerinde çok büyük oranda olmasa da dejeneratif bozukluklar oluştuğunu, bunun sonucunda harap olan karaciğer hücrelerinden enzimlerin kana salındığını ve serumdaki aktivite artışının bundan kaynaklandığını düşündürmektedir.

Aspartat aminotransferaz (AST), karaciğer, dalak ve diğer organlarda bulunur. Bu dokularda meydana gelebilecek hücre yıkımlarında serum AST değerinde yükselmeler görülebilir. Bu yüzden karaciğer harabiyetinin belirlenmesinde ALT daha önemlidir (Boyd, 1988, Lindena vd. 1986).

Alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz ve laktat dehidrogenaz (LDH), amino asit ve karbonhidrat metabolizması ile ilişkili intraselüler enzimlerdir. Bu enzimler kas, karaciğer ve beyinde yüksek konsantrasyonlarda mevcuttur. Kanda bu enzimlerin yükseklikleri, özellikle bu dokulara özgü nekroz veya hastalığın işaretidir. Yüksek değerler miyokard infarktüsü sonrası (özellikle AST); akut enfeksiyöz hepatit (genelde AST'den ziyade ALT yükselmesi); karaciğer sirozu (AST genelde ALT'den daha fazla yükselmiştir); ve metastatik veya primer karaciğer neoplazmasında gözlenir. Seröz kavitelelerin neoplastik olaylara katılışları ile ilişkili transüdalardaki yükselmeler. AST musküler distrofi, dermatomiyozitis ve paroksizmal miyoglobüride yüksektir. Düşüşler piridoksin (Vitamin B6) yetmezliği, renal yetmezlik ve gebelikte belirlenir.

Laktat dehidrogenaz (LDH), NADH ve NADH₂ varlığında laktat ve pirüvatın birbirine dönüşümlerini kataliz eder. Genellikle vücut hücreleri ve sıvılarda dağılmıştır. Doku nekrozunun eşlik ettiği tüm durumlarda, özellikle kalp, kırmızı kan hücreleri, böbrek, iskelet kası, karaciğer, akciğer ve cildin akut hasarı ile ilişkili durumlarda

yükselmiştir. Belirgin yükselmeler hemolitik anemiye, vitamin B₁₂ ve folat yetmezliğine bağlı anemiler ve polisitemiya rubra vera'ya eşlik ederler. Bir miyokardial enfarktüsün varlığını dorulamada 3-4 gün boyunca izlenen yükselmenin ardından 5-7.günlerdeki düşüş yararlı olabilir, ancak pulmoner enfarktüs, neoplastik hastalık ve megaloblastik anemi ekarte edilmelidir. Enfeksiyöz hepatitin akut fazında yükselmiş olmakla beraber, enzim aktivitesi kronik karaciğer hastalığında nadiren artar.

Alkalen fosfataz (ALP), Büyüyen kemiklerde, safra ve plasentada yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Serumda şimdilik belirli olarak tanımlanmamış bir izoenzim karışımıdır. Yükselme;

-Çocuklarda (kemiğin normal büyümesinde)

-Osteoblastik kemik hastalığı-Hiperparatiroidi, raşitizm ve osteomalazi, neoplastik kemik hastalığı, Paget hastalığında.

-Taş, daralma ve neoplazmaya bağlı hepatik duktus veya kolanjioler tıkanmada.

-Klorpromazin, metil testosteron gibi ilaçlar nedeni ile gelişen hepatik hastalıkta.

-Hamilelikte görülür.

Azalma, hipotiroidi ve çocuklarda büyüme geriliği gözlenir.

Total protein: Protein konsantrasyonu plazmanın koloidal osmotik basıncını belirler. Plazmadaki protein yoğunluğu, beslenme durumu, karaciğer fonksiyonu, renal fonksiyon, multiple miyelom gibi hastalıkların meydana gelişi ve metabolik kusurlar tarafından etkilenir. Yükselmeler dehidratasyon, şok, hemokonsantrasyon ve intravenöz olarak konsantre albuminin aşırı miktarlarının uygulanması durumlarında gözlenir. Azalmalar malnutrisyon, malabsorpsiyon sendromu, akut veya kronik glomerulonefrit, nefroz, akut veya kronik hepatik yetmezlik,neoplastik hastalık ve lösemide belirlenir.(Murray vd. 1993).

2.5.Gıda Katkı Maddeleri

Dünya nüfusunun hızla artması, beslenme alışkanlıklarının değişmesi, yemek hazırlanmasına az zaman ayrılması gibi nedenler, yeni besin kaynakları bulmayı, gıdaların bozulmadan uzun süre saklanabilmelerini zorunlu hale getirmiş, bu da gıda katkı maddelerinin kullanımını kaçınılmaz kılmıştır.

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği (1997) gıda katkı maddesini şöyle tanımlamaktadır: Tek başına gıda olarak tüketilemeyen veya gıda ham veya yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan, seçilen teknoloji gereği kullanılan işlem veya imalat sırasında kalıntı ve türevleri mamul maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında gıda maddesinin koku, tat, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek veya istenmeyen değişikliklere engel olmak ve düzeltmek amacıyla kullanılmasına izin verilen maddelerdir.

Gıda katkı maddeleri değişik şekillerde sınıflandırılırlar:

Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu'na göre gıda katkı maddelerinin sınıflandırılması (CAC, 1992):

- Antioksidanlar
- Asitler
- Asitliği düzenleyiciler
- Emülgatörler
- Emülsifiye edici tuzlar
- Hacim artırıcılar
- İtici gazlar
- Jelleştirme ajanları
- Kabartma ajanları
- Kalınlaştırıcılar
- Koruyucular
- Köpürtme ajanları
- Köpürmeyi önleyici ajanlar
- Lezzet artırıcılar
- Nem vericiler
- Parlatma ajanları
- Renklendiriciler
- Renk stabilizasyon ajanları
- Sıkılaştırıcı ajanlar
- Stabilizörler
- Tatlandırıcılar

Topaklanmayı önleyiciler
Un işleme ajanları

Avrupa Topluluğu'na göre katkı maddelerinin sınıflandırılması (EC, 1995):

Ambalajlama gazları
Antioksidanlar
Asitler
Asit düzenleyiciler
Emülgatörler
Emülsifiye edici tuzlar
Hacim vericiler
İtici gazlar
Jelleştirme ajanları
Kabartma ajanları
Kalınlaştırıcılar
Koruyucular
Köpürtme ajanları
Köpürmeyi önleyiciler
Lezzet artırıcılar
Modifiye nişasta
Nem vericiler
Parlatma ajanları
Renklendiriciler
Sertleştirici ajanlar
Şelat ajanları
Stabilizörler
Taşıyıcılar
Tatlandırıcılar
Topaklaşmayı önleyiciler
Un işleme ajanları

Türk Kodeksi Yönetmeliği'ne göre katkı maddelerinin gruplandırılması (TGKY, 1997)

EK-1 Birden fazla fonksiyonu olan katkı maddeleri
EK-2 Koruyucular (sorbitlar, benzoatlar ve p-hidroksibenzoatlar)
EK-3 Diğer koruyucular
EK-4 Tatlandırıcılar
EK-5 Sadece antioksidan fonksiyonu olan katkı maddeleri
EK-6 Kükürtdioksit ve tuzları
EK-7 Renklendiriciler
EK-8 Taşıyıcılar ve taşıyıcı solventler
EK-9 Bebek mamalarında kullanılan katkı maddeleri
EK-10 Bebek ve çocuk ek besinlerinde kullanılan katkı maddeleri
EK-11 Devam mamalarında kullanılan katkı maddeleri
EK-12 Aroma maddelerinin kullanımı nedeniyle gıdalarda bulunabilen maddelerin kabul edilebilir.
EK-13 Yapay aroma maddeleri
EK-13a Aroma maddelerinin üretiminde kullanılan çözücüler-taşıyıcılar-katkı

maddeleri
EK-13b Doğala özdeş aroma maddeleri

2.5.1. Koruyucu gıda katkı maddeleri

Biyolojik materyallerde, kozmetik, ilaç, boya gibi sanayi sektöründe, istenmeyen kimyasal değişiklikler ya da mikrobiyal etkenler tarafından meydana getirilen bozulmayı önlemek için ürünlere eklenen, doğal ya da sentetik kimyasallara koruyucular denir. Bu koruyucu maddeler, gıda sektöründe de yaygın olarak kullanılmaktadır.

Koruyucu gıda katkı maddeleri, insanlarda hastalıklara neden olan; küf, maya ve bakteri gibi mikroorganizmaların büyümesini engeller ya da yavaşlatırlar. Koruyucular; bakteri ya da mantarların büyümesini inhibe eden antimikrobialler ve gıdayı oluşturan bileşiklerin oksidasyonunu inhibe eden antioksidanlardan oluşurlar.

Koruyucu gıda katkı maddeleri grubunda; benzoik asit, bifenil, sodyum-ortofenil-fenol, borik asit, lizozim, nisin, propiyonik asit, sodyum benzoat, sodyum nitrit, sorbik asit, kalsiyum sorbat, potasyum sorbat, sodyum sorbat, sülfidler, tiabendazole bulunmaktadır (Food Additives, 1997). Bu kimyasal maddeler ile yapılan toksikolojik ve mutajenik çalışmaların bazılarında aşağıda yer verilmiştir:

Benzoik Asit

Benzoik asit, insan lenfositlerinde 30 mmol/litre konsantrasyonda sitotoksik etki göstermiştir (Tohda vd. 1980). *Salmonella typhimurium*'un, TA97, TA98, TA100, TA1535 ve TA1537 suşlarında ise 5000 µg/petri üzerinde sitotoksik etkisi olduğu saptanmıştır (Zeiger vd. 1988). Nair (2001), benzoik asit, benzil alkol ve sodyum benzoat ile yaptığı sıçan ve fare çalışmalarında, benzoik asit'in bazı sıçanlarda kusurlu oluşumlara neden olduğu, sodyum benzoat'a maruz bırakılan fare ve sıçan

çalışmalarında üreme ve gelişme üzerine toksik etki yaratmadığı, aynı biçimde benzoik asit'in iki sıçan çalışmasında da negatif sonuç verdiğini saptamıştır. Sonuç olarak genotoksisite çalışmalarının büyük bir çoğunluğu ile kanserojenite çalışmaları negatif sonuç vermiştir.

Bifenil, Sodyum-ortofenil-fenol

Bifenil bileşiklerinden olan Polybrominated biphenyls, Çin sıçanlarının V79 hücrelerinde in vitro mutajenite denemelerinde negatif etki gösterirken, 3-Fluorobiphenyl ise *Salmonella typhimurium* TA100 suşunda mutajenik etki göstermiştir (Glatt vd. 1992). Bifenil'in 7 farklı türevi, *Salmonella typhimurium*'un TA1537, TA97, TA1538, TA98 suşlarında çerçeve kayması mutasyonlarına neden olmuştur (Ablev vd. 1993). Farelerin mide, karaciger, böbrek, mesane, akciğer, beyin ve kemik ilikleri ile yapılan çalışmanın sonucunda bifenil 2000 mg/kg konsantrasyonda, birçok organda DNA hasarını indüklemiştir (Sasaki vd. 1997). Ayrıca oral yoldan tek uygulamayla 2000 mg/kg konsantrasyonda bifenil verilmiş erkek farelerin gastrointestinal organlarında da DNA'da hasar meydana gelmiştir (Sasaki vd. 2002).

Borik Asit

Antimikrobiyal amaçla kullanılan gıda katkı maddelerinden biri de borik asittir (H₃BO₃). Borik asit, et, havyar ve balık konservelerinin sterilizasyonu gibi amaçlarla kullanılır. Ayrıca, turunçgillerin işlenmesinde de kullanılmaktadır. Buna göre meyveler % 5-8 düzeyinde boraks içeren çözeltiliyle yıkanarak küf mantarlarının zararları önlenmektedir.

Borik asit'in *Salmonella*/mikrosom testinde mutajen olmadığı, CHO hücrelerinde KA ve KKD'ni indüklediği saptanmıştır (National Toxicology Program, 1987).

İn vitro fare lenfotik hücrelerinde, borik asitin çalışılan tüm konsantrasyonlarda, kromozomal anormalliklere neden olmadığı (McGregor vd. 1988), yüksek dozlarının

fertiliteyi olumsuz etkilediği (Hubbard 1998), *E. coli* PQ37’de B-galaktisidaz sentezini S9 varlığında ve yokluğunda artırdığı (Odunola 1997), *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde mitotik indeks’i (MI) düşürdüğü ve birçok mitotik anormallik meydana getirdiği (Dönbak vd. 2002), insan periferel lenfositlerinde KA ve KKD oluşumunu indüklediği (Arslan 2004) bildirilmiştir.

Lisozim

İtalyan, Edam ve Gouda peynirleri gibi sert peynirlerin üretiminde *Clostridium tyrobutricum*’un neden olduğu gaz çıkışını engellemek için, Japonya’da ise istiridye, karides gibi deniz ürünlerinde, ayrıca susi, sake, patates salatası ve kremalarda koruyucu olarak kullanılan Lisozim’in *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında mutajen olduğu gösterilmiştir (Nagao vd. 1977).

Nisin

Gıdalarda antimikrobiyal koruyucu olarak kullanılan kimyasallardan diğer bir grup da antibiyotiklerdir. Aynı zamanda antibiyotik olan Nisin irmik, puding, krema ve peynirlerde koruyucu madde olarak kullanılmaktadır.

Nisin’in Simian virus 40 ile enfekte olmuş insanların kalın bağırsağında ve Vero maymun böbreklerinde toksik olduğu tespit edilmiştir (Murinda vd. 2003).

Propiyonik Asit

E.coli DNA tamir mekanizması, SOS kromotest, *Salmonella*/mikrozom testi, KKD ve *in vivo* mikronükleus testleri yapılmış, DNA tamir mekanizması dışındaki testlerin negatif sonuç verdiği bulunmuştur (Basler vd. 1987). Propiyonik asitin 160 µg/petri konsantrasyonunda *Salmonella typhimurium*’da mutasyon frekansını uyardığı,

Drosophila'da mitotik rekombinasyonlara neden olduğu (Surjan 1989) gösterilmiştir. Propiyonik asit türevleri olan ibuprofen, ketoprofen ve naproxen'in, Ames testinde mutajen olmadığı, fare kemik iliği hücrelerinde KKD'ni zayıf bir şekilde artırdığı ve *Salmonella typhimurium*'un TA98 suşlarında 160 µg/plate konsantrasyonunda mutasyonu artırdığı bulunmuştur (Philipose vd. 1997).

Sodyum Benzoat

Sodyum benzoat'ın yüksek konsantrasyonlarının Çin hamster hücrelerinde KA ve KKD'ni arttırdığı (Abe ve Sasaki 1977), potasyum benzoat'ın Çin hamster hücrelerinde MI'i arttırdığı (Ishidate ve Odashima 1977), *Vicia faba* kök hücrelerinde sodyum benzoat'ın doza bağlı olarak mitotik indeksi azalttığı, anafaz safhasında köprü oluşumunu indüklediği ve interfaz nükleusunda kromatin erozyonuna neden olduğu bildirilmiştir (Njagi ve Gopalan 1982). Ayrıca, fare ve sıçanların üreme ve gelişimi üzerine toksik etkili değildir (Nair 2001).

Sodyum Nitrit

Sodyum nitrit 50 mM ve 100 mM konsantrasyonda *in vitro* hamster embriyonik hücrelerinde hücre morfolojik değişimler meydana getirmiş, ayrıca KA ve endoreduplikasyona da neden olmuş (Tsuda vd. 1976), Çin hamster hücrelerinde KA testinde pozitif sonuç vermiştir (Ishidate ve Odashima 1977). Luca vd. (1987), yaptıkları *in vivo* deneylerde, erkek sıçan, fare ve tavşan kullanmış ve bunlara 1.72, 5.18, 15.55, ve 46.66 mg/kg konsantrasyonlarında sodyum nitrit vermiş ve KA ve MN testlerinde negatif sonuçlar elde etmişlerdir. Aynı araştırmacıların BSC-1 ve HeLa hücreleri ile yaptığı *in vitro* deneylerde ise 0.265 ve 0.530 mg/ml konsantrasyonlarında verilen sodyum nitrit, her iki dozda da kromozom anormalliğine neden olmamıştır.

Mukherjee vd.'nin 1988 yılında yaptığı çalışmaya göre, sodyum nitrit'in fare kemik iliği hücrelerinde çalışılan tüm dozlarda KKD ve MN oluşumunu arttırdığını; Akın ve Sümer'in 1991 yılında yaptığı çalışmaya göre, S9'lu ve S9'suz ortamlarda

Salmonella typhimurium'un TA1535 suşu için mutajen olduğunu, ancak TA100 suşu için zayıf mutajen olduğunu; Sushko ve Malenchenko'nun 1992 yılında yaptığı çalışmaya göre ise, sodyum nitrit, sodyum nitrat ve radyasyona maruz bırakılan fare spermatozoidlerinde, KA'unun meydana geldiği saptamışlardır.

Sorbik Asit

Çin hamster V79 hücrelerinde bu kimyasalın yüksek konsantrasyonlarının KA ve KKD'ni arttırdığı ve çok düşük genotoksik etkiye sahip olduğu (Hasegawa vd 1984), *Salmonella typhimurium*'un TA97, TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA 1538 suşlarında mutajen olduğu (Liewen ve Marth 1985), sorbik asit ve sodyum nitrit ile yapılan bir çalışmada; sorbik asitin yüksek konsantrasyonlarının KKD'ni ve MN oluşumunu arttırdığı, sodyum nitritin ise tüm dozlarının KKD'ni arttırdığı, bunların karışımı verildiğinde KKD'nin, ayrı verildiklerindeki iki kat fazla olduğu (Mukherjee vd. 1988) bulunmuştur.

Klastojenik ve mutajenik etkilerini gözlemek amacıyla yapılan KA ve KKD testleri ve Ames testi sonucunda sorbik asit, klastojenik ve mutajenik değildir (Walker 1990). Fare kemik iliği hücrelerinde, 5000 mg/kg dozdan daha yüksek dozlarında KKD'ni ve MN oluşumunu arttırmadığı; insan A549 hücrelerinde *in vivo* yöntemde düzensiz DNA sentez testinde DNA onarımını arttırmadığı ve sorbik asitin genotoksik olmadığı (Jung vd. 1992); HeLa hücreleri ve plazmid DNA'ları için mutajen olmadığı (Ferrand vd. 2000b) gözlenmiştir.

Kalsiyum Sorbat

HeLa hücreleri ve plazmid DNA'larında yapılan genotoksisite çalışmaları ve Ames testi sonucunda mutajenik etkiye sahip değildir (Ferrand vd. 2000c).

Potasyum Sorbat

Çin hamster V79 hücrelerinde, yüksek dozlarda, KA ve KKD'ni arttırmıştır (Abe ve Sasaki, 1977; Hasegawa vd. 1984). Potasyum sorbat ve sodyum sorbat'ın genotoksik etkilerini incelemek için Ames testi ile Chinese hamster ovaryum hücrelerinde HGPRT ve KKD testi, ayrıca sıçan ve Çin hamster kemik iliği hücrelerinde MN testleri kullanılmıştır ve bu kimyasalların *in vitro* testlerde genotoksik etkisini olmadığı, *in vivo* testlerde ise bu maddelerin taze hazırlanmış solusyonlarında hiçbir klastojenik etki göstermediği halde, bekletilmiş eriyiklerinde klastojenik bir etkiye sahip oldukları saptanmıştır (Munzer vd. 1990).

Potasyum sorbat ve sodyum sorbat'ın 2.5 mg/ml konsantrasyonunun Çin hamster V79 hücrelerinde *in vitro* şartlarda MI düşürdüğü fakat genotoksik olmadıkları (Schlatter vd. 1992), potasyum sorbat'ın HeLa hücrelerinde ve plazmid DNA'larında da mutajenik ve genotoksik olmadığı (Ferrand vd. 2000a) bildirilmiştir. Potasyum sorbat, askorbik asit ve Fe tuzu, üçü birlikte kullanıldığında *Salmonella typhimurium*'un TA98 (S9 mix varlığında veya S9 mix yokluğunda) ve TA100 (S9 mix varlığında) suşlarında mutajenik etkili olmadığı, buna karşın TA100 (S9 mix yokluğunda) suşunda doza bağlı bir mutajenik etki gösterdiği saptanmış, ancak bu üç madde ayrı ayrı kullanıldığında herhangi bir mutajenik etki görülmemiştir (Kitano vd. 2002).

Sodyum Sorbat

Çin hamster V79 hücrelerinde KA ve KKD testlerinde pozitif (Hasegawa vd. 1984); taze hazırlanmış solusyonun negatif sonuç gösterdiği bildirilmiştir (Schiffmann ve Schlatter 1992).

Sülfidler

Meng ve Zhang (1992), sodyum metabisülfid'in insan lenfosit hücrelerinde KA, KKD ve MN oluşumunu arttırdığını; Rencüzogulları vd. (2001a), sodyum metabisülfid'in *Allium cepa* L.'da mitotik anormallikleri arttırdığını ve mitotik indeksi

düşürdüğünü, insan lenfosit hücrelerinde yaptıkları başka bir çalışmalarında (Rencüzoğulları vd. 2001b) ise KA ve KKD'ni arttırdığını, replikasyon indeksini (RI) ve mitotik indeksi (MI) düşürdüğünü bulmuşlardır. Nair ve Elmor (2003), sodyum ve potasyum metabisülfid'in 160 mg/kg'dan daha yüksek dozlarının fare, sıçan, hamster ve tavşanlarda teratojenik ve mutajenik olmadığını, sıçanlarda yaptıkları çalışmalarda sodyum sülfid'in yüksek dozlarda (3.3 g/kg'dan daha yüksek) toksik olduğunu ancak teratojenik olmadığını saptamışlardır. Kayraldız vd. (2006), potasyum metabisülfidin *S.typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında mutajen olmadığını bildirmişlerdir. Njagi ve Gopalan (1982), sodyum sülfid'in doza bağılı olarak *Vicia faba* kök ucu hücrelerinde mitotik indeksi azalttığını, anafazda köprü oluşumunu uyardığını ve interfaz nukleusunda kromatin erozyonuna neden olduğunu saptamışlardır. Pagano ve Zeiger'e göre (1987) sodyum bisülfid *S.typhimurium* TA97 ve TA1535 suşlarında zayıf mutajendir. Ayrıca Kayraldız (2005), sıçanlara hem intraperitoneal hem de gavage olarak verilen sodyum metabisülfid'in sıçan kemik iliğinde genotoksik ve sitotoksik etkiye sahip olduğunu, intraperitoneal olarak verildiğinde sodyum metabisülfid'in genotoksik ve sitotoksik etkinin daha fazla olduğunu saptamıştır.

Tiabendazol

Farelerde, Tiabendazol, 200 mg/kg'lık en yüksek konsantrasyonunda KKD'ni, 50, 100 ve 200 mg/kg'lık konsantrasyonların hepsinde de MN oluşumunu arttırdığı (Mudry ve Pargament 1987); insan lenfosit hücrelerinde DNA replikasyonunu önemli derecede azalttığı ve 48 saatlik muamelede KKD'ni çok az arttırdığı (Ardito vd. 1996); fare oositlerinde sitogenetik anormallikleri uyardığı (Mailhes vd. 1997); fare spermelerinde tiabendazol'un (300 mg/kg) diploidiyi arttırdığı (Schmid vd. 1999); sperm başı anormalliklerini istatistiksel olarak arttırdığı ancak mutajen olmadığı (Otubanjo ve Mosuro 2001) gösterilmiştir. İnsan lenfoblastoid hücrelerinde DNA hasarına neden olduğu, ayrıca sitokrom P450 1A1 gen ekspresyonunu başlattığı ve sonuçta tiabendazol'un genotoksik olduğu bildirilmiştir (Delescluse vd. 2001).

2.6. Delvosid

Delvosid, peynir ve salam-sosislerin korunmasında 20 yılı aşkın süredir kullanılmaktadır. Jay'a (1996) göre, bu ürünlerde maya ve mantarların çoğalmasını kontrol eder (WHO, 2006).

Delvosid'in etken maddesi Natamisin'dir. Natamisin'den başka kullanılan diğer ticari isimleri; pimarisin, pimafucin, tennecettin ve miprozindir. Natamisin, *Streptomyces natalensis* ve yakın türlerinin aerobik fermentasyonu ile meydana getirilen polien makrolid grubu bir antibiyotiktir. Natamisin maya ve mantarlara karşı oldukça etkilidir. Sığır ve atlarda ringworm gibi mikotik enfeksiyonları tedavi etmek için de kullanılır. Daha önceden insanda deri ve mukoz membranların fungal enfeksiyonlarına karşı kullanılırdı. Bugünkü tıbbi kullanımı sınırlıdır, genelde korneal fungal enfeksiyonların topikal tedavisinde ve kontak lens kullanan kişilerde meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır (WHO 2006).

Fare lenfositleriyle yapılan çalışmada; pimarisin, kandisidin, etroskomisin ve filipinin, anyon ya da katyon akışkanlarını indükleyerek, hücre membranlarında sulu porlar oluşturdukları, normal dalak hücrelerine verildiğinde ise, pimarisinin, DNA sentezi üzerinde zayıf uyarıcı etki yaptığı gösterilmiştir (Hammarström ve Smith, 1977).

Natamisin'in hem yalnız hem de 4 farklı antibiyotikle meydana getirebileceği, minimal inhibitör ve fungisidal etkilerini belirlemek için yapılan çalışmada, Natamisin-rifampin ya da natamisin-gentamisin kombinasyonu, test edilen *Fusarium soloni*'ye karşı sinerjistik etki göstermiştir (Stern, 1978).

