

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İKİ HETEROSİKLİK AMİN'in GENOTOKSİSİTESİNE KARŞI KLOROFİL A
ve KLOROFİL B'nin DROSOPHİLA KANAT SOMATİK MUTASYON ve
REKOMBİNASYON TESTİ ile KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Serap KOCAOĞLU CENKÇİ

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

2010

**İKİ HETEROSİKLİK AMİN'in GENOTOKSİSİTESİNE KARŞI KLOROFİL A
ve KLOROFİL B'nin DROSOPHİLA KANAT SOMATİK MUTASYON ve
REKOMBİNASYON TESTİ ile KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Serap KOCAOĞLU CENKÇİ

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez 2006.03.0121.016 proje numarası ile, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

2010

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İKİ HETEROSİKLİK AMİN'in GENOTOKSİSİTESİNE KARŞI KLOROFİL A
ve KLOROFİL B'nin DROSOPHİLA KANAT SOMATİK MUTASYON ve
REKOMBİNASYON TESTİ ile KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Serap KOCAOĞLU CENKÇİ

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez ^{14/6}2010 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Bülent KAYA (Danışman)

Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU.....

Prof. Dr. Beria FALAKALI MUTAF.....

Prof. Dr. Hacer ÜNLÜ.....

Doç. Dr. Fedai ERLER

ÖZET

İki Heterosiklik Amin'in Genotoksitesine Karşı Klorofil a ve Klorofil b'nin *Drosophila* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Koruyucu Etkilerinin Araştırılması

Serap KOCAOĞLU CENKÇİ

Doktora Tezi, Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bülent KAYA

Haziran 2010, 84 Sayfa

Bu çalışmada *Drosophila melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile klorofil a ve klorofil b'nin (0.5 ve 1 µM) IQ ve MeIQx heterosiklik amin (HCA) bileşiklerine (1, 2 ve 5 ppm) karşı koruyucu etkileri araştırılmıştır. Çalışmada normal ve yüksek metabolik aktiviteye sahip *Drosophila* hatları kullanılarak iki çekinik gen olan *mwh* (multiple wing hair) ve *flr³* (flare) bakımından transheterozigot larvalara kronik uygulamalar yapılmıştır. Öncelikle üçüncü evre larvalarda HCA dozlarının genotoksik etkileri belirlenmiştir. Antigenotoksisite çalışmalarında iki farklı uygulama grubu oluşturulmuştur. İlk grupta klorofil a, b ve HCA dozları eş zamanlı olarak 3. evre larvalara uygulanırken ikinci grupta klorofil a ve b 2. evre larvalara uygulandıktan sonra 3. evreye ulaştıklarında HCA dozları uygulanmıştır.

Normal metabolik aktiviteye sahip bireylerde HCA'ların genotoksik etkilerinin azaltılmasında klorofil a ve b her iki uygulama şeklinde de başarılı olmuştur. Bununla birlikte ön uygulama grubunun eş zamanlı uygulama grubundan daha etkili olduğu belirlenmiştir. Klorofil a ve b'nin etkinlikleri arasında belirgin bir fark bulunmamıştır. Yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerde IQ'nun üç dozunda da genotoksik etki gözlenmemiştir. MeIQx'in düşük dozlarında da genotoksik etki bulunmazken 5 ppm yüksek dozu zayıf pozitif etki göstermiştir. IQ'nun her 3 dozunda ve MeIQx'in 2 dozunda genotoksik etki görülmediği için bu dozlarda klorofil a ve b'nin yüksek metabolik aktiviteli bireylerdeki koruyucu etkileri tez kapsamında değerlendirilmemiştir. MeIQx 5 ppm dozunda eş zamanlı uygulamalarda klorofil a 1 µM dozu frekans artışına neden olmuştur. Ancak bu frekans artışı istatistiksel düzeyde önemli değildir. Klorofil a'nın diğer dozlarında ve klorofil b dozlarında antigenotoksik etki belirlenmiştir. Ön uygulama gruplarında klorofil a ve klorofil b'nin tüm dozlarında genotoksik etkide belirgin bir azalma olduğu görülmektedir ve eş zamanlı uygulamalara göre daha etkilidir.