Antitümör antibiyotiği olarak bilinen, bleomisin A2'nin etkisi, pimarisin, filipin ve pentamisin antibiyotikleri ile, Çin Hamster V79 hücrelerinde çalışılmış, bu üç antibiyotiğin, bleomisin A2'nin etkisini arttırdığı gösterilmiştir (Akiyama vd. 1979).

Vajinal iltihabı olan hastalarda yapılan çalışmada; natamisin'in (pimafusin) tek başına olan etkisi, natamisin ve elase'ın birlikte meydana getirdiği etki ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, natamisin'e elase'ın ilavesi, belirlenen organizmanın yok edilmesini sağlamış ve belirtilerin hafiflemesi bakımından tedavinin etkinliğini arttırmıştır (Elliott, 1979).

Başka bir çalışmada, pimarisin ve filipinin neden olduğu sitotoksisite ve membran permeabilite değişimleri, parental intraspesifik ve interspesifik somatik hücre hibritlerinde karşılaştırılmış ve hücre hibridizasyonunda yarı-seçici ajanlar olarak etkili oldukları bulunmuştur (Fisher vd. 1979).

Saccharomyces cerevisiae ve Çin hamster V79 hücrelerinde koloni oluşumu üzerine 5 antibiyotiğin etkilerinin karşılaştırıldığı çalışmada, pimarisin; fusidik asit ve bleomycin A2'nin , hamster ve maya hücrelerine karşı sitosidal etkisini arttırmıştır (Akiyama vd. 1980).

Üç tip İtalyan salamında küf büyümesinin engellenmesi amacıyla yapılan çalışmada, pimarisin uygulaması, %2,5 konsantrasyondaki potasyum sorbattan daha iyi sonuç vermiştir (Holley, 1981).

Natamisin, amfoterisin B, nistatin ve klotrimazole'un, 9 maya ve 6 küf türüne karşı in vitro olarak sinerjistik kombinasyonları çalışılmış, bu kombinasyonların donör olan insan korneal morfolojisini değiştirmedeği görülmüştür (Kowalski vd. 1985).

Natamisin ve potasyum sorbatın, zeytinlerdeki aflatoksin üretimi ve büyümesi üzerine olan etkilerinin araştırıldığı çalışmada kullanılan tüm konsantrasyonlarla negatif sonuç elde edilmiştir (Mahjoub ve Bullerman, 1986).

Pimarisin ile ya da pimarisin olmadan, farklı pH değerlerindeki besiyerinde yapılan incelemede, pimarisinin *Aspergillus parasiticus* tarafından üretilen aflatoksin ve büyümeyi tam olarak inhibe etmediği, ancak, düşük pH, düşük sıcaklık ya da % 4-% 6 NaCl ile kombine edildiğinde, küf inhibitör etkisinin üstesinden geldiği ve fazla miktarda toksin meydana getirdiği gösterilmiştir (Rusul ve Marth, 1988).

Florida'da ülserleşmiş kornea iltihabı olan atlardan izole edilen mantarların antimikrobiyal hassasiyetlerinin incelendiği çalışmada, fungal izolatlarla en duyarlı antibiyotiğin natamisin ve mikonazole, daha sonra da itraconazole ve ketaconazole olduğu gösterilmiştir (Brooks vd. 1998).

Natamisinin antifungal aktivitesi, kümes hayvanlarının yeminden izole edilen küflerde değerlendirilmiş, *Aspergillus fumigatus* ve *Aspergillus parasiticus*'un büyümesini inhibe ettiği görülmüştür (Brothers ve Wyatt, 2000).

Gebelik sırasında vajinal yoldan uygulanan natamisinin teratojenik etkilerinin gözlenmesi için yapılan bu incelemede, gebelik boyunca vajinal enfeksiyonun

natamisinle tedavi edilmesi, fetus için teratojenik etki göstermemiştir (Czeizel vd. 2003).

Olgunlaşma periyodunda, paketlenmede kullanılan materyallerin ve natamisinin, kaşar peynirinin mikrobiyolojik özellikleri üzerine etkisinin olup olmadığı araştırılmış ve kaşar peyniri üzerindeki, lipofilik mikroorganizma sayısına, mayalara ve toplam aerobik bakterilere hiç etkisi olmadığı, proteolitik mikroorganizmalar üzerine inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır (Var vd. 2006).

2.6.1. Natamisin'in özellikleri ve yapısı

Natamisin, polien makrolid grubu bir antibiyotiktir. Franklin ve Snow'a (1998) göre, polienler, fungal membranlar ile etkileşime giren, değişik moleküler yapıları olan, geniş bir antibiyotik grubudur (WHO, 2006). Yaklaşık 200 polienin hepsi *Streptomyces* spp. tarafından üretilir. Hamilton-Miller'in 1974; Norman vd.'nin 1976; McGinnis ve Rinaldi'nin 1985; Carlile ve Watkinson'ın 1994 yıllarındaki bildirimlerine göre; Natamisin'in ve diğer polienlerin antifungal etkileri, onların hücre membran sterollerine bağlanmalarına bağlıdır, öncelikle ergostreol, fungal membranlardaki ana steroldür, onları geçirgen kılar (WHO, 2006). Amfoterisin B, nistatin ve natamisin gibi polien makrolid antibiyotikleri, ergosterol için memeli membran sterolu olan kolesterolden daha büyük bir affiniteye sahiptirler. Polienler steroller ile kompleksler oluşturur ve bu mekanizmayla membran fonksiyonunu açıkça bozarlar.

Tipik bir polienin yapısında hem hidrofobik hem de hidrofilik yüz bulunur. Polienlerin, sterollerle (hidrofobik yüz) ilişki kurarak onları hücre membranının içine aldığı ve sterollerin yeniden düzenlenmelerine neden olduğu düşünülür. Öyle ki; 4-8 polien molekül grubu, merkezde hidrofilik yüzle bir halka oluşturur. Griffin (1994) ve Deacon'a (1997) göre, oluşan polar porun içinden K^+ ve H^+ gibi küçük iyonlar serbestçe geçer ve hücrenin iyon kontrolü bozulur (WHO, 2006).

100'den fazla polien antibiyotiğinin arasından izole edilenlerin bazıları; Amfoterisin B ve Nistatin'dir. Bazı polienler tarımda fungusit olarak kullanılırken,

bunlar sistemik fungal enfeksiyonların klinik tedavisinde kullanılırlar (Bolard vd. 1991, Strippoli vd. 1997). Polienler, lakton halkasında bulunan çift bağ sayısına göre, tetraenler, pentaenler, hekşaenler, heptaenler olarak isimlendirilirler.

3. MATERYAL METOD

Çalışmamızda T.Ü. Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Birimi'nden temin edilen 300 adet erkek ve 210 adet dişi fare (*Mus musculus*), test maddesi olarak ise Delvosid kullanılmıştır. Bu maddenin toksisitesini belirlemek için KA, MN ve sperm aberasyon yöntemleri uygulanmıştır. Bunlara ilave olarak; serumdaki alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), alkalen fosfataz (ALP), laktat dehidrogenaz (LDH), total protein ve total testosteron düzeyine bakılmıştır. Pozitif kontrol olarak mitomisin C (MMC), negatif kontrol olarak ise distile su kullanılmıştır.

KA ve sperm aberasyon yöntemi için; Delvosid'in farklı konsantrasyonları (200, 400, 800 mg/kg) ve pozitif kontrol (MMC) ile 6, 12 ve 24 saat muamelesi, MN yöntemi için ise 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonucunda elde edilen veriler, negatif kontrolle muamele sonucu elde edilen veriler ile istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddelerin Hazırlanışı

3.1.1. Konsantrasyonların seçimi

Çalışmamızda kullanılan Delvosid'in konsantrasyonları, bu kimyasalla daha önce yapılan, sonuçlanmış çalışmalardaki konsantrasyon aralıkları temeline dayandırılmıştır. Önceki çalışmada belirlenen LD₅₀ değerinin yaklaşık yarısı (800 mg/kg), dörtte biri (400 mg/kg) ve sekizde biri (200 mg/kg) kullanılmıştır.

3.1.2. Delvosid konsantrasyonları ve kimyasal özellikleri

Çalışmamızda fareler üzerindeki toksik etkilerini incelemek için kullanılan Delvosid'in 200, 400 ve 800 mg/kg'lık konsantrasyonları distile suda hazırlanmıştır. Delvosid'in etken maddesi Natamisin'dir ve kimyasal özellikleri aşağıda verilmiştir:

Kimyasal İsmi: 6,11,28-Trioxatricyclo[22.3.1.05,7]octacos-8,14,16,18,20-pentaene-25-carboxylic acid, 22-[(3-amino-3,6-dideoxy-.beta.-D-mannopyranosyl)oxy]-1,3,26-trihydroxy-12-methyl-10-oxo-,

(1R,3S,5R,7R,8E,12R,14E,16E,18E,20E,22R,24S,25R,26S)-

Sinonimleri: Pimarisin, pimafusin, tennecettin, miprozin

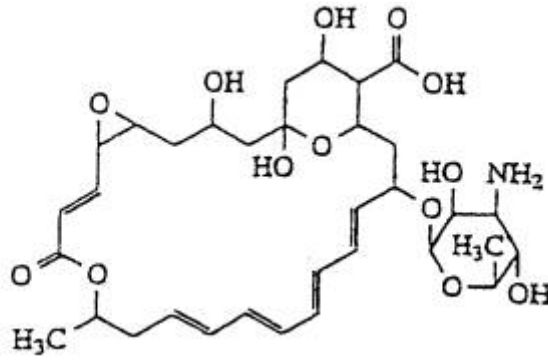
CAS No: 7681-93-8

Moleküler Formülü: C₃₃H₄₇NO₁₃

Molekül Ağırlığı: 665.73

Fiziksel Formu: Katı

Renk: Beyaz



Şekil 3.1.2.1. Natamisin'in moleküler yapısı

3.1.3. Pozitif kontrol konsantrasyonu

Çalışmamızda kullandığımız yöntemlerin standartlar ölçüsünde uygulandığını göstermek amacıyla, daha önceden anormallik yaptığı kanıtlanmış, bir kimyasal madde olan MMC seçilmiştir (Sigma CAS No: 50-07-7). MMC uygulanan gruplarda anormallik sayısının istatistiksel açıdan anlamlı olması yöntemlerin doğru uygulandığını göstermektedir. Yapılan literatür taraması sonucunda 2 mg/kg MMC'nin anormalliklere neden olduğu tespit edilmiş ve bu konsantrasyonun anlamlı anormalliklere neden olduğu ön çalışmamızda yapılan deneylerle de doğrulanmıştır. 2 mg'lık olan MMC flakonlarına 10 ml distile su ilave edilmiş, içinden gram başına 0.01 ml gelecek şekilde alınarak, canlı hayvana intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir.

3.1.4. Sörensen fosfat tamponunda giemsa boyasının hazırlanışı

Tampon A ve tampon B olmak üzere iki ayrı çözelti hazırlanmıştır:

Tampon A : 11,34 gr KH_2PO_4 +250 ml su (pH 4.8)

Tampon B : 14,84 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ + 250 ml su (pH 9.3)

10 ml Giemsa (Merck) boyası, 5 ml tampon A, 5 ml tampon B, 80 ml distile su karıştırılarak hazırlanmıştır (pH 6.8). Boya süzülerek kullanılmıştır.

3.1.5. Kolşisin hazırlanışı

Hücreleri metafaz safhasında durdurmak için % 0,2'lik kolşisin hazırlanmıştır. Servikal dislokasyondan 3 saat önce, canlı hayvana gram başına 0.01 ml gelecek şekilde intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir.

3.1.6. Hipotonik solüsyon hazırlanışı

Hipotonik solüsyon taze olarak kullanıldığından işlem sırasında 0.279 gr KCl tartılarak 50 ml distile suda eritilerek 0.075 M KCl hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyon 37°C'lik etüvde bekletilmiştir.

3.2. Kromozom Aberasyon Yöntemi

Deney için her biri 5'er hayvan (10-12 haftalık) içeren 5 grup hazırlanmıştır. (3 deney, 1 negatif kontrol, 1 pozitif kontrol). Deney gruplarına Delvosid'in 200, 400 ve 800 mg/kg'lık konsantrasyonları 6, 12 ve 24 saat süreyle muamele olacak şekilde intraperitoneal olarak ve gram başına 0.01 ml gelecek şekilde enjekte edilmiştir. Negatif kontrol grubuna distile su, pozitif kontrol grubuna ise MMC de gram başına 0.01 ml gelecek şekilde verilmiştir.

Hücreleri metafaz safhasında durdurmak için hazırlanan kolşisin, bölünmenin en hızlı olduğu saat 9.00-9.30 arasında canlı hayvana gram başına 0.01 ml gelecek şekilde intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Genç örnekler 3 saat sonra servikal dislokasyonla öldürülmüş, örneklerin arka ayak tibia ve femur kemik ilikleri % 1'lik sodyum sitrat çözeltisi ile çıkarılmıştır. Tüpe alınan kemik iliği hücrelerinin pipetaj işlemiyle birbirinden ayrılması sağlanmıştır. İçinde kemik iliği bulunan tüpler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş, altta biriken kemik iliği hücrelerine zarar vermeden üstte biriken süpernatant atılmıştır. Hipotonik olarak her deneyde taze hazırlanan 0,075 M KCl kullanılmıştır. Üzerine hipotonik ilave edilen tüpler 37°C'lik etüvde 25 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda tüpler 1000 rpm'de 8 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant tekrar atılmıştır. Hücrelerin fikse edilmesi için Carnoy fiksatif (3 metil alkol: 1 glacial asetik asit) kullanılmıştır. Her tüpe 5 ml fiksatif ilave edilmiş, pipetaj yapılmış, 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmıştır. Bu işlem hücreler beyazlaşınca kadar 3-4 kez tekrarlanmıştır. Son santrifüjden sonra

süpernatant atılmış, hücrelerin üzerine 5 ml fiksatif ilave edilmiş ve pipetaj yapılmıştır. Hücrelerin yayılması için damlatma yöntemi kullanılmıştır. Damlalıklı pipetle alınan süspansiyon, temiz ve buzdolabında bekletilmiş lamalar üzerine ~ 50 cm yüksekten damlatılarak hücrelerin yayılması sağlanmıştır. Preparatların hazırlanması Preston vd.'ine (1987) göre yapılmıştır.

3.2.1. Boyama işlemi

Bir gece kurutulan preparatlar Sörensen tamponunda hazırlanan % 10'luk giemsa ile 10 dakika boyanmıştır. Preparatlar boyadan çıkarıldıktan sonra distile suda çalkalanmıştır. Boyanan preparatlar en az 1 gece kurutulduktan sonra, entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir.

3.3. Mikronukleus Yöntemi

MN yöntemi kimyasalların mutajenesitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir.

Bu yöntemle, kimyasalların genotoksitesini, genellikle farelerin olgunlaşmamış kemik iliği eritrositleri kullanılarak değerlendirilir (Sato ve Tomita, 2001).

MN yöntemiyle klastojenlerin çalışılması sonucu aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

- Herhangi bir fare ya da sıçan suşu kabul edilebilir
- Erkek ya da dişi, bir cinsiyet kullanılabilir
- İp enjeksiyon ya da oral uygulama kabul edilebilir
- En az bir dozun tek bir uygulamasından 24-48 saat sonra incelenmesi, kimyasalların mutajenesitesinin değerlendirilmesi için yeterli bulunabilir.

Deney için her biri 5'er hayvan (8-10 haftalık) içeren 5 grup hazırlanmıştır. (3 deney, 1 negatif kontrol, 1 pozitif kontrol). Deney gruplarına Delvosid'in 200, 400 ve 800 mg/kg'lık konsantrasyonları 24, 48 ve 72 saat süreyle muamele olacak şekilde intraperitoneal olarak ve gram başına 0.01 ml gelecek şekilde enjekte edilmiştir. Negatif kontrol grubuna distile su, pozitif kontrol grubuna ise MMC de gram başına 0.01 ml gelecek şekilde verilmiştir.

Genç örnekler muamele süresinin sonunda, servikal dislokasyonla öldürülmüş, örneklerin arka ayak tibia ve femur kemik ilikleri 1 ml fetal calf serum (Sigma N-4762) ile çıkarılmıştır. Tüpe alınan kemik iliği hücrelerinin pipetaj işlemiyle birbirinden ayrılması sağlanmıştır. İçinde kemik iliği bulunan tüpler 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş, altta biriken kemik iliği hücrelerine zarar vermeden üstte biriken süpernatant atılmıştır. Altta kalan hücrelere pipetaj yapıldıktan sonra sonra, temiz lamın üzerine bir damla solüsyon damlatılmış, bir başka lamla aralarında 45°'lik açı olacak şekilde bu damlanın yayılması sağlanmıştır. Preparatlar en az 1 gece kuruduktan sonra, saf metanolde fikse edilmiştir. Preparatlar küçük değişiklikler yapılarak Schmid (1975) ve Aaron vd.'nin (1989) tanımladığı gibi hazırlanmıştır.

3.3.1. Boyama işlemi

Bir gece kurutulan preparatlar, önce May Grünwald ile 3 dakika, May Grünwald:distile su (1:1) ile 2 dakika, son olarak da Sörensen fosfat tamponunda (pH 6.8) hazırlanmış % 10'luk giemsa ile 10 dakika boyanmıştır. Preparatlar boyadan çıkarıldıktan sonra distile suda çalkalanmıştır. Boyanan preparatlar en az 1 gece kurutulduktan sonra, entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir.

3.4. Sperm Aberasyon Yöntemi

Sperm aberasyon yöntemi, germ hücre mutajenlerini belirlemek için kullanılan hassas ve güvenilir bir yöntemdir.

Deney için her biri 3'er hayvan (10-12 haftalık) içeren 5 grup hazırlanmıştır. (3 deney, 1 negatif kontrol, 1 pozitif kontrol). Deney gruplarına Delvosid'in 200, 400 ve 800 mg/kg'lık konsantrasyonları 6, 12 ve 24 saat süreyle muamele olacak şekilde intraperitoneal olarak ve gram başına 0.01 ml gelecek şekilde enjekte edilmiştir. Negatif kontrol grubuna distile su, pozitif kontrol grubuna ise MMC de gram başına 0.01 ml gelecek şekilde verilmiştir.

Muamele süresinin sonunda, servikal dislokasyonla öldürülmüş hayvanların cauda epididimisleri çıkarılmış, fizyolojik solusyonda dağılması sağlanmıştır. Temiz lamaların üzerine bir damla solusyon damlatılarak yayma preparatlar hazırlanmıştır. Preparatlar kurduktan sonra saf metanolde 10 dakika fikse edilmiştir. Preparatlar Wyrobek ve Bruce'a göre (1975) hazırlanmıştır.

3.4.1. Boyama işlemi

Bir gece kurutulan preparatlar Sörensens tamponunda hazırlanan % 10'luk giemsa ile 10 dakika boyanmıştır. Preparatlar boyadan çıkarıldıktan sonra distile suda çalkalanmıştır. Boyanan preparatlar en az 1 gece kurutulduktan sonra, entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir.

3.5. Daimi Preparatların İncelenmesi

KA yöntemi ve MN yöntemi ile elde edilen preparatlar, x1000 (10x100) büyütmede; sperm aberasyon yöntemi ile elde edilen preparatlar ise, x100 büyütmede incelenmiştir.

3.5.1. KA yöntemine göre hazırlanan preparatların incelenmesi

KA yöntemi ile hazırlanan preparatlarda, her bir konsantrasyon ve muamele süresi için, iyi dağılmış 40 kromozom bulunan, 100 metafaz hücresi sayılmıştır. Sayılan her 100 hücrede kromatid gap, izokromatid gap, kromatid kırık, izokromatid kırık, fragment gibi kromozom anormallikleri incelenmiştir.

3.5.1.1. Mitotik indeks (MI)

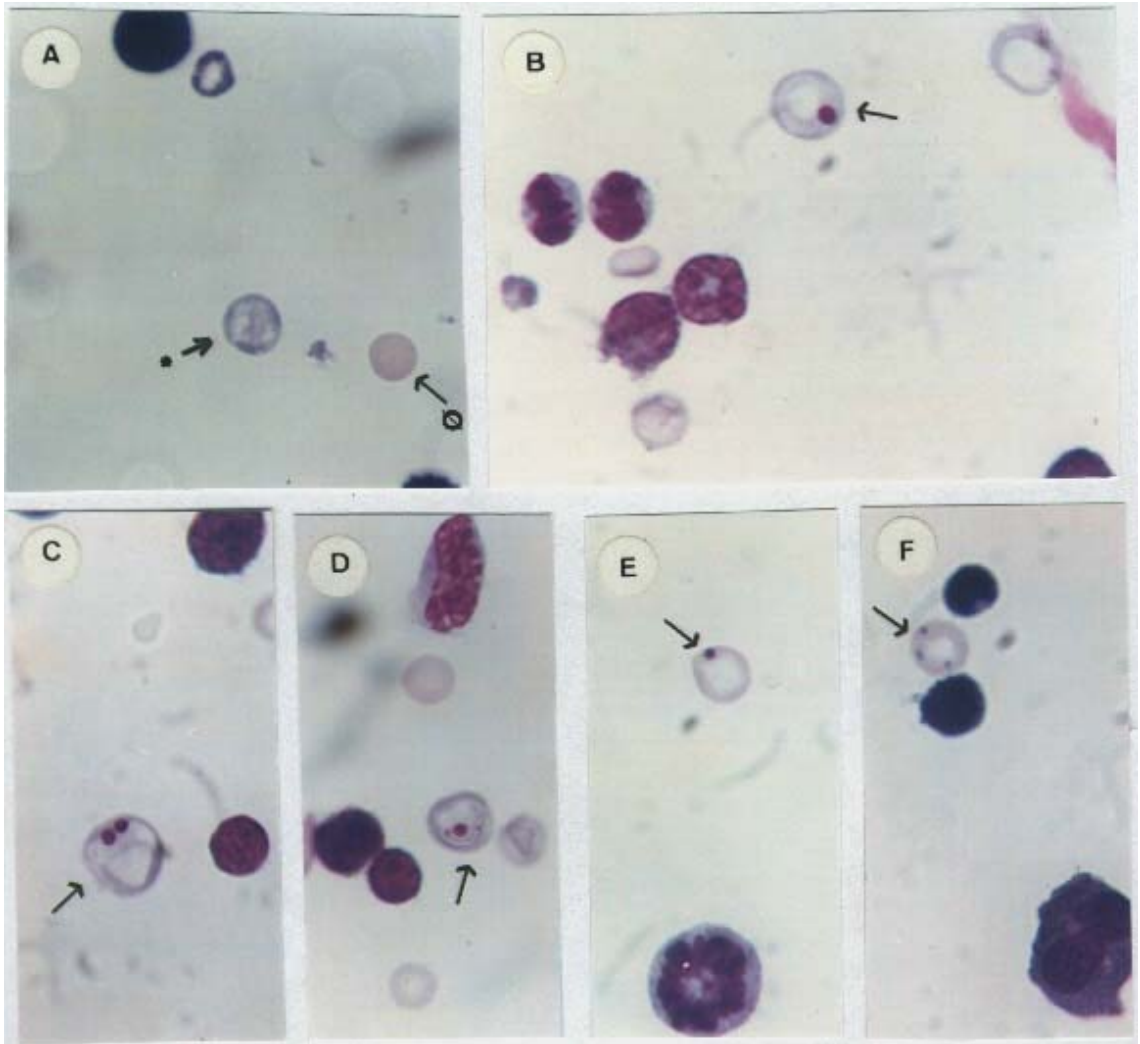
KA yönteminde bölünme oranını tespit etmek için, her bir konsantrasyon ve muamele süresi için her fareden 3000 hücre sayılmıştır. Mitotik indeksi bulmak için, bölünen hücreler toplam hücre sayısına bölünüp 100 ile çarpılmıştır. Mitotik indeks inhibisyonu, $100 - (\text{Muamele MI} \times 100 / \text{kontrol MI})$ (Rojas vd. 1993) formülüne göre hesaplanmıştır.

3.5.2. MN yöntemine göre hazırlanan preparatların incelenmesi

MN yöntemi ile hazırlanan preparatlarda, her bir hayvan için 1000 eritrosit (PCE+NCE) sayılmış, MN'lu PCE'ler ve MN'lu NCE'ler belirlenmiştir. Ayrıca PCE/NCE oranını da hesaplanmıştır.

3.5.2.1. PCE ve NCE'lerin farklı boyanması

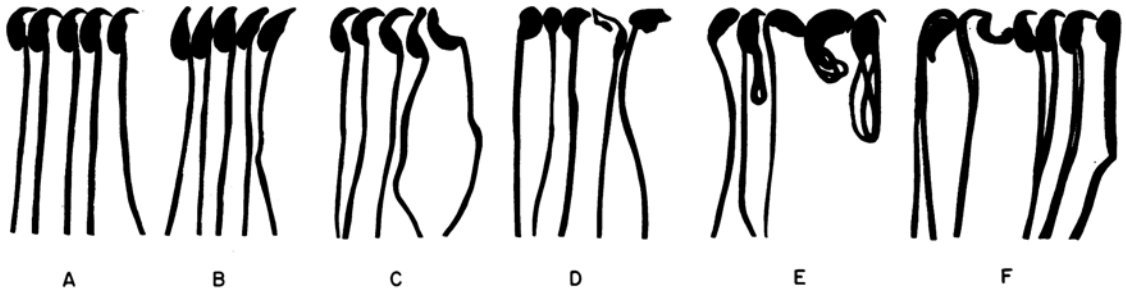
May Grünwald-Giemsa ile boyanan PCE ve NCE'ler şekil 3.5.2.1.1.'de gösterilmiştir. PCE'ler, maviye; NCE'ler ise kırmızıya boyanmıştır.



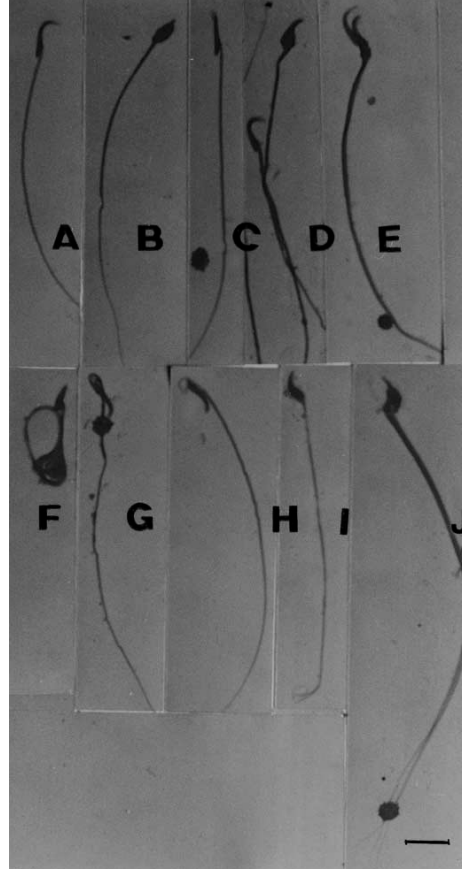
Şekil 3.5.2.1.1. A) (●)Normal PCE ve (○) normal NCE; B) Bir MN'lu PCE; C) 2 MN'lu PCE; D) 3 MN'lu PCE; E) 1 MN'lu NCE; F) 3MN'lu NCE.

3.5.3. Sperm aberasyon yöntemine göre hazırlanan preparatların incelenmesi

Sperm aberasyon yöntemi ile hazırlanan preparatlarda, her bir hayvan için 1000 sperm sayılmıştır. Wyrobek ve Bruce (1975) kriterlerine göre anormal sperm saptanmıştır. Sayılan her 1000 spermde, muz şeklinde, amorf baş, çengelsiz baş ve kıvrık boyun gibi anormallikler belirlenmiştir. Anormal spermere ait örnekler şekil 3.5.3.1.'de ve şekil 3.5.3.2.'de verilmiştir.



Şekil 3.5.3.1. A) Normal sperm; B) Çengelsiz sperm; C) Muz şekilli sperm; D) Amorf sperm; E) Kendi üstüne kıvrılmış sperm; F) Çift kuyruklu sperm (Wyrobek ve Bruce, 1975).



Şekil 3.5.3.2. A) Normal sperm; B) Amorf sperm; C) Çengelsiz sperm; D) Muz şekilli sperm; E) Çift başlı sperm; F) Kıvrılmış sperm; G) Sefalokaudal kısımdan kıvrılmış sperm; H) kıvrık boyun; I) Kuyruk defekti olan mikrosefali; J) Kuyruk duplikasyonu olan kusurlu baş (Narayana vd. 2002).

3.6. Testosteron Hormonunun Ölçülmesi

Farelerin kalbinden alınan kanların serumları ayrılarak, - 20°C'lik derin donduruculara yerleştirilmiş, daha sonra tüm serumlar Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez laboratuvarı hormon biriminde Immulite 2000 yöntemiyle (BIODPC marka cihaz ve kitlerle) çalışılmıştır. Ölçülen total testosteron ng/mL olarak değerlendirilmiştir.

3.7. Karaciğer Enzimlerinin Ölçülmesi

Farelerin kalbinden alınan kanların serumları ayrılarak, - 20°C'lik derin donduruculara yerleştirilmiş, daha sonra tüm serumlar spektrofotometrede toplu olarak çalışılmıştır. ALT, AST, ALP, LDH ve total protein parametrelerinin tayini Diasis marka ticari kitler kullanılarak Biosystems (BTS-310) marka spektrofotometrede yapılmış, ölçülen enzim aktiviteleri U/L olarak değerlendirilmiştir.

3.8. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel değerlendirme, AXA507C775506FAN3 seri numaralı STATISTICA AXA 7.1 istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Ölçülebilen verilerin normal dağılıma uygunlukları tek örnek Kolmogorov Smirnov testi, gruplararası kıyaslamalar için normal dağılıma uyanlara tek yönlü varyans analizi, analiz sonrasında anlamlı fark bulunanlara kontrol grubu olduğu için Dunnett t testi uygulanmıştır. Sayımla belirtilen değişkenler için gruplararası kıyaslamalarda Kruskal Wallis varyans analizi ve anlamlı fark çıkanlara Mann Whitney U testi yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler olarak aritmetik ortalama \pm SS değerleri verilmiş, niteliksel veriler sayı ve yüzdelerle belirtilerek χ^2 analizi yapılmıştır. Tüm istatistikler için anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak ve Mann Whitney U testi için Bonferroni düzeltmesi yapılarak $(p/n) \alpha = 0.05/10 = 0.005$ seçilmiştir.

KA, MN ve sperm aberasyon yöntemlerinden elde edilen anormallikler, bölünme indeksleri ve konsantrasyonlar arasındaki ilişkinin anlamlılıkları Pearson korelasyon testi ile tespit edilmiştir.

4. SONUÇLAR

4.1. Kromozom Aberasyon (KA) Yöntemi

Fare kemik iliği ile in vivo olarak yapılan çalışmamızda Delvosid'in 200, 400 ve 800 mg/kg'lık konsantrasyonlarının, 6,12 ve 24 saat muamelesi sonucu dişi ve erkek farelerde gözlenen KA'ları ve MI değerleri Tablo 4.1.1. ve 4.1.2.'de verilmiştir. KA'larını incelerken her bir konsantrasyon ve muamele süresi için 100 metafaz hücresi sayılmıştır. Tabloda, kromatid gap, izokromatid gap, kromatid kırık, izokromatid kırık, kontraksiyon ve sentromerik attenuation gibi kromozom aberasyonları gösterilmiştir.

Bazı araştırmacılara göre kromozom aberasyonu olarak kabul edilmeyen gaplara, anormallik sonucu ortaya çıktığı için tablolarda yer verilmiş ancak istatistiksel olarak değerlendirilmemiştir.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde (Tablo 4.1.1. ve 4.1.2) 6, 12 ve 24 saat muameleli gruplarda, Delvosid'in farklı konsantrasyonlarının uygulanması sonucu toplam anormallikte anlamlı artış görülmemiştir. Kromozom kırıklarına neden olmadığı için Delvosid'in klastojenik olmadığı belirlenmiştir.

MI'in azalması toksisitenin değerlendirilmesinde kullanılır. Farelerden elde edilen MI değerleri incelendiğinde 6, 12 ve 24 saat muameleli gruplarda ve tüm konsantrasyonlarda Delvosid MI'i anlamlı olarak düşürmüştür (Şekil 4.1.1. ve 4.1.2). Total MI değerlerinin inhibisyon oranları hesaplandığında; 200, 400 ve 800 mg/kg Delvosid konsantrasyonlarının dişi farelerde 6 saat muameleli grupta MI'i sırasıyla % 29, % 35 ve % 38 oranında; 12 saat muameleli grupta % 27, % 35 ve %40 oranında; 24 saat muameleli grupta ise % 24, % 40 ve % 51 oranında inhibe ettiği, erkek farelerde 200, 400 ve 800 mg/kg Delvosid konsantrasyonlarının 6 saat muameleli grupta MI'i sırasıyla % 31, % 37 ve % 43 oranında; 12 saat muameleli grupta % 29, % 44 ve 53 oranında; 24 saat muameleli grupta ise % 31, % 32 ve % 57 oranında inhibe ettiği görülmüştür. Bu sonuçlara göre; dişi ve erkek farelerin Delvosid'in farklı konsantrasyonları ile 24 saat muamelesi sonucu gözlenen toksisitenin 6 ve 12 saat

muamele sonucu gözlenen toksisiteden fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1.3. ve 4.1.4.).

MI değerleri konsantrasyon artışına bağlı olarak azalmıştır. 6, 12 ve 24 saatlik muamele süreleri sonucunda elde edilen MI değerleri ile uygulanan konsantrasyonlar arasındaki ilişkinin anlamlılığı Pearson korelasyon testi ile belirlenmiştir. Dişi farelerde 24 saat için Pearson korelasyon testi $p= 0,05$ olarak tespit edilmiş; 6 ve 12 saat için ise anlamsız olduğu saptanmıştır. Erkek farelerde ise 12 ve 24 saat için, Pearson korelasyon testi $p= 0,05$ olarak belirlenmiş; 6 saat için ise, anlamsız olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlara göre; dişi farelerde 24 saatlik muamelede; erkek farelerde ise 12 ve 24 saatlik muamelede konsantrasyon arttıkça MI azalmaktadır. Dişilerde 6 ve 12 saatlik muamelede, erkeklerde ise 6 saatlik muamelede MI azalması anlamlı değildir (Şekil 4.1.3. ve 4.1.4.).

6, 12 ve 24 saat muamele sonucu dişi ve erkek farelerden elde edilen KA ile MI arasındaki ilişki şekil 4.1.5. ve 4.1.6.'da gösterilmiştir. Dişi farelerde uygulanan muamele sürelerinde KA ile MI arasında anlamlı bir ilişki yoktur. Erkek farelerde ise 6 ve 12 saat muamelede Pearson korelasyon testi $p= 0,05$ olarak belirlenmiş, aralarında anlamlı negatif korelasyon saptanmıştır.

6, 12 ve 24 saatlik muamelelerden elde edilen KA'ları ile uygulanan konsantrasyonlar arasındaki ilişkinin anlamlılığı Pearson korelasyon testi ile incelenmiştir. Dişi farelerde 6 ve 12 saat muamele için Pearson korelasyon testi $p= 0,05$, erkek farelerde ise 6 saat için $p=0,05$; 12 saat için ise $p=0,01$ 'dir. Dişi ve erkek farelerde 24 saat muamelede konsantrasyon ile KA arasında anlamlı bir ilişki yoktur.

Çalışmada gözlenen KA'larına ait örnekler şekil 4.1.7, 4.1.8, 4.1.9, 4.1.10'da verilmiştir.

Test edilen konsantrasyonlarda elde edilen KA testi sonuçlarına göre Delvosid fare kemik iliği hücreleri için klastojenik değildir. Ancak MI'ı anlamlı olarak düşürdüğü için sitotoksiktir.

Tablo 4.1.1. Delvosid'in farklı konsantrasyonları ile 6, 12 ve 24 saat muamele edilmiş dişi fare kemik iliği hücrelerinde gözlenen kromozom aberasyonları ve mitotik indeks (MI) değerleri.

Muamele Süresi ve Cinsiyet	Konsantrasyon	Toplam Hücre Sayısı	Normal Hücre Sayısı	Anormal Hücre Sayısı	Toplam anormallik (-gap)	Kromatid Gap	İzokromatid Gap	Kromatid Kırık	İzokromatid Kırık	Kontraksiyon	Sentromerik Atenuasyon	Mitotik İndeks %
6 saat- dişi	(-)Kontrol	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	3,17
	(+)Kontrol	100	85	15	***12	3	0	7	0	0	5	**2,10
	200 mg/kg	100	97	3	2	0	0	1	0	0	1	*2,26
	400 mg/kg	100	97	3	2	1	0	1	0	1	0	**2,07
	800 mg/kg	100	96	4	4	2	0	1	0	0	3	**1,96
12 saat- dişi	(-)Kontrol	100	98	2	1	1	0	1	0	0	0	3,63
	(+)Kontrol	100	87	13	*12	5	0	10	0	0	2	**2,30
	200 mg/kg	100	98	2	1	1	0	1	0	0	0	*2,66
	400 mg/kg	100	95	5	2	2	0	1	0	0	1	**2,37
	800 mg/kg	100	97	3	3	1	1	1	0	1	1	***2,17
24 saat- dişi	(-)Kontrol	100	99	1	1	0	0	1	0	0	0	3,93
	(+)Kontrol	100	83	17	*9	11	0	9	0	0	0	**2,67
	200 mg/kg	100	98	2	1	1	0	0	0	0	1	*3,00
	400 mg/kg	100	96	4	1	3	0	0	0	0	1	***2,37
	800 mg/kg	100	97	3	2	1	1	2	0	0	0	***1,93

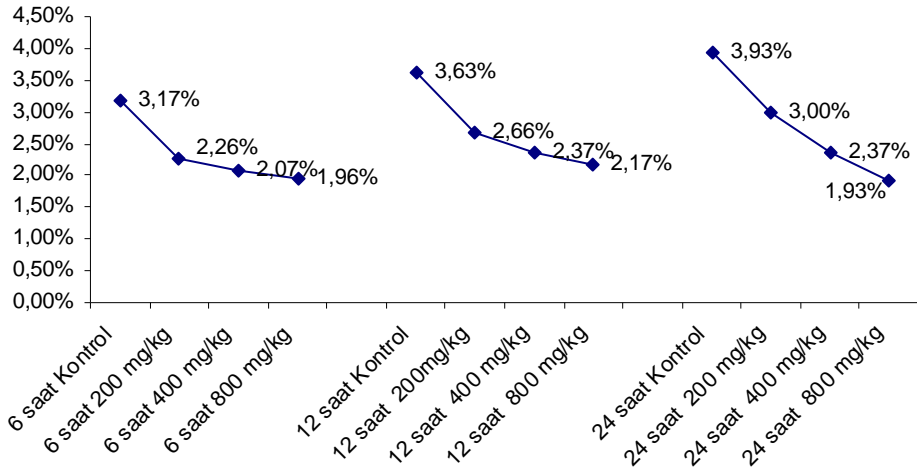
*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

Tablo 4.1.2. Delvosid'in farklı konsantrasyonları ile 6, 12 ve 24 saat muamele edilmiş erkek fare kemik iliği hücrelerinde gözlenen kromozom aberasyonları ve mitotik indeks (MI) değerleri. *P≤0,05; **P≤0,01; ***P≤0,001

Muamele Süresi ve Cinsiyet	Konsantrasyon	Toplam Hücre Sayısı	Normal Hücre Sayısı	Anormal Hücre Sayısı	Toplam anormallik (-gap)	Kromatid Gap	İzokromatid Gap	Kromatid Kırık	İzokromatid Kırık	Kontraksiyon	Sentromerik Atenuasyon	Mitotik İndeks %
6 saat - erkek	(-)Kontrol	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	3,97
	(+)Kontrol	100	87	13	***13	4	0	7	0	0	6	***2,40
	200 mg/kg	100	98	2	1	1	1	1	0	0	0	**2,73
	400 mg/kg	100	98	2	1	1	0	1	0	0	0	**2,50
	800 mg/kg	100	98	2	2	0	0	2	0	0	0	***2,26
12 saat - erkek	(-)Kontrol	100	99	1	0	1	0	0	0	0	0	4,53
	(+)Kontrol	100	81	19	***19	5	0	9	1	4	5	***2,73
	200 mg/kg	100	96	5	2	5	1	2	0	0	0	**3,20
	400 mg/kg	100	97	3	3	0	0	3	0	0	0	***2,53
	800 mg/kg	100	94	6	5	3	0	0	0	1	4	***2,13
24 saat - erkek	(-)Kontrol	100	98	2	2	0	0	1	0	1	0	4,37
	(+)Kontrol	100	80	20	***21	6	0	18	1	0	2	***2,53
	200 mg/kg	100	96	4	0	5	0	0	0	0	0	**3,03
	400 mg/kg	100	97	3	3	3	1	1	0	0	2	**2,96
	800 mg/kg	100	86	15	7	11	1	1	0	2	4	***1,87

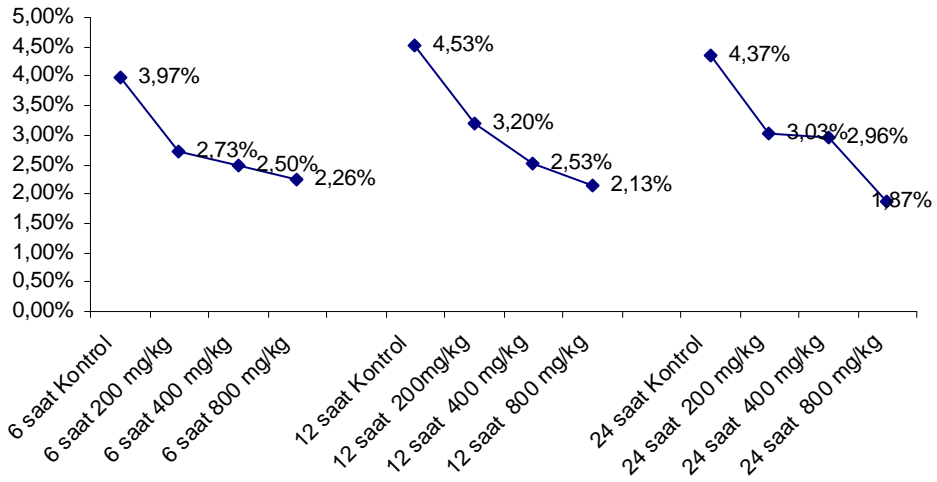
*P≤0,05; **P≤0,01; ***P≤0,001

MI

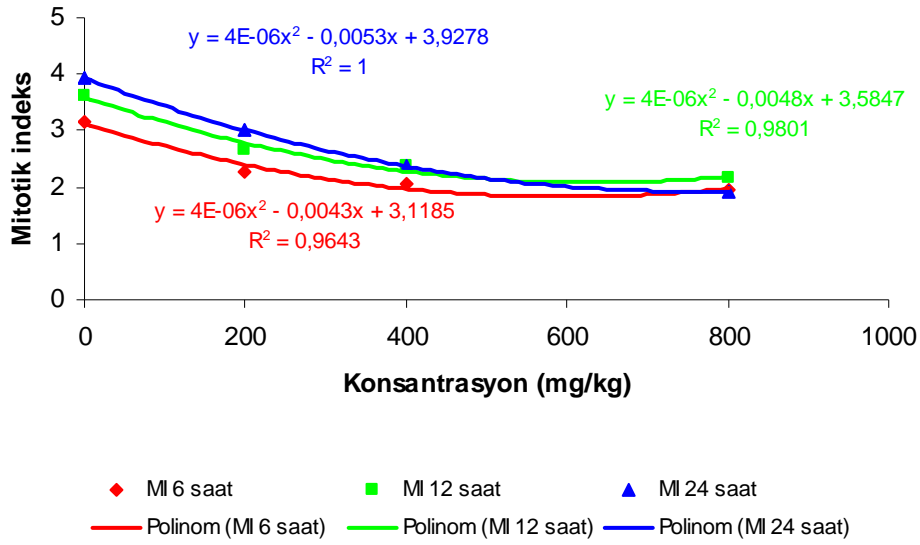


Şekil 4.1.1. Dişi farelerin kemik iliği hücrelerinde Delvosid'in farklı konsantrasyonlarının 6, 12 ve 24 saat muamelesi ile gözlenen MI değerleri.

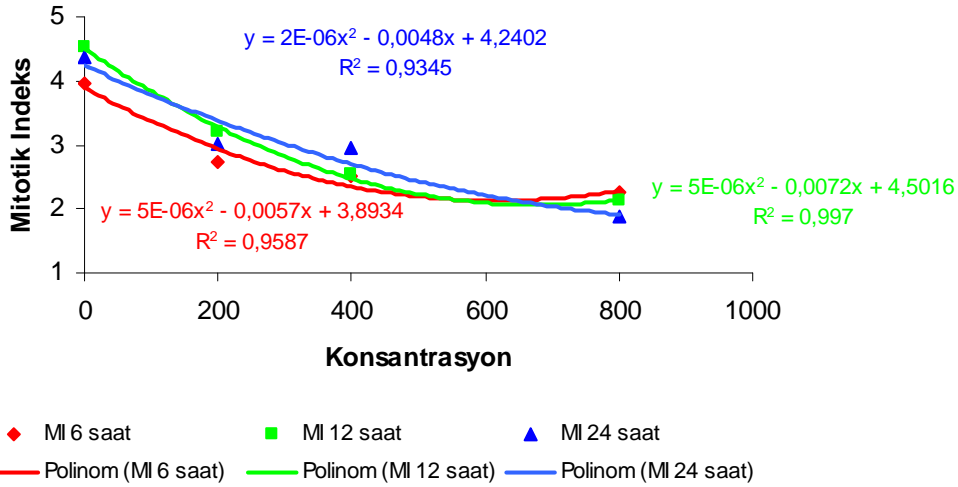
MI



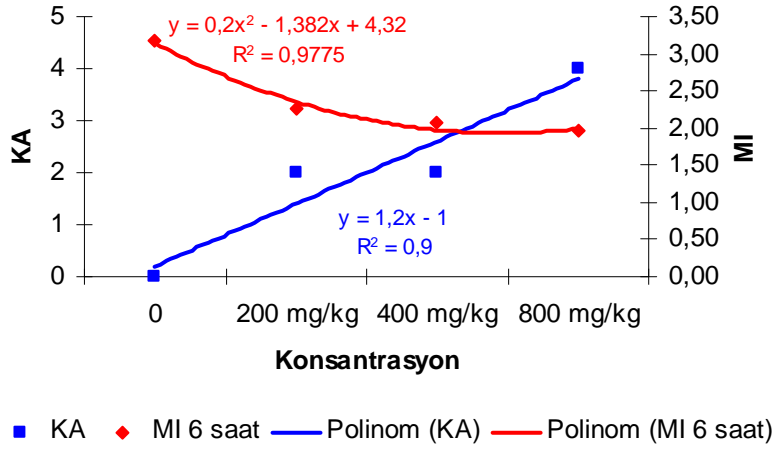
Şekil 4.1.2. Erkek farelerin kemik iliği hücrelerinde Delvosid'in farklı konsantrasyonlarının 6, 12 ve 24 saat muamelesi sonucu gözlenen MI değerleri.



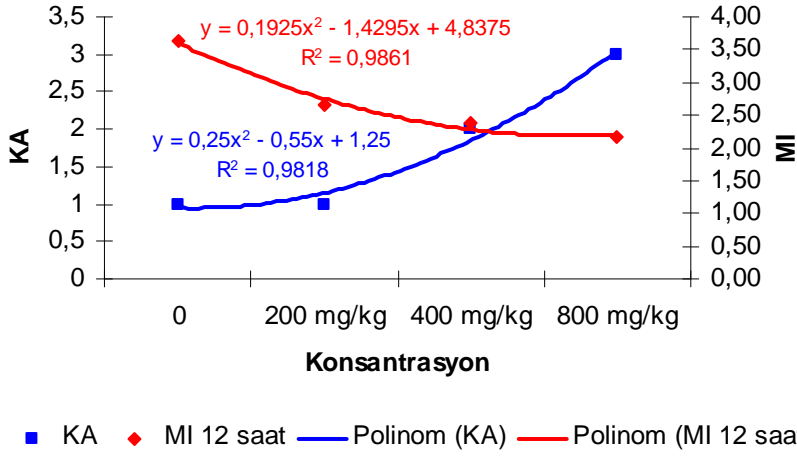
Şekil 4.1.3. Dişi farelerin kemik iliği hücrelerinde Delvosid'in farklı konsantrasyonlarının 6, 12 ve 24 saat muamelesi sonucu gözlenen MI değerleri ile konsantrasyon arasındaki ilişki (24 saat muamelede Pearson korelasyon $p=0,05$).



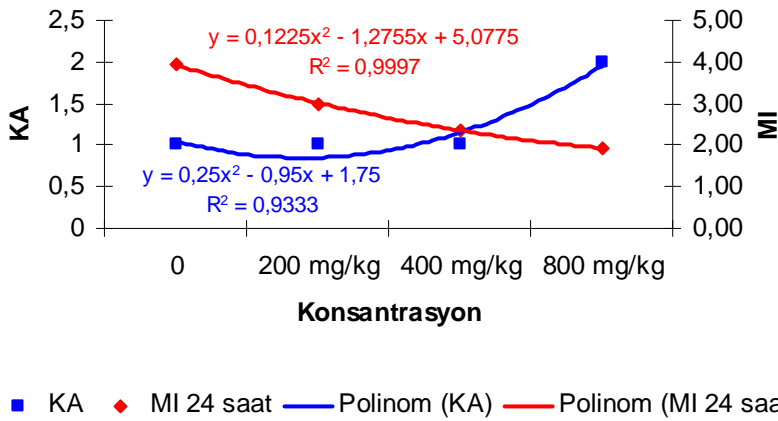
Şekil 4.1.4. Erkek farelerin kemik iliği hücrelerinde Delvosid'in farklı konsantrasyonlarının 6, 12 ve 24 saat muamelesi sonucu gözlenen MI değerleri ile konsantrasyon arasındaki ilişki (12 ve 24 saat muamelede Pearson korelasyon $p=0,05$).