ANAHTAR KELİMELER: *Drosophila melanogaster*, Biyoaktivasyon, Heterosiklik Amin, Klorofil a, Klorofil b

JÜRİ: Prof. Dr. Bülent KAYA (Danışman)

Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU

Prof. Dr. Beria FALAKALI MUTAF

Prof. Dr. Hacer ÜNLÜ

Doç. Dr. Fedai ERLER

ABSTRACT

The Investigation of Protective Effects of Chlorophyll a and Chlorophyll b Against Two Heterocyclic Amines Genotoxicity in *Drosophila* Wing Somatic Mutation and Recombination Test

Serap KOCAOĞLU CENKCI

PhD. Thesis in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Bülent KAYA

June 2010, 84 Pages

In this study the protective effects of chlorophyll a and chlorophyll b (0.5 and 1 μ M) against the heterocyclic amine (HCA) compounds IQ and MeIQx (1, 2 and 5 ppm) with somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster* are investigated. Chronic applications are performed to transheterozygous larvae with respect to two recessive genes, *mwh* (multiple wing hair) and *flr³* (flare) by using *Drosophila* strains which possess both normal and high metabolic activation. The genotoxic effects of HCAs are primarily determined for third instars larvae. In antigenotoxicity studies two different application groups are constituted. While for the first group doses of chlorophyll a, b and HCAs are given to the third instars larvae simultaneously, for the second group doses of HCA are applied at the third instars after doses of chlorophyll a and b are given to at the second instars larvae.

Chlorophyll a and b become effective in reducing genotoxic effects of HCAs by both applications on individuals that have normal metabolic activation. However, it is observed that the pretreatment style is much more effective than simultaneous one. There have been no differences for chlorophyll a and b in efficacy. Genotoxic effects for each three IQ doses have not been observed for individuals with high metabolic activation. For the low doses of MeIQx, the genotoxic effects have not been obtained, on the other hand 5 ppm high dose has shown a weak positive effect. Since both for each three doses of IQ and two doses of MeIQx have indicated no distinct genotoxic effects, the protective effects of chlorophyll a and b on the individuals which have high metabolic activation have not been evaluated in the content of this thesis. In the simultaneous applications of MeIQx 5 ppm dose, 1 μ M chlorophyll a dose has led to an increase in frequency. However, this increase is not important in statistical sense. For other doses of chlorophyll a and all doses of chlorophyll b antigenotoxic effects are detected. For the pretreatment application groups genotoxic effects are explicitly decreasing for all doses of chlorophyll a and b, and it is more effective than simultaneous applications.

KEY WORDS: *Drosophila melanogaster*, Bioactivation, Heterocyclic Amine, Chlorophyll a, Chlorophyll b

COMMITTEE : Prof. Dr. Bülent KAYA (Supervisor)

Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU

Prof. Dr. Beria FALAKALI MUTAF

Prof. Dr. Hacer ÜNLÜ

Assoc. Prof. Dr. Fedai ERLER

ÖNSÖZ

Büyüme, gelişme ve sağlıklı bir yaşam sürmek için beslenme insanoğlunun en gerekli ihtiyaçlarından birisidir. Aynı zamanda beslenme, çevresel dış etkenlerin organizmaya alınmasında giriş yolunu oluşturmaktadır. Pestisitler, aflatoksin, gıda katkıları ve bunlara benzer çeşitli maddeler besinler yoluyla vücuda girerek zararlı etkiler oluşturabilmektedirler. Bununla birlikte besinler içerisinde bulunan doğal öncül maddeler, besinlerin tüketime yönelik hazırlanması esnasında yapılarını değiştirerek farklı kimyasal bileşikler oluşturabilirler. Örneğin heterosiklik amin (HCA) bileşikler, kreatin içeriği fazla olan et ürünlerinin yüksek sıcaklıkta pişirilmesiyle oluşan kimyasal yapılarıdır. Bu bileşiklerin mutajenik, kanserojenik olduklarına dair çalışmalarda bulunmaktadır. Son yıllarda bu konudaki bazı epidemiyolojik çalışmalar yeme alışkanlıklarıyla yaşam stiline bağlı hastalıklar arasında yakın bir ilişki olduğunu ve iyi dengelenmiş beslenme planının vücudun sağlıklı olması için gerekliliğini göstermektedir. Çevresel kanserojenlerin neden olduğu DNA hasarlarının ortaya konmasının yanında bu hasarlara karşı koruyucu olabilecek besinsel içeriklerin belirlenmesi için büyük çaba harcanmaktadır ve doğa bu konuda araştırmacılara gerekli materyalleri sunmaktadır. Sebzeler ve meyveler sadece protein, karbonhidrat ve vitaminlerin doğal kaynağı olmayıp pek çok farklı fonksiyonel kimyasal bileşik de içerirler. Tüm bu içerikler hayatımızı sağlıklı devam ettirebilmemiz için vazgeçilmez besin faktörleridir. Bu çalışmada özellikle yeşil sebze ve meyvelerde bulunan klorofil a ve klorofil b'nin besinlerde sıklıkla oluşan 2 HCA'nın genotoksik etkilerine karşı koruyucu etkileri araştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçların daha sonra yapılacak ilgili araştırmalara ışık tutmasını dilerim.