A)

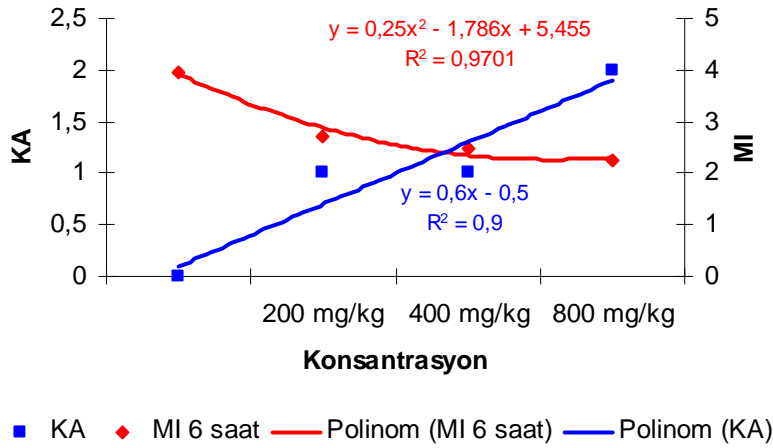


B)

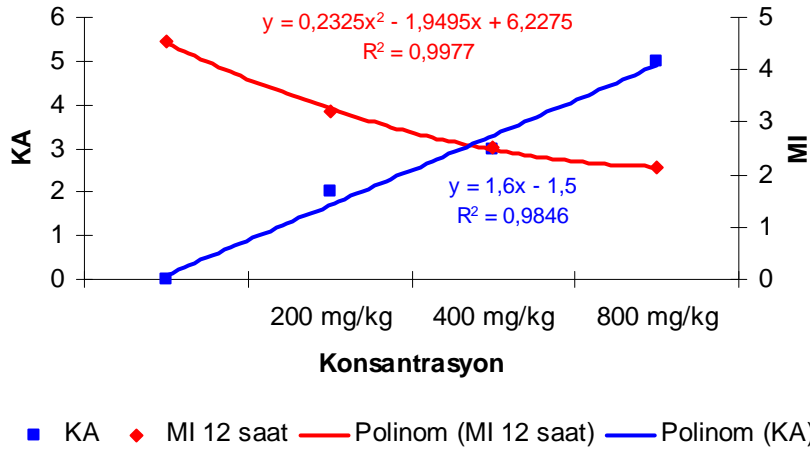


C)

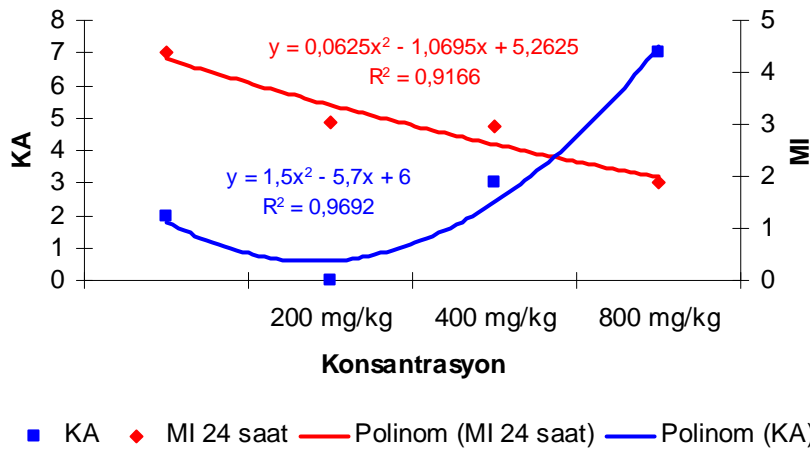
Şekil 4.1.5. Delvosid'in farklı konsantrasyonları ile dişi farelerin kemik iliği hücrelerinde gözlenen KA ve MI değerleri arasındaki ilişki. **A**, 6 saat Pearson korelasyon $p=0,05$; **B**, 12 saat $p=0,05$; **C**, 24 saat muamele sonuçları.



A)

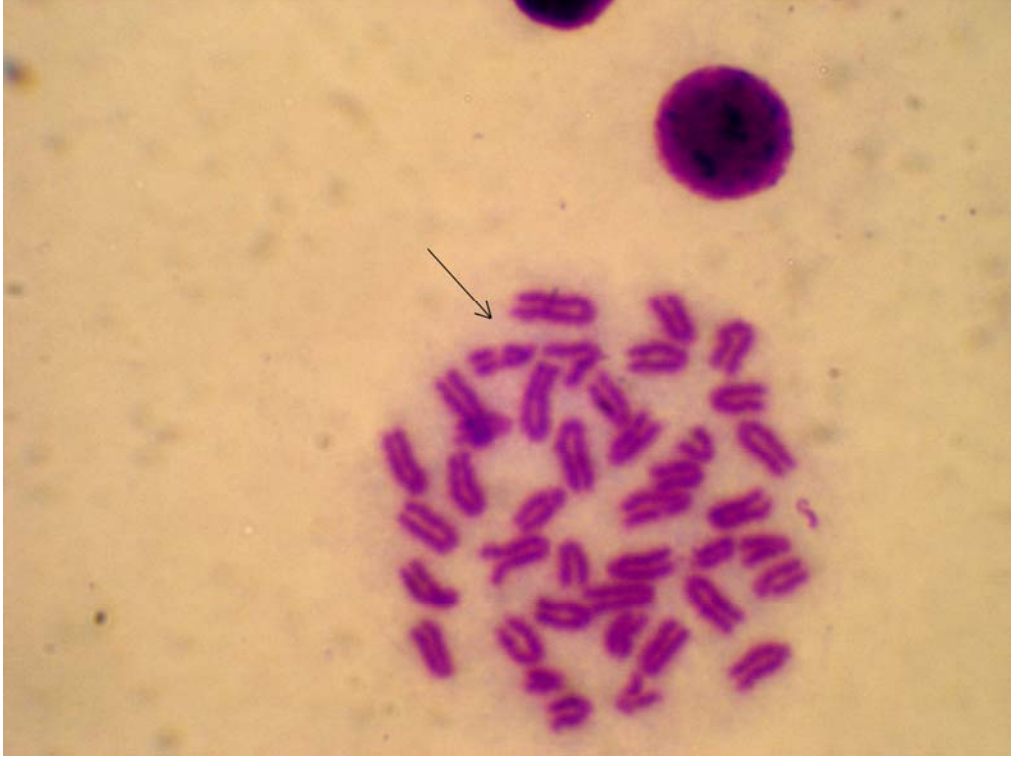


B)



C)

Şekil 4.1.6. Delvosid'in farklı konsantrasyonlarının erkek farelerin kemik iliği hücrelerinde neden olduğu KA ve MI değerleri arasındaki ilişki. **A**, 6 saat Pearson korelasyon testi $p=0,05$; **B**, 12 saat $p=0,05$; **C**, 24 saat muamele sonuçları.



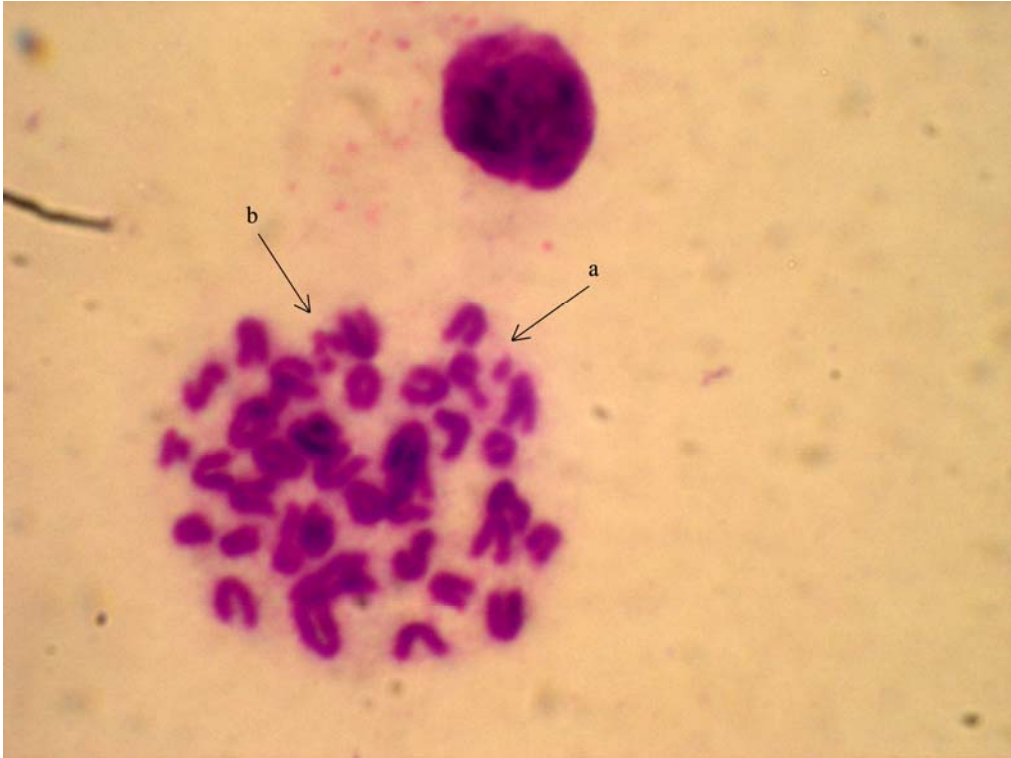
Şekil: 4.1.7. 400 mg/kg Delvosid'in erkek fare kemik iliğinde 12 saat muamele sonucu gözlenen kromatid kırık



Şekil: 4.1.8. 800 mg/kg Delvosid'in dişi fare kemik iliğinde 12 saat muamele sonucu gözlenen a) kromatid kırık, b) kromatid gap



Şekil: 4.1.9. 800 mg/kg Delvosid'in erkek fare kemik iliğinde 12 saat muamele sonucu gözlenen kromatid gap



Şekil: 4.1.10. 800 mg/kg Delvosid'in dişi fare kemik iliğinde 6 saat muamele sonucu gözlenen a) kromatid kırık, b) kromatid gap

4.2. Mikronukleus (MN) Yöntemi

Fare kemik iliği hücrelerinin farklı konsantrasyonlardaki Delvosid ile 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonucu dişi ve erkek farelerde gözlenen, 1MN'lu PCE, 2MN'lu PCE, 3MN'lu PCE, 1MN'lu NCE, 2MN'lu NCE değerleri tablo 4.2.1. ve 4.2.2.'de gösterilmiştir. Ayrıca tablolarda genotoksisteyi belirlemede kriter olarak kullanılan total MN'lu PCE yüzdesi ve PCE/NCE oranı da verilmiştir. Her bir konsantrasyon ve muamele süresi için 1000 eritrosit (PCE+NCE) sayılmış, MN'lu PCE'ler ve MN'lu NCE'ler belirlenmiş, kontrole göre anlamlılığı test edilmiştir.

Dişi farelerden elde edilen verilere göre; negatif kontrolle karşılaştırıldığında 24 ve 48 saatlik muamele gruplarının tüm konsantrasyonlarında 1MN'lu PCE frekansında anlamlı artış gözlenirken, 72 saatlik grupta sadece 800 mg/kg Delvosid konsantrasyonunda anlamlı artış gözlenmiştir. 2 MN'lu PCE frekansında, 24 saatte 400 ve 800 mg/kg, 72 saatte ise 800 mg/kg Delvosid konsantrasyonlarında anlamlı artış görülürken, 48 saatte anlamlı artış gözlenmemiştir. 3 MN'lu PCE frekansında elde edilen veriler hiçbir muamele grubunda anlamlı değildir. 1 MN'lu NCE, 24 ve 48 saatlik muamelelerde 400 ve 800 mg/kg konsantrasyonda anlamlı artış gösterirken, 72 saat muamelede anlamlı artış göstermemiştir. 2 MN'lu NCE'de elde edilen veriler 800 mg/kg konsantrasyonu hariç hiçbir muamele grubunda anlamlı değildir. Total MN'lu PCE yüzdesi 24 ve 48 saat muamelenin tüm konsantrasyonlarında, 72 saat muamelenin ise sadece 800 mg/kg konsantrasyonunda anlamlı olarak artmıştır. PCE/NCE oranı, 24 ve 72 saat muamelede 800 mg/kg konsantrasyonda, 48 saat muamelede ise tüm konsantrasyonlarda anlamlı olarak azalmıştır.

Erkek farelerden elde edilen verilere göre; negatif kontrolle karşılaştırıldığında 1MN'lu PCE frekansında 24 ve 48 saatlik muamele gruplarında 400 ve 800 mg/kg Delvosid konsantrasyonlarında, 2MN'lu PCE frekansında 24 ve 48 saatte sadece 800 mg/kg konsantrasyonda anlamlı artış gözlenirken, 72 saatlik muamele grubunun hiçbir konsantrasyonunda anlamlı artış gözlenmemiştir. 3 MN'lu PCE frekansında elde edilen veriler hiçbir muamele grubunda anlamlı değildir. 1 MN'lu NCE frekansı, sadece 48 saatlik muamele grubunun tüm konsantrasyonlarında anlamlı olarak artmıştır. 2MN'lu NCE , elde edilen verilerde hiçbir muamele grubu ve konsantrasyonda anlamlı değildir. Total MN'lu PCE yüzdesinde, 24 ve 48 saat muamelenin 400 ve 800 mg/kg

konsantrasyonlarında anlamlı artış gözlenmiş, 72 saat muamelenin hiçbir konsantrasyonunda anlamlı artış gözlenmemiştir. PCE/NCE oranı, 24 ve 48 saat muamelede tüm konsantrasyonlarda anlamlı olarak azalmıştır. 72 saat muamelede ise anlamlı bir azalma gözlenmemiştir.

Çalışmada gözlenen MN'lara ait örnekler şekil 4.2.3, 4.2.4, 4.2.5, 4.2.6'da gösterilmiştir.

24, 48 ve 72 saat muamele sürelerinden elde edilen total MN'lu PCE yüzdesi ile uygulanan konsantrasyonlar arasındaki ilişkinin anlamlı olup olmadığı Pearson korelasyon testi ile araştırılmıştır. Dişi farelerde 48 ve 72 saatlik muamelede Pearson korelasyon testi sırasıyla $p=0,01$ ve $p=0,05$ olarak saptanmıştır. Ancak dişi farelerde 24 saat muamele ve erkek farelerde muamele sürelerinin hiçbirinde Pearson korelasyon testi anlamlı değildir. Buna göre; dişilerde 48 ve 72 saatlik muamelede MN'lu PCE'nin artışı konsantrasyona bağlı olarak artmaktadır. Ancak dişilerde 24 saat ve erkeklerde 24, 48 ve 72 saat muamele sürelerinde MN'lu PCE'nin artışı konsantrasyona bağlı değildir (Şekil 4.2.1. ve 4.2.2.).

Tablo 4.2.1. Delvosid'in farklı konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat muamele edilmiş dişi fare kemik iliği hücrelerinde gözlenen 1MNPCE, 2MNPCE, 3MNPCE, 1MNNCE, 2MNNCE değerleri, PCE/NCE oranı.

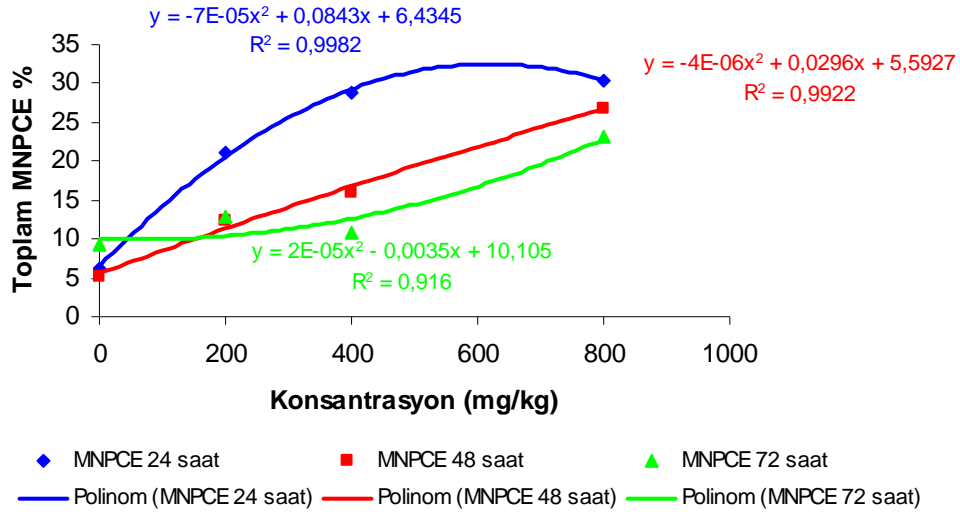
Muamele süresi	Konsantrasyon	Toplam Hücre Sayısı / Fare Sayısı	Total MNPCE % ± S.H.	1 MNPCE ±S.H.	2 MNPCE ±S.H.	3 MNPCE ±S.H.	1 MNNCE ±S.H.	2 MNNCE ±S.H.	PCE/NCE ±S.H.
24 saat dişi	(-) kontrol	5000/5	6,20 ± 2,20	5,40 ± 2,04	0,20 ± 0,20	0	1,40 ± 0,51	0,20 ± 0,20	1,67 ± 0,20
	(+) kontrol	5000/5	***56,40 ± 6,65	*** 51,60 ± 4,91	* 4,00 ± 1,67	0,80 ± 0,49	** 9,20 ± 0,80	0,40 ± 0,40	* 0,98 ± 0,12
	200 mg/kg	5000/5	*21,20 ± 3,72	** 21,20 ± 3,72	1,20 ± 0,80	0	3,60 ± 1,16	0,40 ± 0,40	1,10 ± 0,14
	400 mg/kg	5000/5	***28,80 ± 2,06	*** 24,40 ± 1,72	* 4,00 ± 0,89	0,40 ± 0,40	* 4,80 ± 1,02	0,40 ± 0,40	1,05 ± 0,28
	800 mg/kg	5000/5	***30,40 ± 0,98	*** 25,60 ± 1,32	** 4,80 ± 0,49	0	** 7,20 ± 1,02	0,80 ± 0,49	* 0,88 ± 0,14
48 saat dişi	(-) kontrol	5000/5	5,20 ± 1,02	4,80 ± 0,80	0,40 ± 0,40	0	2,40 ± 0,40	0	1,90 ± 0,19
	(+) kontrol	5000/5	***51,20 ± 2,58	*** 45,60 ± 1,47	*** 5,60 ± 1,47	0	6,40 ± 2,04	* 1,20 ± 0,49	** 0,90 ± 0,08
	200 mg/kg	5000/5	*12,40 ± 1,72	* 11,60 ± 1,72	0,40 ± 0,40	0,40 ± 0,40	4,00 ± 1,09	0,80 ± 0,49	** 1,01 ± 0,29
	400 mg/kg	5000/5	**16,00 ± 1,79	* 14,80 ± 2,49	0,80 ± 0,49	0,40 ± 0,40	* 5,20 ± 1,02	0,40 ± 0,40	*** 0,84 ± 0,09
	800 mg/kg	5000/5	***26,80 ± 3,32	*** 25,60 ± 3,18	1,20 ± 0,80	0	* 6,40 ± 1,72	0,80 ± 0,80	** 0,99 ± 0,10
72 saat dişi	(-) kontrol	5000/5	9,20 ± 0,80	8,80 ± 1,02	0,40 ± 0,40	0	4,00 ± 0,63	0	1,51 ± 0,18
	(+) kontrol	5000/5	***33,60 ± 7,55	*** 28,40 ± 6,21	* 5,20 ± 1,49	0	7,60 ± 2,13	0,80 ± 0,80	1,06 ± 0,20
	200 mg/kg	5000/5	12,80 ± 2,15	10,00 ± 1,78	2,80 ± 0,80	0	5,20 ± 1,62	0,80 ± 0,49	1,39 ± 0,13
	400 mg/kg	5000/5	10,80 ± 2,42	7,60 ± 1,60	3,20 ± 1,02	0	5,20 ± 0,80	0,80 ± 0,49	1,31 ± 0,09
	800 mg/kg	5000/5	*23,20 ± 3,32	* 16,00 ± 1,67	** 6,00 ± 1,41	1,20 ± 0,80	5,60 ± 1,93	* 1,20 ± 0,49	* 1,01 ± 0,10

*P≤0,05; **P≤0,01; ***P≤0,001

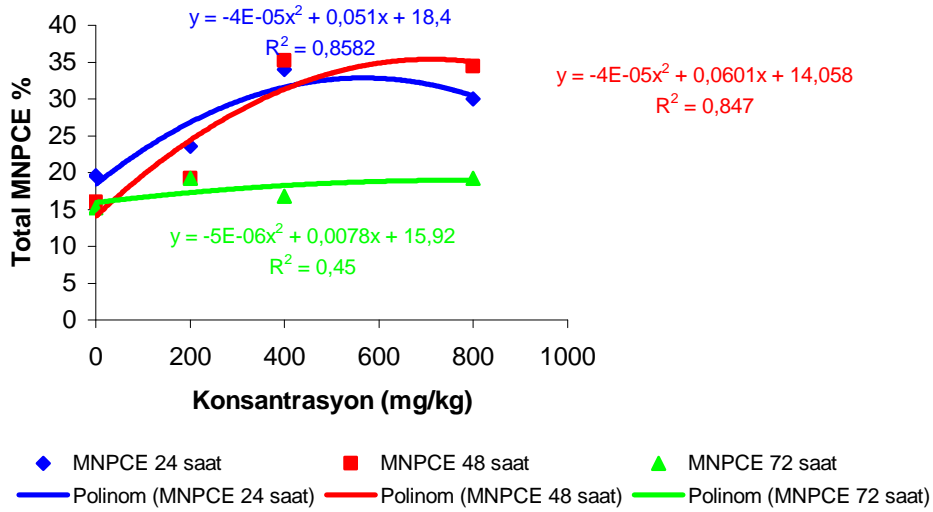
Tablo 4.2.2. Delvosid'in farklı konsantrasyonları ile 24, 48 ve 72 saat muamele edilmiş erkek fare kemik iliği hücrelerinde gözlenen 1MNPCE, 2MNPCE, 3MNPCE, 1MNCE, 2MNCE değerleri, PCE/NCE oranı.

Muamele süresi	Konsantrasyon	Toplam Hücre Sayısı/ Fare Sayısı	Total MNPCE % \pm S.H.	1 MNPCE \pm S.H.	2 MNPCE \pm S.H.	3 MNPCE \pm S.H.	1 MNCE \pm S.H.	2 MNCE \pm S.H.	PCE/NCE \pm S.H.
24 saat erkek	(-) kontrol	5000/5	19,60 \pm 0,75	17,60 \pm 0,74	2,00 \pm 0,63	0	8,00 \pm 1,41	3,60 \pm 0,74	1,48 \pm 0,03
	(+) kontrol	5000/5	***37,20 \pm 3,83	***32,80 \pm 4,03	3,60 \pm 0,74	0,80 \pm 0,49	9,20 \pm 0,80	4,00 \pm 4,00	***0,91 \pm 0,02
	200 mg/kg	5000/5	23,60 \pm 3,54	21,20 \pm 2,93	2,00 \pm 0,63	0,40 \pm 0,40	5,20 \pm 1,35	0,40 \pm 0,40	*1,26 \pm 0,09
	400 mg/kg	5000/5	**34,00 \pm 2,28	*29,20 \pm 1,74	4,80 \pm 1,02	0	7,20 \pm 0,49	4,40 \pm 1,72	***0,96 \pm 0,05
	800 mg/kg	5000/5	*30,00 \pm 1,79	*24,40 \pm 1,47	*5,60 \pm 0,74	0	7,60 \pm 0,74	5,60 \pm 0,74	***0,86 \pm 0,05
48 saat erkek	(-) kontrol	5000/5	16,00 \pm 2,28	14,80 \pm 1,62	1,20 \pm 0,80	0	5,20 \pm 0,49	2,00 \pm 0,89	1,70 \pm 0,11
	(+) kontrol	5000/5	***37,60 \pm 2,71	***34,00 \pm 1,78	3,60 \pm 1,16	0	* 8,80 \pm 1,02	1,60 \pm 0,74	***0,81 \pm 0,03
	200 mg/kg	5000/5	19,20 \pm 2,58	16,80 \pm 1,85	2,40 \pm 0,98	0	* 9,20 \pm 1,35	0	***1,00 \pm 0,05
	400 mg/kg	5000/5	***35,20 \pm 4,32	***30,40 \pm 3,18	4,00 \pm 0,63	0,80 \pm 0,80	** 13,60 \pm 1,47	2,00 \pm 1,26	***0,97 \pm 0,03
	800 mg/kg	5000/5	***34,40 \pm 1,94	***28,80 \pm 1,85	**5,60 \pm 0,74	0	** 17,20 \pm 1,35	0,80 \pm 0,80	***0,81 \pm 0,03
72 saat erkek	(-) kontrol	5000/5	15,20 \pm 1,36	13,60 \pm 1,16	1,60 \pm 0,74	0	5,60 \pm 1,16	2,00 \pm 0,63	1,52 \pm 0,05
	(+) kontrol	5000/5	***36,80 \pm 2,87	***30,80 \pm 2,57	*4,80 \pm 1,02	* 1,20 \pm 0,49	* 10,40 \pm 0,74	2,00 \pm 0,00	*** 0,82 \pm 0,08
	200 mg/kg	5000/5	19,20 \pm 1,96	15,60 \pm 1,32	3,60 \pm 0,74	0	6,00 \pm 0,63	1,60 \pm 0,40	1,35 \pm 0,10
	400 mg/kg	5000/5	16,80 \pm 0,80	13,20 \pm 1,49	3,20 \pm 0,80	0,40 \pm 0,40	6,40 \pm 0,74	2,40 \pm 0,74	1,23 \pm 0,02
	800 mg/kg	5000/5	19,20 \pm 1,96	16,40 \pm 1,16	2,80 \pm 1,02	0	8,40 \pm 1,16	2,00 \pm 0,00	1,26 \pm 0,11

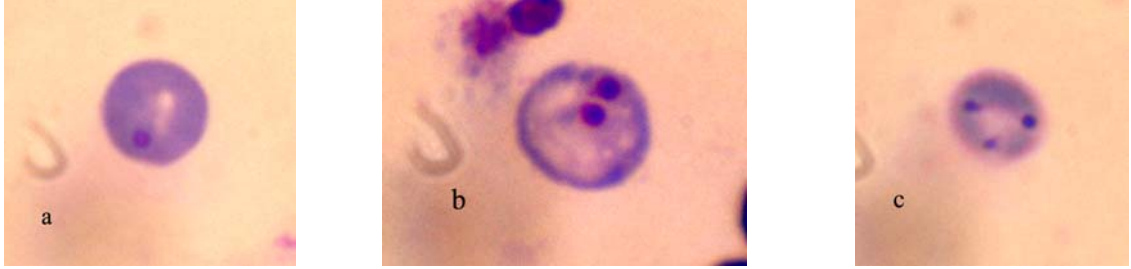
*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001



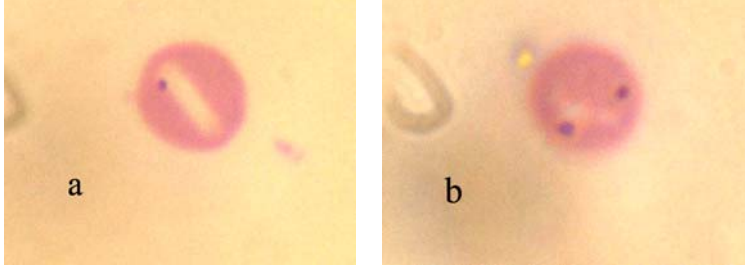
Şekil 4.2.1. Dişi farelerin kemik iliği hücrelerinde Delvosid'in farklı konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonucu gözlenen MN'lu PCE yüzdesi ile konsantrasyon arasındaki ilişki (48 saat muamelede Pearson korelasyon testi p=0,01, 72 saat muamelede Pearson korelasyon testi p=0,05).



Şekil 4.2.2. Erkek farelerin kemik iliği hücrelerinde Delvosid'in farklı konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saat muamelesi sonucu gözlenen MN'lu PCE yüzdesi ile konsantrasyon arasındaki ilişki.



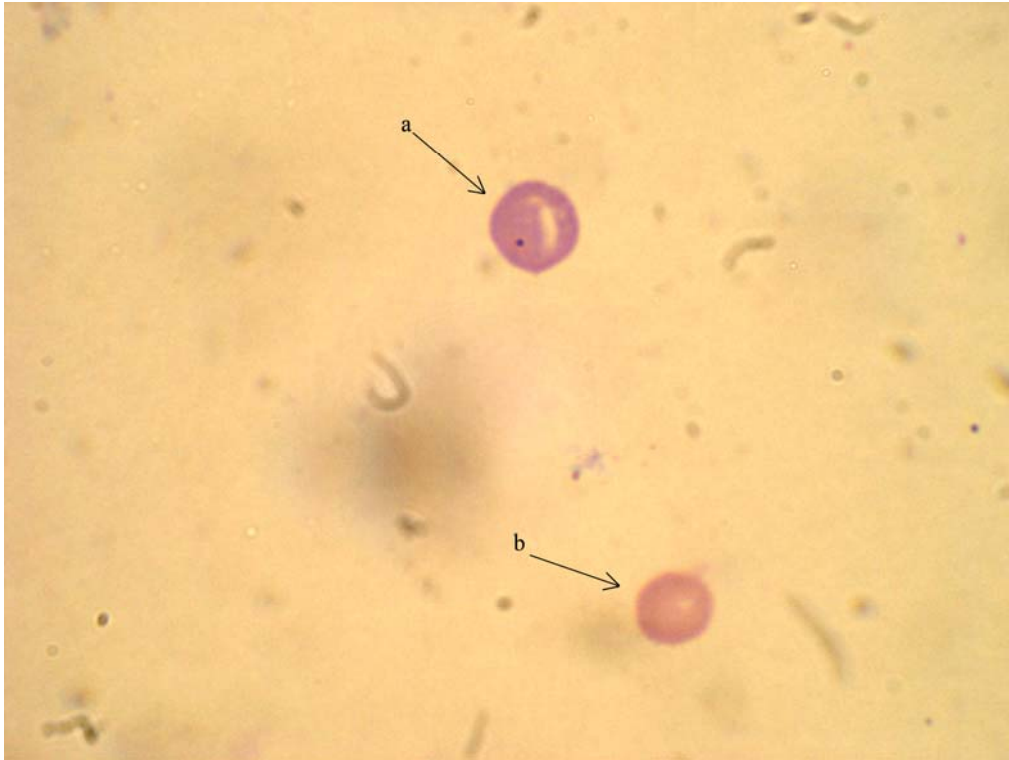
Şekil 4.2.3. a) 800 mg/kg Delvosid'in erkek fare kemik iliğinde 24 saat muamele sonucu gözlenen 1 MN'lu PCE; b) 800 mg/kg Delvosid'in dişi fare kemik iliğinde 24 saat muamelesi sonucu gözlenen 2 MN'lu PCE; c) 400 mg/kg Delvosid'in erkek fare kemik iliğinde 48 saat muamelesi sonucu gözlenen 3 MN'lu PCE



Şekil 4.2.4. a) 800 mg/kg Delvosid'in dişi fare kemik iliğinde 48 saat muamelesi sonucu gözlenen 1 MN'lu NCE; b) 800 mg/kg Delvosid'in erkek fare kemik iliğinde 24 saat muamelesi sonucu gözlenen 2 MN'lu NCE



Şekil 4.2.5. Delvosid'in 24 saat muamelesi sonucu 200 mg/kg konsantrasyonda dişi farelerde gözlenen a) MN'suz PCE; b) MN'suz NCE



Şekil 4.2.6. Delvosid'in 48 saat muamelesi sonucu 200 mg/kg konsantrasyonda erkek farelerde gözlenen a) MN'lu PCE; b) MN'suz NCE

4.3. Sperm Aberasyon Yöntemi

Delvosid'in 200, 400 ve 800 mg/kg konsantrasyonlarının 6, 12 ve 24 saat muamelesi sonucu gözlenen sperm anormallikleri Tablo 4.3.1.'de gösterilmiştir. Tabloda ayrıca toplam anormallik yüzdesi de verilmiştir. Her bir konsantrasyon ve muamele süresi için 1000 sperm sayılmıştır. Muz şekilli sperm, çengelsiz baş, amorf baş, kıvrık boyunlu sperm ve boyun ipi çözülmesi gibi morfolojik anormallikler saptanmıştır.

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde; muz şekilli sperm, çengelsiz baş, amorf baş, kıvrık boyunlu sperm sayısı 6 saat muamelenin tüm konsantrasyonlarında anlamlı olarak artmıştır. 12 saat muamelede, muz şekilli sperm ve kıvrık boyunlu sperm tüm konsantrasyonlarda, çengelsiz başın 400 ve 800 mg/kg konsantrasyonlarında, amorf başın ise sadece 800 mg/kg konsantrasyonunda anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir. 24 saat muamelede, muz şekilli sperm, çengelsiz baş ve kıvrık boyunlu sperm sayısı tüm konsantrasyonlarda, amorf baş ise 400 ve 800 mg/kg konsantrasyonlarında anlamlı olarak artarken, boyun ipi çözülmesinin sadece 6 saat muamelede 800 mg/kg konsantrasyonda anlamlı olduğu, diğer muamele süre ve konsantrasyonlarda anlamlı olmadığı görülmüştür.

Anormal sperm yüzdesinin artışı ile konsantrasyon artışı arasındaki ilişkinin anlamlılığı, Pearson korelasyon testi ile araştırılmıştır. 6 saat için Pearson korelasyon testi $p=0,05$ olarak saptanmıştır. Buna göre; 6saatlik muamelede anormal sperm sayısının artışı konsantrasyona bağlı iken; 12 ve 24 saatlik muamelede ise anormal sperm sayısının artışı anlamlı değildir (Şekil.4.3.1.).

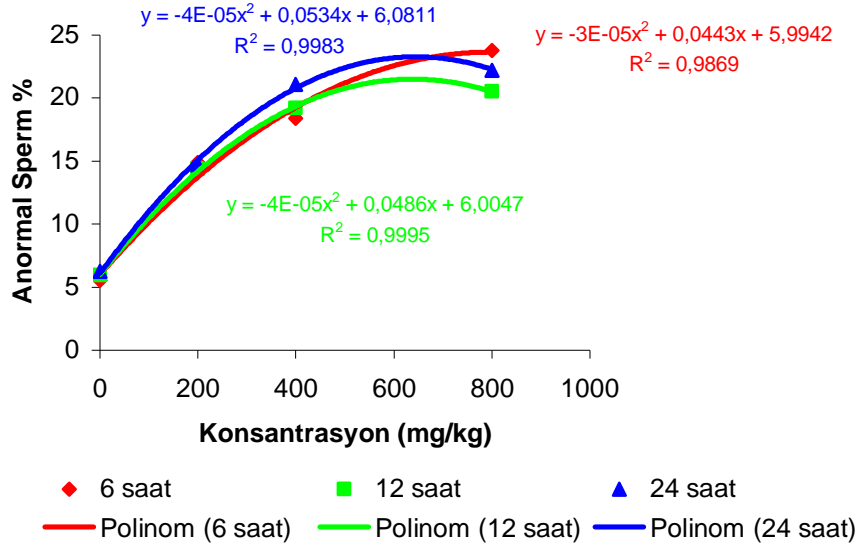
6, 12 ve 24 saat muamele sonucu erkek farelerden elde edilen KA ile anormal sperm arasındaki ilişki şekil 4.3.2.'de gösterilmiştir. 6 ve 12 saat muamelede Pearson korelasyon testi $p=0,05$ olarak belirlenmiş, aralarında anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır. 24 saat muamelede böyle bir ilişki gözlenmemiştir.

Çalışmada gözlenen sperm anormalliklerine ait örnekler şekil 4.3.3'te verilmiştir.

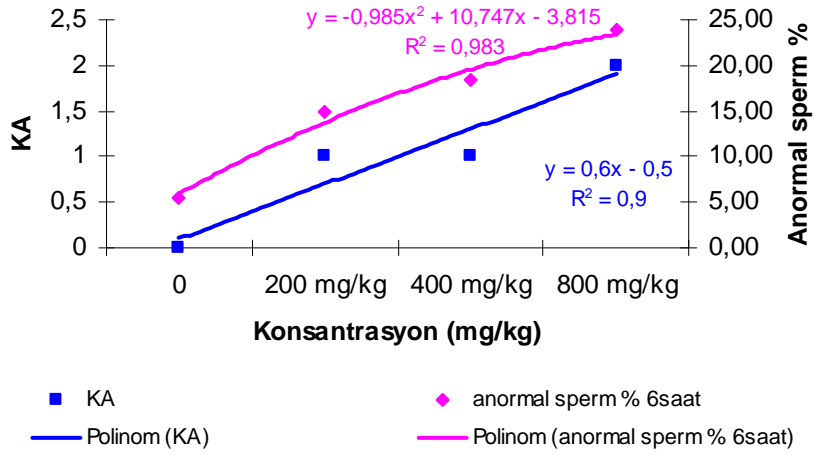
Tablo 4.3.1. Delvosid'in farklı konsantrasyonları ile 6, 12 ve 24 saat muamele edilmiş farelerde gözlenen morfolojik sperm anormallikleri.

Muamele süresi	Konsantrasyon	İncelenen sperm sayısı/hayvan sayısı	Muz şekilli sperm	Çengelsiz baş	Amorf baş	Kıvrık boyun	Boyun İpi çözülmesi	Toplam anormallik	Anormallik yüzdesi \pm S.H.
6 saat	(-) kontrol	3000/3	64	36	33	33	1	167	5,56 \pm 0,20
	(+) kontrol	3000/3	***362	***241	***119	53	9	***784	***26,13 \pm 0,68
	200 mg/kg	3000/3	*168	**137	***61	*80	1	***447	***14,9 \pm 0,87
	400 mg/kg	3000/3	**227	***153	***67	**99	6	***552	***18,4 \pm 0,11
	800 mg/kg	3000/3	***288	***170	***68	***177	*11	***714	***23,8 \pm 1,53
12 saat	(-) kontrol	3000/3	66	45	31	35	1	178	5,93 \pm 0,18
	(+) kontrol	3000/3	***413	***250	***117	*56	8	***844	***28,13 \pm 0,03
	200 mg/kg	3000/3	***204	101	37	***89	1	***432	***14,4 \pm 1,06
	400 mg/kg	3000/3	***247	**152	48	***117	12	***576	***19,2 \pm 0,77
	800 mg/kg	3000/3	***287	**140	***92	***89	8	***616	***20,53 \pm 1,04
24 saat	(-) kontrol	3000/3	61	47	37	40	2	187	6,23 \pm 0,32
	(+) kontrol	3000/3	***406	***276	***112	**76	12	***882	***29,4 \pm 1,05
	200 mg/kg	3000/3	***189	**117	56	*70	9	***441	***14,7 \pm 1,04
	400 mg/kg	3000/3	***253	***148	***84	***138	10	***633	***21,1 \pm 0,65
	800 mg/kg	3000/3	***294	***165	***98	***98	12	***667	***22,23 \pm 2,10

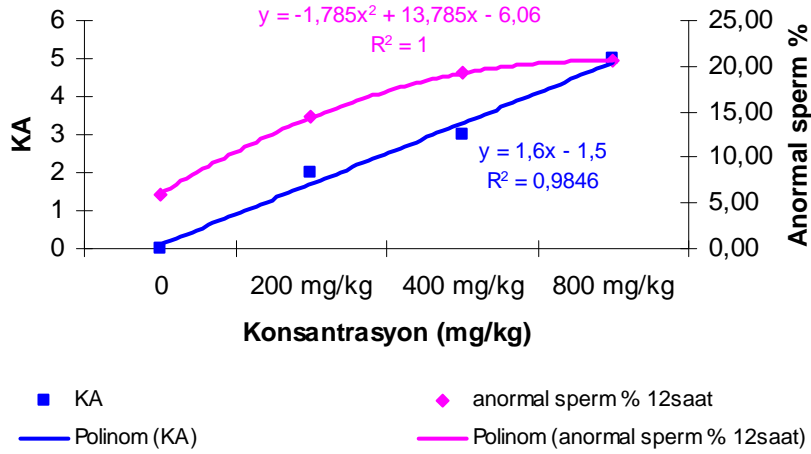
*P \leq 0,05; **P \leq 0,01; ***P \leq 0,001



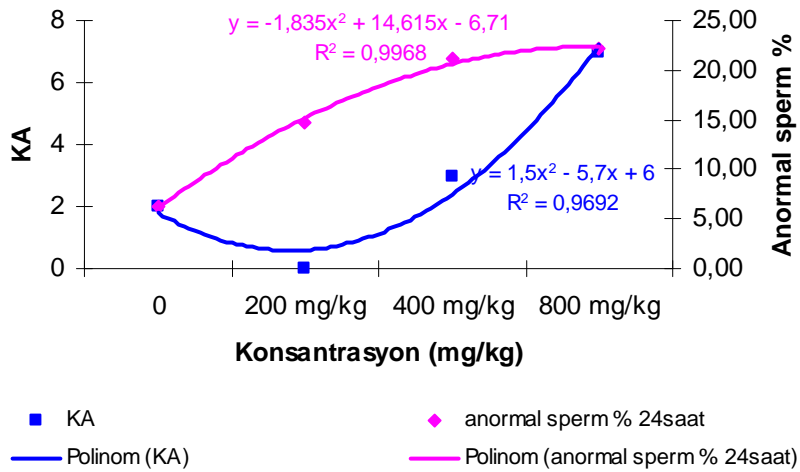
Şekil 4.3.1. Fare spermelerinde Delvosid'in farklı konsantrasyonlarının 6,12 ve 24 saat muamelesi sonucu gözlenen anormal sperm yüzdesi. (6 saat muamele süresinde anormal sperm yüzdesi ile konsantrasyon arasındaki ilişki Pearson korelasyon $p=0,05$).



A)

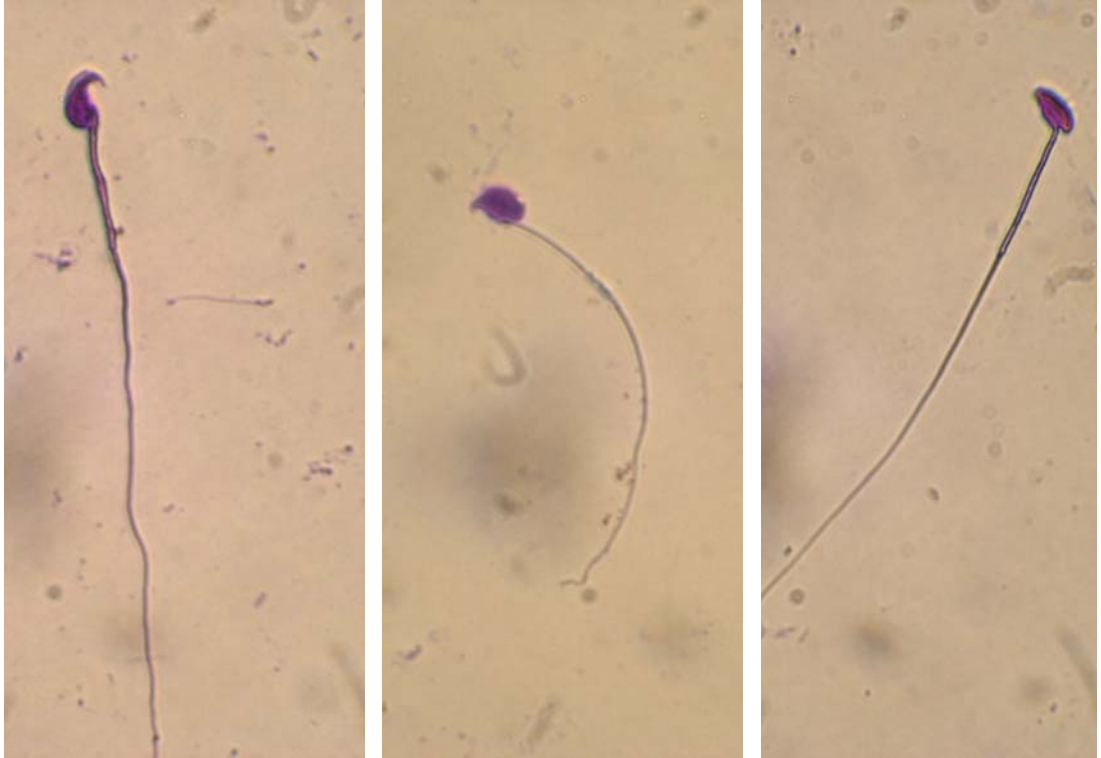


B)



C)

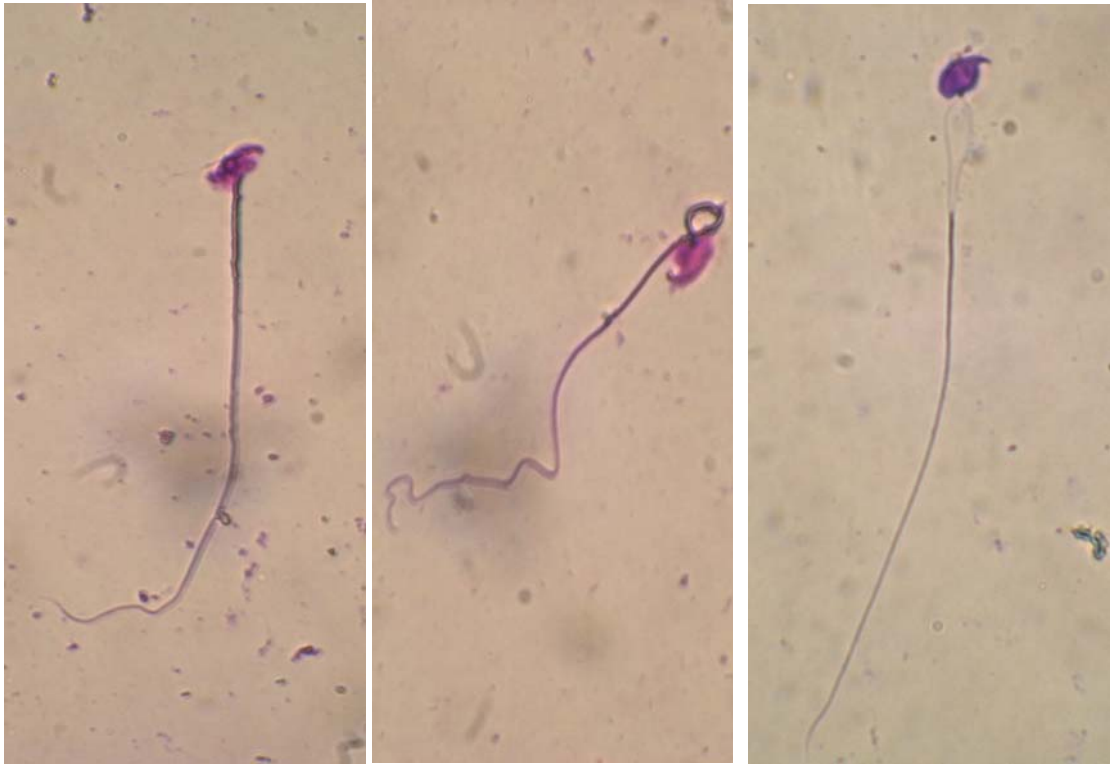
Şekil 4.3.2. Delvosid'in farklı konsantrasyonlarının, fare kemik iliği hücreleri ve spermelere muamelesi sonucu gözlenen KA ve anormal sperm yüzdesi arasındaki ilişki. A, 6 saat; B, 12 saat; C, 24 saat muamele sonuçları (Pearson korelasyon 6 ve 12 saat için $p=0,05$).



A)

B)

C)



D)

E)

F)

Şekil 4.3.3. A) Normal sperm; B) Muz şekilli sperm (200 mg/kg, 12 saat); C) Çengelsiz başlı sperm (800 mg/kg, 12 saat); D) Amorf başlı sperm (400 mg/kg, 24 saat); E) Kıvrık boyunlu sperm (400 mg/kg, 6 saat); F) Boyun ipi çözülmüş sperm (800 mg/kg, 6 saat).

4.4. Total Testosteron

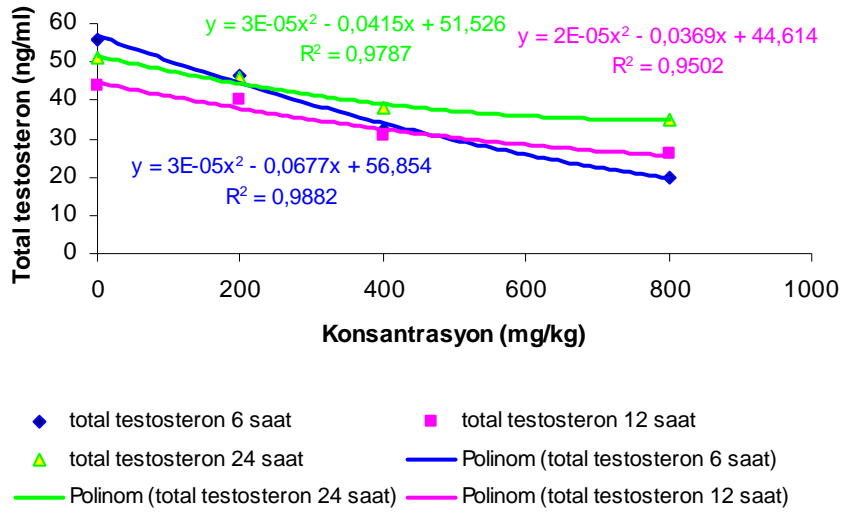
200, 400 ve 800 mg/kg konsantrasyonlarındaki Delvosid ile 6, 12 ve 24 saat muamele sonucu erkek farelerden elde edilen serumda çalışılan total testosteron düzeyleri tablo 4.4.1.'de verilmiştir.

Elde edilen veriler negatif kontrolle karşılaştırıldığında; total testosteron 6, 12 ve 24 saat muamelelerde 400 ve 800 mg/kg konsantrasyonlarda, anlamlı olarak azalmıştır. Test edilen konsantrasyonlardaki bu azalmanın konsantrasyona bağlı olup olmadığı Pearson korelasyon testi ile araştırılmış, 6 saat için Pearson korelasyon testi $p=0,01$, 12 ve 24 saat için $p=0,05$ olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre; konsantrasyon arttıkça total testosteron seviyesi de anlamlı olarak azalmıştır (Şekil 4.4.1.)

Anormal sperm yüzdesi ile total testosteron arasındaki ilişki Pearson korelasyon testi ile araştırıldığında, uygulanan tüm muamele gruplarında anlamlı ilişki olduğu saptanmıştır. Anormal sperm yüzdesi arttıkça total testosteron düzeyi konsantrasyona bağlı olarak azalmıştır.

Tablo 4.4.1. Delvosid'in erkek farelerde total testosteron üzerine etkisi.
* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.

Muamele süresi	Konsantrasyon	total testosteron
6 saat	(-) kontrol	56,00 \pm 6,55
	(+) kontrol	***22,33 \pm 1,45
	200 mg/kg	46,66 \pm 0,88
	400 mg/kg	***32,33 \pm 1,45
	800 mg/kg	***20,00 \pm 0,00
12 saat	(-) kontrol	43,70 \pm 4,07
	(+) kontrol	***20,00 \pm 0,00
	200 mg/kg	40,33 \pm 0,88
	400 mg/kg	*30,66 \pm 0,88
	800 mg/kg	**25,93 \pm 3,72
24 saat	(-) kontrol	51,00 \pm 2,30
	(+) kontrol	***20,00 \pm 0,00
	200 mg/kg	45,66 \pm 2,40
	400 mg/kg	*38,00 \pm 1,52
	800 mg/kg	**35,00 \pm 5,85



Şekil 4.4.1. Delvosid'in farklı konsantrasyonlarının 6, 12 ve 24 saat muamelesi sonucu elde edilen total testosteron ile konsantrasyon arasındaki ilişki (6 saat muamelede Pearson korelasyon $p=0,01$; 12 ve 24 saat muamelede Pearson korelasyon $p=0,05$)

4.5. Karaciğer Enzim Aktiviteleri

Farklı konsantrasyonlardaki Delvosid ile 6, 12 ve 24 saat muamele sonucu dişi ve erkek farelerden elde edilen serumda ALP, LDH, AST, ALT ve total protein ölçümleri Tablo 4.5.1. ve 4.5.2.'de sunulmuştur.

Elde edilen sonuçlar negatif kontrole karşılaştırıldığında; dişi farelerde LDH enziminin aktivitesi, 6, 12 ve 24 saatlik muamelelerde 800 mg/kg konsantrasyonda, anlamlı olarak azalmıştır. ALT aktivitesi, 6 saatte 400 ve 800 mg/kg konsantrasyonlarda,12 saatte 800 mg/kg konsantrasyonda anlamlı olarak artmıştır.ALP, AST ve total protein değerlerinde dişi farelerde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Erkek farelerde, ALP aktivitesi 24 saat muamele sonucunda uygulanan tüm konsantrasyonlarda anlamlı olarak azalmış, ALT aktivitesi 6 saat muamelede 400 ve 800 mg/kg konsantrasyonda anlamlı olarak artmıştır. ALP'nin 6 ve 12 saat muamemesinde,ALT'nin 12 ve 24 saat muamelesinde, LDH, AST ve total proteinin uygulanan tüm muamele süresi ve konsantrasyonlarda aktivitelerinde anlamlı bir değişiklik izlenmemiştir.

Tablo 4.5.1. Delvosid'in dişi farelerde serum enzim seviyeleri ve total protein üzerine etkisi.

Muamele süresi	Konsantrasyon	Enzim Adları (X±S.H.)				
		ALP	LDH	AST	ALT	Total Protein
6 saat	(-) kontrol	436,07 ± 45,66	2592,54 ± 125,82	169,43 ± 15,40	59,35 ± 10,72	5,16 ± 0,37
	200 mg/kg	408,97 ± 38,85	2172,62 ± 333,59	177,10 ± 11,45	111,04 ± 21,65	4,38 ± 0,16
	400 mg/kg	421,02 ± 45,82	2417,59 ± 415,44	181,46 ± 22,77	***180,83 ± 9,22	5,11 ± 0,07
	800 mg/kg	391,57 ± 7,77	*1212,04 ± 135,78	154,46 ± 26,33	**143,92 ± 13,93	4,83 ± 0,18
12 saat	(-) kontrol	445,58 ± 58,09	3033,43 ± 105,62	290,73 ± 15,08	69,57 ± 6,43	5,00 ± 0,23
	200 mg/kg	258,67 ± 104,39	2705,05 ± 238,11	312,06 ± 33,63	173,05 ± 43,94	5,27 ± 0,09
	400 mg/kg	271,02 ± 68,57	2366,46 ± 396,12	250,40 ± 47,70	107,82 ± 12,68	4,43 ± 0,42
	800 mg/kg	444,37 ± 93,33	*1768,73 ± 239,72	125,03 ± 40,29	*234,77 ± 42,30	4,80 ± 0,16
24 saat	(-) kontrol	375,74 ± 23,35	2514,74 ± 189,40	290,40 ± 4,06	124,27 ± 10,33	4,74 ± 0,12
	200 mg/kg	280,30 ± 51,27	2913,59 ± 369,57	263,97 ± 60,73	106,01 ± 13,61	4,57 ± 0,10
	400 mg/kg	284,03 ± 17,20	2585,70 ± 162,38	323,37 ± 14,04	110,83 ± 10,45	4,56 ± 0,07
	800 mg/kg	258,76 ± 24,60	*1429,07 ± 247,15	346,85 ± 11,70	96,17 ± 9,29	4,82 ± 0,03

*P≤0,05; **P≤0,01; ***P≤0,001

Tablo 4.5.2. Delvosid'in erkek farelerde serum enzim seviyeleri ve total protein üzerine etkisi.

Muamele süresi	Konsantrasyon	Enzim Adları (X±S.H.)				
		ALP	LDH	AST	ALT	Total Protein
6 saat	(-) kontrol	284,78 ± 33,95	2865,24 ± 107,30	163,28 ± 26,09	57,67 ± 4,65	4,27 ± 0,17
	200 mg/kg	436,50 ± 27,15	2648,62 ± 329,62	157,35 ± 31,52	51,70 ± 10,59	4,37 ± 0,17
	400 mg/kg	309,08 ± 52,10	2472,50 ± 174,32	231,68 ± 18,65	*108,82 ± 6,85	4,44 ± 0,15
	800 mg/kg	338,71 ± 57,94	2624,75 ± 285,65	140,25 ± 15,01	**132,85 ± 17,11	4,34 ± 0,06
12 saat	(-) kontrol	313,26 ± 72,31	2613,40 ± 168,07	302,10 ± 40,24	183,78 ± 44,73	4,20 ± 0,19
	200 mg/kg	200,66 ± 25,44	2275,07 ± 186,59	304,63 ± 35,20	91,27 ± 10,76	4,47 ± 0,12
	400 mg/kg	309,08 ± 52,10	2472,50 ± 174,32	231,68 ± 18,65	108,82 ± 6,85	4,44 ± 0,15
	800 mg/kg	338,71 ± 57,94	2624,75 ± 285,65	140,25 ± 15,01	132,85 ± 17,11	4,34 ± 0,06
24 saat	(-) kontrol	528,53 ± 68,92	2562,56 ± 191,02	348,83 ± 13,34	95,31 ± 3,22	4,20 ± 0,09
	200 mg/kg	**230,62 ± 29,37	2719,92 ± 184,53	289,17 ± 50,61	79,99 ± 2,94	4,55 ± 0,06
	400 mg/kg	**188,86 ± 3,76	2114,75 ± 295,42	345,00 ± 30,18	109,78 ± 17,41	4,59 ± 0,22
	800 mg/kg	*331,03 ± 50,37	2955,36 ± 139,85	348,97 ± 22,5	94,02 ± 13,03	4,23 ± 0,10

*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

5. TARTIŞMA

Kimyasal maddelerin canlılar üzerindeki zararlı etkilerinin incelenmesi için çeşitli testlerden yararlanılmaktadır. KA, MN oluşumu gibi sitogenetik testler ve sperm anormallik testi genotoksik hasarın incelenmesinde kullanılan testlerden bazılarıdır (Ieradi vd. 2003). Çalışmamızda etken maddesi Natamisin olan Delvosid'in toksik etkileri fare kemik iliği KA, MN ve sperm anormallik yöntemleri kullanılarak araştırılmış, bunlara ilave olarak serumdaki ALP, AST, ALT, LDH enzim aktiviteleri, total protein ve testosteron düzeyleri ölçülmüştür.

KA test yönteminden elde edilen verilere bakıldığında, Delvosid'in test edilen konsantrasyonlarının hem dişi hem de erkek farelerin kemik iliği hücrelerinde uygulanan 6, 12 ve 24 saat muamelesinde anlamlı KA'larına neden olmadığı gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, uygulanan konsantrasyonlarda Delvosid klastojenik değildir. Delvosid'in genotoksitesini belirlemek amacıyla daha önce yapılan çalışmalarda bu kimyasalın; *S. typhimurium* ve *E.coli*'de geri mutasyona neden olmadığı, *B. subtilis*'te mutajenik aktivite göstermediği saptanmıştır (WHO, 2006). Cox vd. (1973) yaptıkları üreme toksisitesi çalışmalarında; ölü fetüs, canlı fetüs ya da implantasyon bölgelerinin sayısı bakımından anlamlı farklılıkların bulunmadığını, aynı çalışmadan elde edilen 3 jenerasyondaki dişi ve erkek farelerin kullanıldığı KA yönteminde de Natamisin'in klastojenik olmadığını bildirmişlerdir (WHO, 2006). Levinskas vd. 1963 ve 1966 yıllarında yaptıkları üreme toksisitesi çalışmalarında, değişik konsantrasyonlarda Natamisin içeren besinle beslenen sıçanların yavruları ile kontroller arasında fertilitate, gebelik, laktasyon ve yaşama kabiliyeti indisi bakımından hiçbir farklılık görülmemiştir (WHO, 2006). Kısa süreli toksisite testlerinde; Levinskas vd. (1966), 0, 125, 500, 2000 ve 8000 mg/kg konsantrasyonda Natamisin içeren besin verdikleri sıçanların, 0, 125, 250 ve 500 mg/kg konsantrasyonda Natamisin içeren besin verdikleri köpeklerin hematolojik incelemelerinde ve organ ağırlıklarında anlamlı farklılıklar olmadığını saptamışlardır (WHO, 2006). Grupper (1961, 1964) Natamisinle tedavi edilen 111 hastada; Malten (1967) ise Natamisin üretiminde çalışan 75 işçide yaptığı çalışmalarında hiçbir alerjik reaksiyonun meydana gelmediğini gözlemişlerdir (WHO, 2006).

Değişik konsantrasyonlarda Natamisin süspansiyonu ile muamele edilmiş taze peynirler ve 3 hafta stoklanmış peynirlerin 7 hafta boyunca verildiği sıçanlar ile yapılan çalışmada, hayvanların organ ağırlıkları, hematolojik bulguları, gıda tüketimi, morbidite, mortalite, görünüş ve davranışları üzerinde hiçbir değişikliğe rastlanmamıştır (Wieriks, 1966), aynı araştırıcının (1971) 10 ay boyunca Natamisinle muameleli taze hazırlanmış ve 2-8 hafta depolanmış elma kabuğu içeren besinlerin verildiği çalışmasında da, bu kimyasalların organ ağırlıklarına, serum enzimlerine, hematolojik bulgularına, mortalite oranına ve büyüme oranına etki etmediği gösterilmiştir (WHO, 2006).

Delvosid gibi koruyucu olarak kullanılan bazı gıda katkı maddeleriyle yapılan çalışmalar da negatif sonuçlar vermiştir: Sodyum benzoat fare ve sıçanların üreme ve gelişmeleri üzerine toksik değildir (Nair, 2001). Polybrominated biphenyl'lerin Çin sıçanlarının V79 hücrelerinde (Glatt vd. 1992), Borik asit'in Salmonella/mikrosom testinde mutajen olmadığı, CHO hücrelerinde KA ve KKD'ni indüklediği (National Toxicology Program, 1987), in vitroda farelerde KA'larına neden olmadığı (McGregor vd. 1988) görülmüştür. Propiyonik asit'in Salmonella/mikrosom testi ve KKD testinde negatif sonuç verdiği (Basler vd. 1987), Propiyonik asit türevleri olan İbuprofen, Ketoprofen ve Naproxen'in Ames testinde mutajen olmadığı bildirilmiştir (Philipose vd. 1997). Sodyum nitrit'in, fare, sıçan ve tavşanlarda KA oluşumunu indüklediği, BSC-1 ve HeLa hücrelerinde KA'una neden olmadığı gösterilmiştir (Luca vd. 1987). Sorbik asit'in, KA, KKD ve Ames testlerinde klastojenik ve mutajenik etki göstermediği (Walker, 1990), HeLa hücreleri ve plazmid DNA'ları için mutajen olmadığı (Ferrand vd. 2000b) anlaşılmıştır. Kalsiyum sorbat'ın, HeLa hücreleri ve plazmid DNA'larıyla yapılan genotoksisite testlerinin negatif sonuçlar verdiği ve Ames testinde mutajenik olmadığı (Ferrand vd. 2000c), Potasyum ve Sodyum sorbat'ın Ames testi, CHO hücrelerinde HGPRT ve KKD testinde genotoksik etki göstermediği (Munzer vd. 1990) bildirilmiştir. Sodyum ve Potasyum metabisülfid'in fare, sıçan, hamster ve tavşanlarda teratojenik ve mutajenik (Nair ve Elmor, 2003), Potasyum metabisülfid'in *S.typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında mutajenik olmadığı (Kayraldız vd. 2006) gösterilmiştir. Bu çalışmaların sonuçları bizim çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar ile uygunluk göstermektedir.

Koruyucu katkı maddelerinden bazıları ise pozitif etki göstermiştir: Benzoik asit, insan lenfositlerinde (Tohda vd., 1980), *Salmonella typhimurium*'un, TA97, TA98, TA100, TA1535 ve TA1537 suşlarında (Zeiger vd. 1988) sitotoksiktir. Fluorobiphenyl, *Salmonella typhimurium* TA100 suşunda mutajeniktir (Glatt vd. 1992), Bifenil'in 7 farklı türevi, *Salmonella typhimurium*'un TA1537, TA97, TA1538, TA98 suşlarında çerçeve kayması mutasyonları meydana getirmiştir (Ablev vd. 1993). Bifenil, farelerin birçok organında DNA hasarına neden olmuştur (Sasaki vd. 1997). Borik asidin, *E. coli* PQ37'de B-galaktisidaz sentezini artırdığı (Odunola, 1997), *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde mitotik indeks'i (MI) azalttığı (Dönbak vd. 2002), insan periferik lenfositlerinde KA ve KKD oluşumunu arttırdığı (Arslan, 2004) bildirilmiştir. Propiyonik asidin, *Salmonella typhimurium*'da mutasyona, *Drosophila*'da mitotik rekombinasyonlara neden olduğu (Surjan, 1989), türevleri olan ibuprofen, ketoprofen ve naproxen'in, fare kemik iliği hücrelerinde KKD'ni, *Salmonella typhimurium*'un TA98 suşunda da mutasyonu arttırdığı (Philipose vd. 1997) gösterilmiştir. Sodyum nitritin *in vitro* hamster embriyonik hücrelerinde KA ve endoreduplikasyona (Tsuda vd. 1976), Çin hamster hücrelerinde KA'una (Ishidate ve Odashima, 1977) neden olduğu, fare kemik iliği hücrelerinde KKD'ni arttırdığı (Mukherjee vd. 1988); *Salmonella typhimurium*'un TA1535 suşu için mutajen olduğu (Akın ve Sümer, 1991) bildirilmiştir. Sodyum metabisülfidin, insan lenfositlerinde KA, KKD (Meng ve Zhang, 1992); *Allium cepa* L.'da mitotik anormallikleri (Rencüzoğulları vd. 2001a), insan lenfosit hücrelerinde KA ve KKD'ni arttırdığı, replikasyon ve mitotik indeksi düşürdüğü (Rencüzoğulları vd. 2001b), sıçan kemik iliğinde genotoksik ve sitotoksik etkiye sahip olduğu (Kayraldız, 2005) rapor edilmiştir. Bu sonuçlar, çalışmamızdan elde edilen sonuçlarla uygunluk göstermemektedir. Bu farklılığın, kullanılan kimyasal ve yöntem farklılıklarından en çok ta deney materyalinin genetik yapısına bağlı olarak ortaya çıkmış olabileceği düşünülmektedir.

KA'nu yönteminde, meydana gelen sitotoksiteyi belirlemek için MI kullanılır. MI, hücre siklusunda mitozdaki hücre yüzdesidir ve MI'in azalması hücre siklusunun ilerlemesinin inhibe edildiğini, hücre bölünmesinin olumsuz etkilendiğini gösterir. Amorim vd. göre (2000); uygun test konsantrasyonlarını ve muamele zamanını seçmek, sitotoksite derecesinin belirlenmesinde önemlidir; elde edilen veriler insanların maruz kalabileceği kimyasalların risk değerlendirmesinde kullanıldığından büyük önem

taşımaktadır (Seligmann vd. 2003). Çalışmamızda 6, 12 ve 24 saat muameleli gruplarda ve tüm konsantrasyonlarda Delvosid MI'i anlamlı olarak düşürmüştür. Dişi ve erkek farelerde 24 saatlik uygulama periyodunda 800 mg/kg Delvosid konsantrasyonu MI'i sırasıyla % 51 ve 57 oranında düşüren toksik konsantrasyondur. Dişi farelerde 6 ve 12 saatte 800 mg/kg konsantrasyon MI'i sırasıyla % 38 ve 40 oranında; erkek farelerde ise % 43 ve 53 oranında düşürmüştür. 6 ve 12 saatlik uygulama periyodunda MI'i % 50 oranında düşüren konsantrasyonun hem dişi hemde erkek farelerde daha yüksek olabileceği düşünülmektedir. KA yönteminde, 24 saat Delvosid ile muamele edilen fare kemik iliği hücreleri toksik açıdan daha fazla etkilenmektedirler. 24 saat muamele sonucu gözlenen toksisite 6 ve 12 saat muamele sonucu gözlenen toksisiteden fazladır (Şekil 4.1.3. ve 4.1.4.). Delvosid hücre bölünmesini inhibe ederek toksik etki göstermiştir.

Çalışmamızda elde edilen verilere göre; Delvosid ile muamele sonucu gözlenen toksik etki, muamele süresine bağlı olduğu gibi, dişi ve erkek fareler için konsantrasyona bağlı olarak da değişim göstermiştir. Delvosid ile 6, 12 ve 24 saat muamele edilmiş gruplardan elde edilen sonuçlara göre; konsantrasyon arttıkça MI azalmış, toksisite ve KA'ları artmıştır. Ancak KA'larındaki bu artış, muameleli gruplar arasında önemli bir artış değildir. Daha yüksek konsantrasyonlarda Delvosid uygulamalarının fare kemik iliği hücrelerinde KA'unu anlamlı olarak arttırabileceği düşünülmektedir.

MN yöntemi, kimyasal bileşiklerin genotoksik etkilerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan hassas bir kısa süreli yöntemdir. Kimyasalların genotoksitesini, farelerin olgunlaşmamış kemik iliği eritrositleri kullanılarak değerlendirilir (Sato ve Tomita, 2001). Fare kemik iliğinde PCE'lerin canlılık süreleri 10 ile 33 saat arası olduğundan ve MNPCE sayısı aneujenler ile 6, klastojenler ile 10 saatte arttığından bunların veya reaktif metabolitlerinin etkileri 24 ve 48 saat sonra kemik iliğinde belirlenebilir. Bu yüzden farede in vivo MN testi için, muameleden sonra 12 ve 72 saat aralığından en az üç muamele süresinin kullanılması önerilir (OECD, 1983; EEC, 1984). Bizim çalışmamızda da MN yöntemi için 24, 48 ve 72 saatlik muamele süreleri kullanılmıştır.

Çalışmamızda elde edilen MN sonuçlarına bakıldığında, dişi farelerde Delvosid'in 24 ve 48 saat muamelesi tüm konsantrasyonlarda, 72 saat muamelesi

sadece 800 mg/kg konsantrasyonda; erkek farelerde ise 24 ve 48 saatlik uygulamada 400 ve 800 mg/kg konsantrasyonlarında total MN'lu PCE yüzdesini anlamlı olarak arttırdığı gözlenmiştir. Heddle vd.'lerinin 1983 yılındaki bildirisine göre; eritrositik popülasyonda MN'un %6'dan fazla olması genotoksisiteyi gösterir (Rabbani vd. 2005). Birçok araştırmacının koruyucu gıda katkı maddeleri ile yaptıkları çalışmalardan da pozitif sonuçlar elde edilmiştir: Sodyum bisülfid (Meng ve Zhang, 1992), Sitrik asit (Yılmaz vd. 2008) ve Bifenil'in (Rencüzoğulları vd. 2008) insan lenfositlerinde MN frekansını arttırdığı, Sülfür dioksit'in hidre edilmiş formunun *Vicia faba* ve *Allium cepa* kök uçlarında , Sodyum propiyonat, Kalsiyum propiyonat ve Potasyum propiyonat'ın (Türkoğlu, 2008), Sodyum benzoat, Borik asit, Sitrik asit, Potasyum sitrat ve Sodyum sitrat'ın *A. cepa*'da (Türkoğlu, 2007) MN oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir. Potasyum bromat, insan lenfositlerinde 24 saatte sadece 500-550 µg/ml konsantrasyonda, 48 saatte ise tüm dozlarda (Kaya ve Topaktaş, 2007), aspartam da yine insan lenfositlerinde sadece en yüksek konsantrasyonda (2000 µg/ml) (Rencüzoğulları vd. 2004) anlamlı MN oluşumuna neden olmuştur. Bizim çalışmamız yukarıdaki çalışmaların sonuçları ile uygunluk göstermektedir. Bu sonuçların aksine, Piperine'nin (Karekar vd. 1996) ve Annatto'nun fare kemik iliği hücrelerinde (Alves de Lima vd. 2003), LFO'nun erkek F344 sıçanlarında kemik iliği ve periferik kan yönteminde (Nakagawa vd. 2008), Ethoxyquin tuzlarının insan lenfositlerinde (Błaszcyk ve Skolimowski, 2007) MN oluşumuna neden olmadığı gösterilmiştir.

Renner ve Wever'e göre (1983), gıda katkı maddesi olarak kullanılan Sodyum metabisülfid, tek oral dozda verildiğinde fare kemik iliği hücrelerinde KA, KKD ve MN oluşumuna neden olmamış; Rencüzoğulları vd.'ne göre (2001b), insan lenfositlerinde uyguladıkları tüm konsantrasyonlarda KA ve KKD'ne neden olmuş, RI ve MI'i azaltmış; Kayraldız ve Topaktaş'a göre (2007) ise, sıçan kemik iliği hücrelerinde intraperitoneal muamele gavaj muameleden daha etkili sonuçlar göstermiştir. Bizim çalışmamızda da gıda katkı maddesi olarak kullanılan Delvosid, uygulanan konsantrasyonlarda KA'una neden olmamış ancak aynı konsantrasyonlar MN frekansını arttırmıştır. Sonuçlarımıza göre, konsantrasyon artışına bağlı olarak KA sayısında artış görülmekte, bu nedenle de çalışmamızda kullandıklarımızdan daha yüksek konsantrasyonların, KA yönteminde fare kemik iliği hücreleri için genotoksik etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Kullanılan aynı kimyasal madde, farklı test

sistemlerinde farklı sonuçlar verebilir. Bu da bizim çalışmamızı destekler niteliktedir. Doz seviyelerindeki, örnekleme zamanlarındaki, muamele şekli ve kullanılan materyaldeki farklılık, farklı sonuçların gözlenmesine neden olabilir.

Çalışmamızda KA yönteminde 6, 12 ve 24 saatlik; MN yönteminde ise 24, 48 ve 72 saatlik muamele süreleri kullanıldığı için, KA ile MN frekansları arasındaki ilişki, sadece 24 saatlik muamelede karşılaştırılmıştır. Dişi farelerde, konsantrasyon-KA, konsantrasyon-MNPCE, konsantrasyon-PCE/NCE arasında, KA ile MNPCE ve KA ile PCE/NCE arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Ancak KA yönteminde toksisiteyi izlemek için kullanılan MI ile, MN yönteminde toksisite belirleyicisi olarak kullanılan PCE/NCE oranı arasında anlamlı bir ilişki (Pearson korelasyon testi $p=0,05$) bulunmuştur. Erkek farelerde de konsantrasyon-KA, konsantrasyon-MNPCE arasında, KA ile MNPCE ve KA ile PCE/NCE arasında anlamlı bir ilişki bulunmazken, PCE/NCE oranının konsantrasyona bağlı olarak azaldığı ve MI ile PCE/NCE oranı arasında da anlamlı bir ilişki olduğu (Pearson korelasyon testi $p=0,05$) belirlenmiştir. PCE/NCE oranı, toksisitenin belirleyicisi olarak kabul edilir (Sharma, 1998); Suzuki vd. (1989) göre; PCE/NCE oranındaki azalma, eritropoesisteki değişikliklere ya da kemik iliği sitotoksitesine neden olan mutajenin belirleyicisi olarak kullanılır (Çelik vd. 2003). Von Ledebur ve Schmid (1973), Jenssen ve Ramel (1978), Salamone ve Heddle'nin (1983) bildirimlerine göre; bu parametrenin ölçümü, pozitif bir kimyasalın hücre siklusundaki spesifik hareketi hakkında bilgi edinilmesinde yararlıdır (Aaron vd., 1989). Fujie vd. göre (1990), kemik iliği hücrelerinin çoğalmasını inhibe eden kimyasallar ile muameleden sonra PCE/NCE oranında azalma meydana gelir (Badr vd. 2002).

Çalışmamızda kullanılan Delvosid, fare kemik iliği hücrelerinde 24 saat muamelede KA yönteminde dişi ve erkek farelerde tüm konsantrasyonlarda MI değerlerini, MN yönteminde dişilerde 800 mg/kg konsantrasyonda, erkeklerde ise tüm konsantrasyonlarda PCE/NCE oranını anlamlı azaltmıştır. Bu sonuçlar Delvosid'in fare kemik iliğinde hücre çoğalmasını inhibe ettiğini ve sitotoksik olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda, Delvosid uygulanan konsantrasyonlarda anlamlı KA oluşumuna neden olmadığı halde, anlamlı MN indüksiyonuna neden olmuştur. MN oluşumu, klastojenik ya da aneujenik etkiler sebebiyle gözlenebilir. Ancak KA yönteminde uygulanan konsantrasyonlarda klastojenik etkinin görülmemesi, meydana gelen MN

oluşumlarının Delvosid'in aneujenik etkisinden kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. Aneujenik etkili kimyasallar DNA üzerinde hasar yapmazlar ama iğ oluşumunu etkileyerek ya da sentromer bölünme hatalarına neden olarak non-disjunction'dan dolayı kalgın kromozomların ortaya çıkmasına neden olurlar. Bu iki in vivo yöntem arasındaki farklılığın, MN yönteminde Delvosid'in aneujenik etkisi sonucu non-disjunction'a neden olmasından dolayı meydana gelmiş olabileceği düşünülmektedir. Daha yüksek konsantrasyonlarda ve daha ileri çalışmalarla Delvosid'in klastojenik veya aneujenik etkileri araştırılabilir.

Sperm aberasyon yönteminde, sperm morfolojisi, kanserojen ya da mutajenlerin belirlenmesinde kullanılır (Ieradi vd. 2003). Genetik hasar, nesilden nesile geçtiğinden dolayı, germ hücreleri üzerine genotoksik etkilerin çalışılması için sperm aberasyon yöntemi uygun bir yöntemdir (Wyrobek ve Bruce, 1975). Çalışmamızda Delvosid'in germ hücreleri üzerine olan genotoksik etkileri de bu yöntem ile araştırılmıştır.

Sperm aberasyon yönteminden elde edilen veriler incelendiğinde, Delvosid ile muamele edilen tüm konsantrasyonlarda anormal sperm yüzdesinde anlamlı bir artış görülmüştür. Anormal sperm frekansındaki artış, kimyasalın erkek germ hücrelerinin farklılaşmasında etkili olduğunu ve bu kimyasalın germ hücre mutajeni olduğunu düşündürmektedir.

Gıda katkı maddesi olarak kullanılan Eritrosin'in farelerde (Abdel Aziz vd. 1997) anormal sperm artışına neden olduğu, Borik asit'in sıçanlarda üreme ve fertilitiyi olumsuz biçimde etkilediği (Heindel vd. 1997), Propil paraben'in hormonal sekresyonu ve erkek üreme fonksiyonlarını etkilediği (Oishi, 2002) gösterilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar bu araştırmacıların sonuçları ile uygunluk göstermektedir. Bunların aksine Meier vd.'nin 1985, Uluslar arası Kanser Araştırma Ajansı'nın (IARC) 1991 yıllarında yapmış oldukları çalışmalarda Sodyum klorit farelerde, sperm anormallik testleri ile negatif sonuçlar vermiştir (WHO, 2008).

Anormal sperm frekansındaki artışın nedeni olarak, kesin olmamakla birlikte, çeşitli görüşler vardır: Anormal sperm sayısındaki artış, fertilitenin azalmasıyla ilişkili olabilir. Ya farklılaşma sırasında kendiliğinden meydana gelen hatalar sonucunda ya da anormal kromozomların sonucunda oluşmuş olabilir (Bruce vd. 1974). Ayrıca Krzanowska'nın 1976'da, Styryna vd.'nin 1991'deki bildirimlerine göre; sperm başı anormalliklerinin total yüzdelerinin belirlenmesinde Y kromozomu da önemli bir role

sahiptir (Amer ve Aly, 2001). Sperm başına ait özellikler, otozomlarda taşınır ve sperm anormallik testi bu ajanları belirler. Topham'ın 1980 yılındaki çalışmasına göre, bu ajanlar testiküler DNA'da küçük değişikliklere neden olurlar (Giri vd. 2002). Chauhan vd. (2000), dış faktörlerin, germ hücrelerinde birikerek, öncelikle nokta mutasyonları aracılığıyla sperm morfolojisinde değişikliklere neden olabileceklerini bildirmişlerdir (Narayana vd. 2002).

Kemik iliği ve spermatogenik doku, mitotik hücre bakımından zengindir, kemik iliği ve sperm morfoloji testleri güvenilir sonuçlar elde edilmesini sağlar (Wang vd. 1998). Wyrobek ve Bruce (1978), Hemavathi ve Rahiman (1993), Jayashree vd. (1994) ve Chauhan vd.'nin (2000) bildirimlerine göre, fare kemik iliğinde sitotoksik etkilere ve MN oluşumuna neden olan bazı kimyasallar, spermlerde morfolojik anormalliklere neden olur (Giri vd. 2002). Çalışmamızda, KA yönteminde toksisite belirleyicisi olan MI ile sperm aberasyon yöntemindeki anormal sperm yüzdesi arasında 6, 12 ve 24 muamelede anlamlı ilişki vardır. Aynı ilişki 24 saat muamelede, MN yönteminde toksisiteyi incelemek için kullanılan PCE/NCE oranı ile anormal sperm yüzdesi arasında da gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, Delvosid, hücre siklusu ilerleyişini inhibe ettiği için toksik, sperm aberasyon frekansını arttırdığı için de etkili bir gem hücre mutajenidir.

Desjardins'e (1985), Herbert vd.'ne (1995) göre, erkek üreme sisteminin gelişimi ve spermatogenez testosteron tarafından kontrol edilir (Oishi, 2002). Epididimal sperm olgunlaşması için, testosteron hormonu gereklidir. Hormon seviyesindeki azalma, epididimis ve sperm fonksiyonlarının değişmesine neden olabilir. Başka bir mekanizma da, epididimiste direkt sperm toksisitesinin meydana gelmiş olmasıdır (Ono vd. 1999). Epididimis, sperm olgunlaşması için önemli bir organdır. Spermin olgunlaşması sırasında, sperm baş ve kuyruğu yapısal özelliklerini (Calvin ve Bedford, 1971), hareketliliğini (Hoskins vd. 1978) ve fertilité yeteneğini (Yanagimachi, 1988; Miller vd., 1996) kazanır (Ono vd. 1999).

Çalışmamızda serum testosteron düzeylerinin 6, 12 ve 24 saat muamelede 400 ve 800 mg/kg konsantrasyonlarda azaldığı görülmüştür. Testosteron düzeyinin azalması, anormal sperm yüzdesinin artmasıyla birlikte görülmüştür. Bu sonuçlara göre, çalışmamızda uygulanan konsantrasyonlarda Delvosid, anormal sperm frekansında artışa, serum testosteron düzeyinde azalmaya neden olmuş, bunun sonucunda erkek

üreme sisteminde fonksiyon ve gelişim bozuklukları ortaya çıkmıştır. Gıda katkı maddesi olarak kullanılan Propilparaben'in (Oishi, 2002), Butilparaben'in (Oishi, 2001), Bütillenmiş hidroksianizol'un (Jeong vd. 2005) sıçanlarla yapılan çalışmalarında, testosteron seviyesini azalttıkları bildirilmiştir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar, bu araştırmacıların sonuçları ile uygunluk göstermektedir.

Kimyasal maddelerin canlılara olan etkilerini incelemekte kullanılan bir diğer analiz de, enzimler üzerine olan etkilerini belirlemektir. Enzimler, biyolojik katalizörler olduklarından metabolik işlemde önemli role sahiptirler. Anormal enzim seviyeleri değişik hastalıkların belirleyicisi olabilirler.

Çalışmamızda dişi farelerde LDH'nin 6, 12 ve 24 saat muamele süresinde 800 mg/kg konsantrasyonlarında azaldığı, ALT'nin 6 saatte 400 ve 800 mg/kg, 12 saatte 800 mg/kg konsantrasyonlarda arttığı gözlenmiştir. Erkek farelerde ise, ALT'nin 6 saatte 400 ve 800 mg/kg konsantrasyonlarında arttığı, ALP'nin 24 saatte tüm konsantrasyonlarda azaldığı saptanmıştır. Bunların dışında kalan muamele süre ve konsantrasyonlardaki veriler anlamlı değildir. Bu sonuçlara göre, Delvosid, büyük oranda olmasa bile karaciğerde dejeneratif bozukluklara neden olmuş olabilir. Bunun sonucunda karaciğerin harabiyeti sebebiyle kana salınan enzim seviyelerinde değişiklikler meydana gelmiş olabilir. Wieriks, natamisin süspansiyonu ile muamele edilmiş besinlerle beslediği sıçanlarla 1966 ve 1971 yıllarında yapmış olduğu çalışmalarda, Natamisin karaciğer enzimlerinde etkili değildir (WHO, 2006). Gıda katkı maddesi olan sitrik asit, farelerde LDH, AST ve ALT aktivitelerinde (Aktaş vd. 2003) değişikliğe neden olmadığı, sıçanlarla yapılan çalışmalarda, Sodyum benzoat'ın AST ve ALP değerlerini (Ibekwe vd. 2007), Sodyum nitrit'in ALT, AST, ALP ve LDH aktivitelerini yükselttiği (Helal ve Elsaid, 2006) bildirilmiştir. Sonuçlar arasındaki bu farklılıkların kullanılan kimyasal maddeden, hayvanların metabolizmalarında meydana gelebilecek farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızdan elde edilen verilere göre, Delvosid fare kemik iliği hücrelerinde KA'larına neden olmadığından klastojenik değildir, ancak MN oluşumunu indüklediği için aneujenik olarak kabul edilebilir. Delvosid, anormal sperm sayısında artışa, total testosteron seviyesinde azalmaya neden olduğundan etkili bir germ hücre mutajenidir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, Delvosid, MI ve PCE/NCE oranlarını azalttığından sitotoksik etki göstermiştir. Anormallikler en çok 24 saatlik muamelede

800 mg/kg konsantrasyonda görüldüğünden, Delvosid gıda katkı maddesi olarak yüksek konsantrasyonlarda kullanılmamalıdır. İnsan sağlığı için gıda katkı maddesi içeren besinlerin tüketimi önemlidir. Bu besinlerin sağlığa zarar vermeyecek sınırlarda kullanılmasına dikkat edilmelidir.

KAYNAKLAR

Aaron, CS, Sorg, R, Zimmer, D, 1989, "The Mouse bone marrow micronucleus test: Evaluation of 21 drug candidates" *Mutation Research*, 223, 129-140.

Abdel Aziz, AH, Shouman, SA, Attia, AS, Saad, SF, 1997, "A study on the reproductive toxicity of erythrosine (Red No. 3) in male mice" *Pharmacol Res*, 35, 5, 457-462.

Abe, S, Sasaki, M, 1977, "Chromosome aberrations and sisterS chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals" *J Natl Cancer Inst*, 58, 1635-1643.

Abilev, SK, Liubimova, IK, Migachev, GI, 1993, "Effect of structural features of nitro-derivatives of fluorenone and biphenyl on frameshift mutagenesis in tester strains of *Salmonella typhimurium*" *Genetika*, 29,10, 1640-1645.

Acar, H, Çalışkan, U, Demirel, S, Largaespada, DA, 2001, "Micronucleus incidence and their chromosomal origin related to therapy in acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients: detection by micronucleus and FISH techniques" *Teratog Carcinog Mutagen*, 21, 5, 341-347.

Akın, A, Sümer, S, 1991, "The mutagenic effects of sodium nitrite and monosodium glutamate used as food additives demonstrated by the *Salmonella* microsome test system" *Microbiol Bul*, 25, 94-107.

Akın, G, Pekgöz, E, Gökhan, H, 1992, "Karaciğer" *Tertip matbaası*, 90.

Akiyama, SI, Hidaka, K, Komiyama, S, Kuwana, M, 1979, "Control of permeation of bleomycin A2 by polyene antibiotics in cultured Chinese hamster cells" *Cancer Res*, 39, 5150-5154.

Akiyama, S, Tabuki, T, Kaneko, M, Komiyama, S, Kuwano, M, 1980, "Classification of polyene antibiotics according to their synergistic effect in combination with bleomycin A2 or fusidic acid" *Antimicrob Agents Chemother*, 18, 226-230.

Aktaş, T, Kaboğlu, A, Bakar, E, Karakaş, H, 2003, "The short-terms effects of single toxic dose of citric acid in mice" *Journal of Cell and Molecular Biology*, 2, 19-23.

Alves de Lima, RO, Azevedo, L, Ribeiro, LR, Salvadon, DMF, 2003, "Study on the mutagenicity and antimutagenicity of a natural food colour (annatto) in mouse bone marrow cells", *Food and Chemical Toxicology*, 41, 2, 189-192.

Amer, SM, Aly, FAE, 2001, "Genotoxic effect of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and its metabolite 2,4-dichlorophenol in mouse" *Mutation Research*, 494, 1-12.

Amorim, MIM, Mergler, D, Bahia, MO, Dubeau, HM, Miranda, DC, Level, J, Burbano, RR, Lucotte, M, 2000, "Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon" *An Acad Bras Cienc*, 72, 487-507.

Anand, MJ, Mithilesh, KB, 2002, "Mutagenic profiles of carbazole in the male germ cells of Swiss albino mice" *Mutation Research*, 500, 97-101.

Aras, K, Ersen, G, 1992, "Klinik Biyokimya" Tas Kitapçılık Ltd. Şti. 338.

Ardito, G, Bramanti, B, Bigatti, P, Lamberti, L, Dolara, P, 1996, "Cytogenetic effect of thiabendazole and diphenylamine on cultured human lymphocytes: Sister chromatid exchanges and cell cycle delay" *Ball Soc Ital Biol Sper*, 72, 5-6, 171-178.

Arslan, M, 2004, "Borik Asit'in insan periferal lenfositlerinde in vitro kromozom aberasyonu ve kardeş kromatid değişimi üzerindeki etkileri" Yüksek Lisans Tezi, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Adana.

Auerbach, C, 1943, "*Drosophila melanogaster*, new mutants chemically induced mutations rearrangements" *Dros Inf Serv*, 17,48-50.

Badr, FM, Imam, SA, Abdel-Halim, H, Shalaby, IM, 2002, "Mutagenicity of nicotine in *Schistosoma mansoni* – infected mice" *Egyptian Journal of Biology*, 4, 95-108.

Basler, A, Von Der Hude, W, Schetwinkel, M, 1987, "Screening of the food additive propionic acid for genotoxic properties" *Food Chem Toxicol*, 25, 4, 287-290.

Błaszczyk, A, Osiecka, R, Skolimowski, J, 2003, "Induction of chromosome aberrations in cultured human lymphocytes treated with ethoxyquin" *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 542, 1-2, 117-128.

Błaszczyk, A, Skolimowski, J, 2006, "Comparative analysis of cytotoxic, genotoxic and antioxidant effects of 2,2,4,7-tetramethyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline and ethoxyquin on human lymphocytes" *Chemico-Biological Interactions*, 162, 1, 70-80.

Błaszczyk, A, Skolimowski, J, 2007, "Preparation of ethoxyquin salts and their genotoxic and antioxidant effects on human lymphocytes" *Arkivoc*, 217-229.

Bolard, J, Legrand, P, Heitz, F, Cybulska, B, 1991, "One-sided action of amphotericinB on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium" *Biochemistry*, 30, 5707-5715.

Boller, K, Schmid, W, 1970, "Chemical mutagenesis in mammals. The Chinese hamster bone marrow as an in vivo test system. Hematological findings after treatment with trenimon" *Humangenetik*, 11, 35-54.

Boyd, JW, 1988, "Serum enzymes in the diagnosis of disease of in man and animals" *J Comp Path*, 98, 381-404.

Briggs, DR, 1997, "Food Additives" Wahlgvist ML(Ed), Food and Nutrition. Allen & Unwin Pty Ltd. Australia.

Brinkworth, MH, Anderson, D, Gangolli, SD, 1987, "Correlation of raised level of abnormal sperm morphology with electrophoretic sperm protein changes" Mutation Research, 2, 306.

Brooks, DE, Andrew, SE, Dillavou, CL, Ellis, G, Kubilis, PS, 1998, "Antimicrobial susceptibility patterns of fungi isolated from horses with ulcerative keratomycosis" Am J Vet Res, 59, 138-142.

Brothers, AM, Wyatt, RD, 2000, "The antifungal activity of natamycin toward molds isolated from commercially manufactured poultry feed" Avian Diseases, 44, 490-497.

Bruce, WR, Furrer, R, Wyrobek, AJ, 1974, "Abnormalities in the shape of murine sperm after acute testicular X-irradiation" Mutation Research, 23, 381-386.

Bruce, W, Heddle, J, 1979, "The mutagenicity of 61 agents as determined by the micronucleus, *Salmonella* and sperm abnormality assays" Can J Cytol Genet, 21, 319-334.

CAC, 1992, "Codex Alimentarius-General Requiriments" FAO-WHO, Rome, 1-2, 49-89.

Calvin, HI, Bedford, JM, 1971, "Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis" J Reprod Fertil Suppl, 13, 65-75.

Carballo, MA, Hick, AS, Soloneski, S, Larramendy, ML, Mudry, MD, 2006 "Genotoxic and aneugenic properties of an imidazole derivative" Journal of Applied Toxicology, 26,4, 293-300.

Carlile, MJ, Watkinson, SC, 1994, "Fungal cells and vegetative growth" In: The Fungi, San Diego, CA: Academic Press, 148.

Chauhan, LKS, Pant, N, Gupta, SK, Srivastava, SP, 2000, "Induction of chromosome aberrations, micronucleus formation and sperm abnormalities in mouse following carbofuran exposure" Mutation Research, 465, 123-129.

Cole, RJ, Taylor, NA, Cole, J, Arlett, CF, 1979, "Transplacental effects of chemical mutagens detected by the micronucleus test" Nature (London), 277, 317-318.

Cole, RJ, Taylor, NA, Cole, J, Arlett, CF, 1981, "Short terms tests for transplacentally active carcinogens. I. Micronucleus formation in fetal and maternal mouse erythroblasts" Mutation Research, 80, 141-157.

Cox, GE, Bailey, DE, Morgareidge, K, 1973, Unpublished report No. 1-1052 submitted to WHO by Food and Drug Research Laboratories Inc.

Clode, SA, Anderson, D, 1988, "Germ and somatic cell abnormalities following in vivo administration of thymidine and adenine" *Mutation Research*, 200, 249–354.

Czeizel, AE, Kazy, Z, Vargha, P, 2003, "A case-control teratological study of vaginal natamycin treatment during pregnancy" *Reproductive Toxicology*, 17, 4, 387-391.

Çelik, A, Mazmancı, B, Çamlıca, Y, Aşkın, A, Çömelekoğlu, Ü, 2003, "Cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on Wistar rat bone marrow" *Mutation Research*, 539, 91-97.

Deacon, JW, 1997, "Prevention and control of fungal growth" In: *Modern Mycology*, 3rd Ed., Oxford: Blackwell Science, 289–290.

Delescluse, C, Ledirac, N, Li, R, Piechocki, MP, Hines, RN, Gidrol, X, Rahmani, R, 2001, "Induction of cytochrome P450 1A1 gene expression, oxidative stress, and genotoxicity by carbaryl and thiabendazole in transfected human HepG2 and lymphoblastoid cells" *Biochem Pharmacol*, 61, 4, 399-407.

Demir, İ, 1986, "Genetik" Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, 263-231.

Demirel, S, Zamani, AG, 2002, "Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları" *Genel Tıp Derg*, 12, 3, 123-127.

Desjardins, C, 1985, "Morphological, physiological and biochemical aspects of male reproduction" In: Dixon, RL, *Reproductive Toxicology*, Raven Press, New York, 131-146.

Dönbak, L, Rencüzoğulları, E, Topaktaş, M, 2002, "The cytogenetic effects of the food additive boric acid in *Allium cepa* L." *Cytologia*, 67, 153-157.

EC, 1995, "European Parliament and Council Directive No: 95/2/EC" *Official Journal of the European Communities*, No: L 61, 40.

EEC, 1984, "Directive 79/831 Part B: Methods for the determination of toxicity. B.12. Other effects, Mutagenicity, Micronucleus test" L251, 137-139.

Elliott, P, 1979, "Therapeutic evaluation of Elase as adjunctive therapy in the treatment of monilial vaginitis" *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, 19, 56-58.

EMA, 1998, "Committee for Veterinary Medicinal Products" The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines Evaluation Unit, EMA/MRL/342/98-FINAL.

Eastmond, DA, Tucker, JD, 1989, "Identification aneuploidy inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody" *Environ Mol Mutagen*, 13, 34-43.

Fenech, M, Morley, AA, 1985, "Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay" *Cytobios*, 43, 233-246.

Fenech, M, Morley, AA, 1986, "Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of in vivo ageing and dose X-irradiation" *Mutation Research*, 161, 193-198.

Fenech, M, Holland, N, Chang, WP, Zeiger, E, Bonassi, S, 1999, "The human micronucleus Project-an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans" *Mutation Research*, 428, 271-283.

Ferrand, C, Marc, F, Fritsch, P, Cossand, P, De Saint Blanguat, G, 2000a, "Mutagenicity and genotoxicity of sorbic acid" *Toxicol In Vitro*, 14, 5, 423-428.

Ferrand, C, Marc, F, Fritsch, P, Cossand, P, De Saint Blanguat, G, 2000b, "Chemical and toxicological studies of products resulting from sorbic acid and methylamine interaction in food condition" *Amino Acids*, 18, 3, 251-263.

Ferrand, C, Marc, F, Fritsch, P, Cossand, P, De Saint Blanguat, G, 2000c, "Genotoxicity study of reaction products of sorbic acid" *J Agric Food Chem*, 48, 8, 3605-3610.

Fisher, PB, Bryson, V, Schaffner, CP, 1979, "Polyene macrolide antibiotic cytotoxicity and membrane permeability alterations. II. Phenotypic expression in intraspecific and interspecific somatic cell hybrids" *J Cell Physiol*, 100, 335-342.

Food Additives, 1997, <http://biorganic.ifrance.com/biorganic/additives.htm>

Franklin, TJ, Snow, GA, 1998, "Antiseptics, antibiotics and the cell membrane" In: *Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial Drug Action*, 5th Ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 55-56.

Fujie, K, Nishi, J, Wada, M, Maeda, S, Sugiyama, T, 1990, "Acute cytogenetic effects of tyramine and MTCA on mouse bone marrow cells in vivo by the micronucleus test" *Mutation Research*, 240, 19-23.

Gardner, EJ, Simmons, MJ, Snustad, DD, 1991, "Principles of genetics" John Wiley and Sanos, Inc, 301-317.

Giri, S, Prasad, SB, Giri, A, Sharma, GD, 2002, "Genotoxic effects of malathion: an organophosphorus insecticide, using three mammalian bioassays in vivo" *Mutation Research*, 514, 223-231.

Glatt, H, Anklam, E, Robertson, LW, 1992, "Biphenyl and fluorinated derivatives: liver enzyme-mediated mutagenicity detected in *Salmonella typhimurium* and Chinese hamster V79 cells" *Mutation Research*, 281, 3, 151-156.

Gollapudi, BB, McClintock, ML, Linscombe, VA, Sinha, AK, 1984, "Evaluation of the effect of food deprivation on micronucleus test results" *Toxicol Lett*, 21, 353-356.

Gömürgen, AN, 2005, "Cytological Effect of the Potassium Metabisulphite and Potassium Nitrate Food Preservative on Root Tips of *Allium cepa* L." *Cytologia*, 70, 119-128.

Gözükara, EM, 1990, "Biyokimya" Ankara, Repromat Ltd. şti., 710.

Griffin, DA, 1994, "Fungicides" In: *Fungal Physiology*, 2nd Ed., New York: Wiley-Liss, Inc., 416–417.

Grupper, C, 1961, Personal communication from the Hôpital Saint-Louis, Paris.

Grupper, C, 1964, "Pimaricin in the treatment of superficial mucocutaneous monoliasis" In: *Proceedings of the International Congress on Tropical Dermatoses*, Naples, June 1964.

Guyton, AC ve Hall, JE, 2007, "Tıbbi Fizyoloji" Nobel Tıp Kitapevleri, 11.

Güneşli, A, 2000, "Bazı gıda boyalarının toksikolojik etkileri" Seminer, A.Ü. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı.

Hamilton-Miller, JMT, 1974, "Fungal sterols and the mode of action of the polyene antibiotics" In: Perlman, D., ed., *Advances in Applied Microbiology*, New York: Academic Press, 109–134.

Hammarström, L, Smith, CI, 1977, "In vitro activating properties of polyene antibiotics for murine lymphocytes" *Acta Pathol Microbiol Scand*, 85C, 277-283.

Hart, JW, Hartley-Asp, B, 1983, "Introduction of micronuclei in the mouse. Revised timing of the final stage of erythropoiesis" *Mutation Research*, 120, 127-132.

Hasegawa, MM, Nishi, Y, Ohkawa, Y, Inui, N, 1984, "Effects of sorbic acid and its salts on chromosome aberrations, sisterchromatid exchanges and gene mutations in cultured Chinese hamster cells" *Food Chem Toxicol*, 22, 501-507.

Hayashi, M, Morita, T, Kodama, Y, Sofuni, T, Ishidate, MJr, 1990, "The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides" *Mutation Research*, 245, 245–249.

Hayashi, M, Ueda, T, Uyeno, K, Wada, K, Kinae, N, Saotome, K, Tanaka, N, Takai, A, Sasaki, YF, Asano, N, Sofuni, T, Ojima, Y, 1998, "Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms" *Mutation Research*, 399, 125–133.

Heddle, JA, 1973, "A rapid *in vivo* test for chromosomal damage" *Mutation Research*, 18, 187–190.

- Heddle, JA, Countryman, RI, 1976, "The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes" *Mutation Research*, 41, 321-332.
- Heddle, JA, Hite, M, Kirkhart, B, Mavournin, K, MacGregor, JT, Newell, GW, Salamone, MF, 1983, "The induction of micronuclei as measure of genotoxicity" A report of the U.S.Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mut Res*, 123, 61-118.
- Heindel, J, Fail, P, George, J, Grizzle, T, 1997, "Reproduction toxicology of boric acid" *Environ Helth Perspect*, 105, 275-276.
- Helal, EGE, Elsaid, FGG, 2006, "Management the Action of Sodium Nitrite on Albino Rats by Aqueous Garlic Extract" *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 1, 3, 85-89.
- Hemavathi, E, Rahiman, MA, 1993, "Toxicological effects of ziram, thiram and dithane M-45 assessed by sperm shape abnormalities in mice" *J Toxicol Environ Health*, 38, 393-398.
- Herbert, DC, Supakar, PC, Roy, AK, 1995, "Male reproduction" In:Witorsch, RL, *Reproductive Toxicology*, second ed, Raven Press, New York, 3-21.
- Holley, RA, 1981, "Prevention of surface mold growth on Italian dry sausage by natamycin and potassium sorbate" *Appl Environ Microbiol*, 41, 422-429.
- Horváthová, E, Slamenová, D, Bonatti, S, Abbondandolo, A, 1999, "Reduction of genotoxic effects of MNNG by butylated hydroxyanisole" *Neoplasma*, 46, 6, 356-62.
- Hoskins, DD, Brandt, H, Acott, TS, 1978, " Initiation of sperm motility in the mammalian epididymis" *Fed Proc*, 37, 2534-2542.
- Högstedt, B, Karlsson, A, 1985, "The size of micronuclei in human lymphocytes varies according to inducing agent used" *Mutation Research*, 156, 229-232.
- Hubbard, SA, 1998, "Comporative toxicology of borates" *Biol Trace Elem Res*, 66, 1-3, 343-335.
- IARC, International Agency for Research on Cancer, 1991, "Sodium chlorite. In: Chlorinated drinkingwater; chlorination by-products; some other compounds; cobalt and cobalt compounds" Lyon, France, International Agency for Research on Cancer, pp. 145-158 (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 52).
- Ibekwe, SE, Uwakwe, AA, Monanu, MO, 2007, "*In vivo* effects of sodium benzoate on plasma aspartate amino transferase and alkaline phosphatase of wistar albino rats" *Scientific Research and Essay*, 2, 1, 10-12.

Ieradi, LA, Zima, J, Allegra, F, Kotlanova, E, Campanella, L, Grossi, R, Cristaldi, M, 2003, "Evaluation of genotoxic damage in wild rodents from a polluted area in the Czech Republic" *Folia Zool*, 52, 1, 57-66.

Irez, T, Kucur, M, İşman, FK, 2007, "Androloji Laboratuvarı El Kitabı" Nobel Tıp Kitapevleri, 1-8.

Ishidate, MJr, Odashima, S, 1977, "Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro a screening for chemical carcinogens" *Mutation Research*, 48, 337-353.

Ishidate, MJr, Sofuni, T, Yoshikawa, K, Hayashi, M, Nohmi, T, Sawada, M, Matsuoka, A, 1984, "Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan" *Food Chem Toxicol*, 22, 623-636.

Jay, JM, 1996, "Modern Food Microbiology" 5th Ed., New York: Chapman&Hall, 293-294.

Jayashree, IV, Vijayalaxmi, KK, Abdul Rahim, A, 1994, "The genotoxicity of Hinonon, an organophosphorous pesticide in the in vivo mouse" *Mutation Research*, 322, 77-85.

Jenkins, JB, 1975, "Genetics" Houghton Mifflin Company Boston, 352-400.

Jenssen, D, Ramel, C, 1978, "Factors affecting the induction of micronuclei at low doses of X-rays, MMS and dimethylnitrosamine in mouse erythroblasts" *Mutation Research*, 58, 51-65.

Jeong, SH, Kim, BY, Kang, HG, Ku, HO, Cho, JH, 2005, "Effects of butylated hydroxyanisole on the development and functions of reproductive system in rats" *Toxicology*, 208, 1, 49-62.

Jung, R, Cojocel, C, Müller, W, Battger, D, Luck, E, 1992, "Evaluation of the genotoxic potential of sorbic acid and potassium sorbate" *Food Chem Toxicol*, 30, 1, 1-7.

Karayılanoğlu, T, Demirci, D, Karayılanoğlu, V, 1991, "Kronik alkoliklerde bazı biyokimyasal parametrelerin değerlendirilmesi" *Biyokimya dergisi*, XV, 3, 51-56.

Karekar, VR, Mujumdar, AM, Joshi, SS, Dhuley, J, Shinde, SL, Ghaskadbi, S, 1996, "Assessment of genotoxic effect of piperine using *Salmonella typhimurium* and somatic and germ cells of Swiss albino mice" *Arzneimittelforschung*, 46, 10, 972-975.

Kaya, FF, Topaktaş, M, 2007, "Genotoxic effects of potassium bromate on human peripheral lymphocytes in vitro" *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 626, 1-2, 48-52.

Kayraldız, A, 2005, "Sodyum Metabisülfit'in sıçan kemik iliği hücrelerinde in vivo genotoksik etkileri" Doktora Tezi, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Adana.

Kayraldız, A, Kaya, FF, Canımoğlu, S, Rencüzoğulları, E, 2006, "Mutagenicity of five food additives in Ames/Salmonella/Microsome test" *Annals of Microbiology*, 56, 129-133.

Kayraldız, A, Topaktaş, M, 2007, "The in vivo genotoxic effects of sodium metabisulfite in bone marrow cells of rats" *Russian Journal of Genetics*, 43, 8, 905-909.

Kirsch-Volders, M, Sofuni, T, Aardema, M, Albertini, S, Eastmond, D, Fenech, M, Ishidate, JM, Kirchner, S, Lorge, E, Morita, T, Norppa, H, Surrales, J, Vanhauwaert, A, Wakata, A, 2003, "Report from the in vitro micronucleus assay working group" *Mutation Research*, 540, 153-163.

Kitano, K, Fukukawa, T, Ohtsuji, Y, Masude, T, Yamaguchi, H, 2002, "Mutagenicity and DNA-damaging activity caused by decomposed products of potassium sorbate reacting with ascorbic acid in the presence of Fe salt" *Food Chem Toxicol*, 40, 11, 1589-1594.

Kowalski, RP, Sundar Raj, CV, Stuart, JC, Dunn, DS, 1985, "Antifungal synergism. A proposed dosage for corneal storage medium" *Arch Ophthalmol*, 103, 250-256.

Krzanowska, H, 1976, "Inheritance of sperm head abnormality types in mice and the role of the Y chromosome" *Genet Res*, 28, 189-198.

Kuru, M, Gözükara, SE, 2001, "Genetik" *Palme Yayıncılık*, Ankara, 360 s.

Küçükyurt, Y, Aker, A, Atalay, A, 1990, "Dietilnitrosaminin farelerde serum ve karaciğer total protein, albümin degerleri ile asit ve alkali fosfataz aktivitelere etkisi" *CU Tıp Fak Dergisi*, 12, 2, 207-220.

Levinskas, GJ, Shaffer, CB, Bushey, C, Kinde, ML, Stackhouse, DW, Vidone, LB, 1963, "Two-year feeding to rats" Unpublished report from the Central Medical Department, American Cyanamid Co. Submitted to WHO by Food and Drug Research Laboratories Inc.

Levinskas, GJ, Ribelin, WE, Shaffer, CB, 1966, "Acute and chronic toxicity of pimaricin" *Toxicol. Appl. Pharmacol*, 8, 97-109.

Liewen, MB, Marth, EH, 1985, "Evaluation of 1,3-pentadiene for mutagenicity by the salmonella/mammalian microsome assay" *Mutation Research*, 157, 1, 49-52.

Lindena, J, Sommerfeld, U, Hapfel, C, Trauschold, I, 1986, "Catalytic enzymes activity concentration in tissue of man, dog, rabbit, guinea pig, rat and mouse" *J Clin Chem Clin Biochem*, 24: 34-47.

Lu, B, Wu, X, Tie, X, Zhang, Y, Zhang Y, 2005, "Toxicology and safety of anti-oxidant of bamboo leaves. Part 1: Acute and subchronic toxicity studies on anti-oxidant of bamboo leaves" *Food and Chemical Toxicology*, 43, 783-792.

Luca, D, Luca, V, Cotor, F, Raileanu, L, 1987, "In vivo and in vitro cytogenetic damage induced by sodium nitrite" *Mutation Research*, 189, 3, 333-339.

MacGregor, JT, Wehr, CM, Gould, DH, 1980, "Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test" *Environ. Mutagen*, 2, 509-514.

Mahjoub, A, Bullerman, LB, 1986, "Effects of natamycin and potassium sorbate on growth and aflatoxin production in olives" *Arch Inst Pasteur Tunis*, 63, 513-525.

Mailhes, JB, Young, D, Aardema, MJ, London, SN, 1997, "Thiabendazole induced cytogenetic abnormalities in mouse oocytes" *Environ Mol Mutagen*, 29, 4, 367-371.

Malten, KE, 1967, "Report of an investigation concerning possible allergic side effects of pimaricin in humans" Unpublished report from the Instituut voor Geneeskunde en Maatschappij, Nijmegen. Submitted to WHO by Gist-Brocades NV, Delft.

Marshall, WJ, Bangert, SK, 1995, "Clinical Biochemistry" New York, Churchill Livingstone.

Mavournin, KH, Blakey, DH, Cimino, MC, Salamone, MF, Heddle, JA, 1990, "The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood" A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Research*, 239, 29-80.

Mayer, FL, Versteeg, DJ, McKee, MJ, 1992, "Physiological and Nonspecific Biomarkers; Biomarkers" Eds. Hugget et al, Lewis Pub, 5-86.

McGinnis, MR, Rinaldi, MG, 1985, "Antifungal drugs: Mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biological fluids" In: Lorian, V., ed., *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 2nd Ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 223-281.

McGregor, DB, Brawn, A, Cattonach, P, Edwards, I, Mc Bride, D, Riach, C, Csopary, WJ, 1988, "Responses of the L5178Y tk+/tk- mouse lymphoma cell forward mutation assay: III. 72 coded chemicals" *Environ Mol Mutagen*, 12, 1, 85-154.

Meier, JR, Bull, RJ, Stober, JA, Cimino, MC, 1985, "Evaluation of chemicals used for drinking water disinfection for production of chromosomal damage and sperm-head abnormalities in mice" *Environ Mutagen*, 7, 201-211.

Meng, Z, Zhang, B, 1992, "Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by sodium bisulfite" *Mutation Research*, 298, 63-69.

Mercangöz, A, Tüylü, BA, 2000, "2,4,5 tri (Süstitüe) fenil imidazol ve türevlerinin mutajenik etkilerinin Ames/Salmonella test sisteminde saptanması" *Türk J Biol*, 24, 57-64.

Miller, RK, Kellogg, CK, Saltzman, RA, 1996, "Reproductive and perinatal toxicology" In: Haley, TJ, Berndt, WO, (Eds), Toxicology, Hemisphere, Washington, 212-214.

Moore, KL, Persaud, TVN, 2002, "Klinik yönleri ile İnsan embriyolojisi" Nobel Tıp Kitapevleri, 19, 22.

Mudry, DE, Pargament, MD, 1987, "Mutagenic bioassay of certain pharmacological drugs. I. Thiabendazole(TBZ)" Mutation Research, 188, 1, 1-6.

Mukherjee, A, Giri, AK, Talukder, G, Sharma, A, 1988, "Sister chromatid exchanges and micronuclei formations induced by sorbic acid and sorbic acid-nitrite in vivo in mice" Toxicol Let, 42, 47-53.

Munzer, R, Guigas, C, Renner, HW, 1990, "Re-examination of potassium sorbate and sodium sorbate for possible genotoxic potential" Food Chem Toxicol, 28, 6, 397-401.

Murinda, SE, Rashid, KA, Roberts, R, 2003, "In vitro assessment of the cytotoxicity of nisin, pediocin and selected colicins on simian virus 40 transfected human colon and vero monkey kidney cells with trypan blue staining viability assays" J Food Prot, 66, 5, 847-853.

Murray, RK, Mayes, PA, Granner, DK, Rodwell, VW, 1993, "Harper'in Biyokimyası" Çevirenler: Prof.Dr. Gülriz Menteş, Prof.Dr. Biltan Ersöz, Barış Kitapevi.

Müler, HJ, 1927, "Artificial transmutation of the gene" Science, 66, 84-87.

Nagao, M, Honda, M, Seino, Y, Yahagi, T, Kawachi, T, 1977, "Mutagenicities of protein pyrolysates" Cancer Lett, 2, 6, 335-339.

Nair, B, 2001, "Final report on the safety assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid and Sodium Benzoate" Int J Toxicol, 3, 23-50.

Nair, B, Elmore, AR, 2003, "Final report on the safety assessment of sodium sulfite, potassium sulfite, ammonium sulfite, sodium bisulfite, ammonium bisulfite, sodium metabisulfite and potassium metabisulfite" Int J Toxicol, 2, 63-88.

Nakagawa, K, Hidaka, T, Kitano, M, Asakura, M, Kamigaito, T, Noguchi, T, Hosoe, K, 2008, "Genotoxicity studies on licorice flavonoid oil (LFO)" Food and Chemical Toxicology, 46, 7, 2525-2532.

Narayana, K, Souza, UJA, Rao, KPS, 2002, "Ribavirin-induced sperm shape abnormalities in Wistar rat" Mutation Research, 513, 193-196.

National Toxicology Program, 1987, "Toxicology and carcinogenesis studies of Boric Acid" Natl Toxicol Program Tech Rep, 324, 1-126.

Njagi, GD, Gopalan, HN, 1982, "Cytogenetic effects of the food preservatives sodium benzoate and sodium sulphite on vicia faba root meristems" *Mutation Research*, 102, 3, 213-219.

Norman, AW, Spielvogel, AM, Wong, RG, 1976, "Polyene antibiotic-sterol interaction" *Adv Lipid Res*, 14, 127-170.

Norppa, H, Renzi, L, Lindholm, C, 1993, "Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis- blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and in situ hybridization" *Mutagenesis*, 8, 519-525.

Noyan, A, 1993, "Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji" Ankara, Meteksan As.

Ogunola, OA, 1997, "Individual and combined genotoxic response of boric acid B1 in *Escherichia coli* PQ37" *East Afr Med J*, 74, 8, 499-502.

OECD, 1983, "Guideline for testing of chemicals" *Genetic Toxicology: Micronucleus test*, Document, 474, 1-6.

OECD, 2005, "Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment" No. XX, DRAFT DETAILED REVIEW PAPER ON TRANSGENIC RODENT MUTATION ASSAYS, Environment Directorate ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, Paris, 1-593.

Oishi, S, 2001, "Effects of butyl paraben on the male reproductive system in rats" *Toxicology and Industrial Health*, 17, 1, 31-39.

Oishi, S, 2002, "Effects of propyl paraben on the male reproductive system" *Food and Chemical Toxicology*, 40, 1807-1813.

Ono, A, Kawashima, K, Sekita, K, Hirose, A, Ogawa, Y, Saito, M, Naito, K, Yasuhara, K, Kaneko, T, Furuya, T, Inoue, T, Kurokawa, Y, 1999, "Toluene inhalation induced epididymal sperm dysfunction in rats" *Toxicology*, 139, 193-205.

Otubanjo, OA, Mosuro, AA, 2001, "An in vivo evaluation of induction of abnormal sperm morphology by some anthelmintic drugs in mice" *Mutation Research*, 499, 1-2, 131-138.

Pagano, DA, Zeiger, E, 1987, "Conditions affecting the mutagenicity of sodium bisulfite in *Salmonella typhimurium*" *Mutation Research*, 179, 159-166.

Peace, EB, 1998, "An investigation of chromosomal content and origin of micronuclei, Doctorate philosophy in the department of environmental health of the collage medicine" Thesis (Ph.D.), University of Cincinnati.

Peace, BE, Succop, P, 1999, "Spontaneous micronucleus frequency and age: What are normal values?" *Mutation Research*, 425, 225-230.

Philipose, B, Singh, R, Khan, KA, Giri, AK, 1997, "Comparative mutagenic and genotoxic effects of three propionic acid derivatives ibuprofen, ketoprofen and naproxen" *Mutation Research*, 393, 1-2, 123-131.

Preston, RJ, Dean, JB, Galloway, S, Holden, H, Mcfee, AF, Shelby, MD, 1987, "Mammalian in vivo cytogenetic assays-analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells" *Mutation Research*, 189, 157-165.

Rabbani, SI, Devi, K, Zahra, N, 2005, "Anti-Clastogenic Effects of Citral" *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*, 4, 28-31.

Rencüzoğulları, E, Kayraldız, A, Üla, HB, Akmak, T, Topaktaş, M, 2001a, "The cytogenetic effects of sodium metabisulfite, a food preservative in root tip cells of *Allium cepa* L." *Turk J Biol*, 25, 361-370.

Rencüzoğulları, E, Üla, HB, Kayraldız, A, Topaktaş, M, 2001b, "Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes treated with sodium metabisulfite, a food preservative" *Mutation Research*, 490, 107-112.

Rencüzoğulları, E, Tüylü, BA, Topaktaş, M, İla HB, Kayraldız, A, Arslan, M, Diler, SB, 2004, "Genotoxicity of aspartame" *Drug and Chemical Toxicology*, 27, 3, 257-268.

Rencüzoğulları, E, Parlak, Ş, İla, HB, 2008, "The effects of food protector biphenyl on sister chromatid exchange, chromosome aberrations and micronucleus in human lymphocytes" *Drug and Chemical Toxicology*, 31, 2, 263-274.

Renner, HW, Wever, J, 1983, "Attempts to induce cytogenetic effects with sulphite in sulphite oxidase-deficient Chinese hamsters and mice" *Food Chem. Toxicol*, 21, 123-127.

Rojas, E, Herrera, LA, Sordo, M, Gonsebatt, ME, Montero, R, Rodriguez, R, Ostrosky-Wegman, P, 1993, "Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity" *Anticancer Drugs*, 4, 6, 637-640.

Rusul, G, Marth, EH, 1988, "Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a medium at different pH values and with or without pimaricin" *Z Lebensm Unters Forsch*, 187, 436-439.

Salamone, MF, Heddle, JA, 1983, "The bone marrow micronucleus assay: rationale for a revised protocol" in: F.J. de Serres (Ed.) *Chemical Mutagens*, Vol. 8, Plenum, New York, pp. 111-149.

Saotome, K, Sofuni, T, Hayashi, M, 1999, "A micronucleus assay in sea urchin embryos" *Mutation Research*, 446, 121-127.

Sarikaya, R, Solak, K, 2003, "Benzoik Asit'in *Drosophila melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile genotoksitesinin araştırılması" *GÜ, Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 23, 3, 19-32.

Sasaki, YF, Saga, A, Akasaka, M, Yoshida, K, Nishidate, E, SU, YQ, Matsusaka, N, Tsuda, S, 1997, "In vivo genotoxicity of orthophenylphenol, biphenyl, and thiabendazole detected in multiple mouse organs by the alkaline single cell gel electrophoresis assay" *Mutation Research*, 395, 2-3, 189-98.

Sasaki, YF, Kawaguchi, S, Kamaya, A, Ohshita, M, Kabasawa, K, Iwama, K, Taniguchi, K, Tsuda, S, 2002, "The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives" *Mutation Research*, 519, 1-2, 103-119.

Sato, S, Tomita, I, 2001, "Short-Term Screening Method for the Prediction of Carcinogenicity of Chemical Substances: Current Status and Problems of an in vivo Rodent Micronucleus Assay" *Journal of Health Science*, 47, 1, 1-8.

Schmid, W, 1975, "The micronucleus test" *Mutation Research*, 31, 9-15.

Schmid, W, 1976, "The micronucleus test for cytogenetic analysis" in: A. Hollaender (Ed.), *Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection*, Plenum, New York, 4, 31-53.

Schmid, TE, Xu, W, Adler, ID, 1999, "Detection of aneuploidy by multicolor FISH in mouse sperm after in vivo treatment with acrylamide, diazepam or thiabendazole" *Mutagenesis*, 14, 2, 173-179.

Schiffmann, D, Schlatter, J, 1992, "Genotoxicity and cell transformation studies with sorbates in Syrian hamster embryo fibroblasts" *Food Chem Toxicol*, 30, 8, 669-672.

Schlatter, J, Wurgler, FE, Kranzlin, R, Maier, P, Halliger, E, Graf, U, 1992, "The potential genotoxicity of sorbates: effects on cell cycle in vitro in V79 cells and somatic mutations in *Drosophila*" *Food Chem Toxicol*, 30, 10, 843-851.

Seligmann, IC, Lima, PDL, Cardoso, PCS, Khayat, AS, Bahia, MO, Buchi, DF, Cabral, IR, Burbano, RR, 2003, "The anticancer homeopathic composite Canova Method is not genotoxic for human lymphocytes in vitro" *Genetics and Molecular Research*, 2, 2, 223-228.

Sharma, S, Gao, P, 1998, "Genotoxicity assays for ammonium perchlorate. I. Salmonella/Microsome Mutagenesis. III. In vivo Mouse bone marrow micronucleus test" *Cellular and Molecular Toxicology Program Life Sciences and Toxicology Division ManTech Environmental Technology, Inc, a Man Tech International Company*, study no, 6100-001.

Standler, LJ, 1928, "Genetic effects of X rays in maize" *Proc Natl Acad Sci US*, 14, 69-75.

Stern, GA, 1978, "In vitro antibiotic synergism against ocular fungal isolates" *Am J Ophthalmol*, 86, 359-367.

Strippoli, V, D'Auria, FD, Simonetti, N, Basti, D, Bruzzese, T, 1997, "In vivo and in vitro antifungal activity of the polyene derivative SPA-S-753 against encapsulated form of *Cryptococcus neoformans*" *Infection*, 25, 27–31.

Styrna, J, Imai, HT, Moriwaki, K, 1991, "An increased level of sperm abnormalities in mice with a partial deletion of the Y chromosome" *Genet Res Camb*, 57, 195-199.

Surjan, A, 1989, "Analysis of genotoxic activity of 16 compounds and mixtures by the *Drosophila* mosaic test" *Ann Ist Super Sanita*, 25, 4, 569-572.

Sushko, SN, Malenchenko, AF, 1992, "Chromosome aberration induction in murine spermatocytes in joint exposure to radiation and sodium nitrite and nitrate" *Radiobiologiya*, 32, 4, 500-505.

Suzuki, Y, Nagae, Y, Li, J, Sabaka, H, Mozawa, K, Takahashi, A, Shimizu, H, 1989, "The micronucleus test and erythropoiesis: effects of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes (P:N ratio)" *Mutagenesis*, 4, 420-424.

Tanisho, T, Yagi, T, Iwasaki, K, Shimoi, K, Kinae, N, Hayashi, M, Sofuni, T, 1998, "Monitoring of coastal water contaminated with mutagens and/or carcinogens using micronucleus test in fish" *Environ Mutagen Res*, 20, 1–9.

Temizkan, G, 1999, "Genetik, II.Moleküler Genetik" T.C. İstanbul Üniversitesi Yayınlarından, sayı, 4067, Fen Fakültesi, no, 245, ISBN, 975-404-429-9.

Tohda, H, Horaguchi, K, Takahashi, K, Oikawa, A, Matsushima, T, 1980, "Epstein-Barr virus-transformed human lymphoblastoid cells for study of sister chromatid exchange and their evaluation as a test system" *Cancer Res* Dec, 40, 12, 4775-4780.

Topham, JC, 1980, "Chemically induced transmissible abnormalities in sperm head shape" *Mutation Research*, 70, 109–114.

Tortora, JG, Grabowski, SR, 1996, "Principles of Anatomy and Physiology" Harper Collins College Publishers.

Tsuda, H, Inui, N, Takayama, S, 1976, "In vitro transformation of newborn hamster cells induced by sodium nitrite" *Gann*, 67, 2, 165-173.

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, TGKY, 1997, T.C. Resmi Gazete. Sayı: 23172. Ankara.

Türkoğlu, Ş, 2007, "Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L." *Mutation Research*, 626, 4-14.

Türkoğlu, Ş, 2008, "Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*" *Food and Chemical Toxicology*, 46, 6, 2035-2041.

Vanderkerken, K, Vanparys, P, Verschaeve, L, Kirsch-Volders, M, 1989, "The Mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens" *Mutagenesis*, 4, 6-11.

Vanparys, P, Vermeiren, F, Sysmans, M, Temmerman, R, 1990, "The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity" *Mutation Research*, 244, 95-103.

Vanparys, P, Deknudt, G, Vermeiren, F, Sysmans, M, Marsboom, R, 1992, "Sampling times in micronucleus testing" *Mutation Research*, 282, 191-196.

Var, I, Erginkaya, Z, Güven, M, Kabak B, 2006, "Effects of antifungal agent and packaging material on microflora of Kashar cheese during storage period" *Food Control*, 17, 2, 132-136.

Vig, BK, Swearngin, SE, 1986, "Sequence of centromere separation: kinetochore formation in induced laggards and micronuclei" *Mutagenesis*, 6, 461-465.

Vijayalaxmi, KK, Venu, R, 1999, "In-vivo anticlastogenic effects of L-Ascorbic acid in mice" *Mutation Research*, 438, 47-51.

Von Ledebur, M, Schmid, W, 1973, "The micronucleus test, Methodological Aspects" *Mutation Research*, 19, 109-117.

de Vries, H, 1901, "Die mutationstheorie" O Von veit, Leipzig.

Walker, R, 1990, "Toxicology of sorbic acid and sorbates" *Food Addit Contam*, 7, 671-676.

Wang, XL, Zhen, WJ, Wu, HY, Feng, J, Tu, ZH, 1998, "Mutagenicity tests on epiristeride in vitro and in vivo" *Acta Pharmacologica Sinica*, 19, 6, 569-572.

Wieriks, J, 1966, "Pimaricin in cheese: A toxicity test of seven weeks in rats" Unpublished report from the Royal Netherlands Fermentation Industries Ltd, submitted to WHO.

Wieriks, J, 1971, "Pimaricin in apples: A toxicity test of three months in rats" Unpublished report from the Royal Netherlands Fermentation Industries Ltd, submitted to WHO.

WHO, 2006, "WHO Food Additives series:48 Safety evaluation of certain food additives and contaminants" <http://www.inchemorg/documents/jecfaljecmono/v48je06.htm>

WHO, 2008. "WHO Food Additives series:59 Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Prepared by the sixty-eighth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)" World Health Organization, Geneva.

Wyrobek, AJ, Bruce, WR, 1975, "Chemical induction of sperm abnormalities in mice" Proc Natl Acad Sci U.S.A, 72, 4425–4429.

Wyrobek, AJ, Bruce, WR, 1978, "Induction of sperm shape abnormalities in mice and humans" in: A. Hollaender (Ed.), Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection, Plenum Press, New York, 5, 257–285.

Yamamoto, KI, Kikuchi, Y, 1980, "A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons" Mutation Research, 71, 127–131.

Yanagimachi, R, 1988, "Mammalian fertilization" In: Knobil, E, Neal, J, et al (Eds), The Physiology of Reproduction, Raven Press, New York, 135-185.

Yılmaz, S, Ünal, F, Yüzbaşıoğlu, D, Aksoy, H, 2008, "Clastogenic effects of food additive citric acid in human peripheral lymphocytes" Cytotechnology, 56, 2.

Yi, H, Meng, Z, 2003, "Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*" Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 537, 1, 109-114.

Zeiger, E, Anderson, B, Haworth, S, Lawlor, T, Mortelmans, K, 1988, "Salmonella mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals" Environ Mol Mutagen, 11, 1-157.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Edirne’de doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimini Edirne’de tamamladım. 1997 yılında girdiğim Trakya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2001’de mezun oldum. Temmuz 2002-Eylül 2008 tarihleri arasında özel laboratuarda biyolog olarak çalıştım. 2001-2004 yılları arasında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans; 2004-2008 yılları arasında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora öğrenimini tamamladım.