Bana bu konuda çalışma olanağı veren, çalışma boyunca bilgisini ve zamanını benimle paylaşan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Bülent KAYA'ya (Ak. Ün. F.E.F.), yardımlarından dolayı Arş. Gör. Eşref DEMİR'e (Ak. Ün. F.E.F.), bu araştırmayı proje (Proje no: 2006.03.0121.016) dahilinde destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, bölüm laboratuvar kullanım imkanlarını sunan Biyoloji Bölümü'ne, çalışmalar esnasında içtenlikle yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Sezgi ŞEREF GÜN'e (Ak. Ün. F.E.F.) ve Özge TUFAN ÇETİN'e (Ak. Ün. F.E.F.), maddi ve manevi desteği için eşim Yrd. Doç. Dr. Mehmet CENKÇİ'ye (Ak. Ün. F.E.F.) ve en zor anlarımda yanımda bulunan ve desteklerini hep hissettiğim sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. MATERYAL ve METOT.....	12
2.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in Hayat Döngüsü.....	12
2.2. Kullanılan Hatların Genetik Yapısı.....	14
2.3. Kimyasal Gruplar.....	18
2.4. Çaprazlamaların Yapılması ve Transheterozigot Larvaların Elde Edilmesi.....	20
2.5. Uygulama Gruplarının Oluşturulması ve Uygulamaların Yapılması.....	21
2.6. Ergin Bireylerin Toplanması ve Kanat Preparatlarının Hazırlanması.....	26
2.7. Kanat Preparatlarının Mikroskoptaki Analizi.....	27
2.8. Klon İndüksiyon Frekansının Hesaplanması.....	32
2.9. Verilerin Değerlendirilmesi.....	32
3. BULGULAR.....	34
3.1. Normal Metabolik Aktivite Uygulamaları.....	37
3.1.1. IQ uygulamaları.....	37
3.1.1.1. Eş zamanlı uygulamalar: klorofil + IQ (NMA).....	40
3.1.1.2. Ön uygulamalar: 48 ± 4 saat klorofil + 72 ± 4 saat IQ (NMA).....	40
3.1.2. MeIQx uygulamaları.....	44
3.1.2.1. Eş zamanlı uygulamalar: klorofil + MeIQx (NMA).....	44
3.1.2.2. Ön uygulamalar: 48 ± 4 saat klorofil + 72 ± 4 saat MeIQx (NMA).....	44
3.2. Yüksek Metabolik Aktivite Uygulamaları.....	51
3.2.1. IQ uygulamaları.....	51
3.2.2. MeIQx uygulamaları.....	51
3.2.2.1. Eş zamanlı uygulamalar: klorofil + MeIQx (YMA).....	55

3.2.2.2. Ön uygulamalar: 48 ± 4 saat klorofil + 72 ± 4 saat MeIQx (NMA).....	55
4. TARTIŞMA.....	57
5. SONUÇ	69
6. KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

<i>Bd^S</i>	<i>Beaded-Serrate</i>
°C	Santigrat derece
<i>flr</i>	Flare
gr	Gram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar
<i>mwh</i>	Multiple wing hair
ng	Nanogram
ppm	Parts per million (milyonda bir birim)
♂	Erkek
♀	Dişi
%	Yüzde

Kısaltmalar

AIA	Aminoimidazo-azaren
CHO	Chinese hamster ovaryum
COMET	Tek hücre jel elektroforezi
CYP1A2	Sitokrom P450 1A2
DiMeIQx	2-amino-3,4,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline
DMSO	Dimetil sülfoksit
EMS	Etil metan sülfonat
GST	Glutasyon-S-transferaz
HCA	Heterosiklik Amin
IQ	2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline
Klf	Klorofil
MeIQ	2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoline

MeIQx	2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline
N	Normal
NAT	N-asetiltransferaz
NMA	Normal metabolik aktivite
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridine
ROS	Reaktif oksijen türleri
S	Serrat
SCE	Sister Chromatide Exchange (Kardeş kromatidlerde parça değişimi)
Stk	Sitokrom
SMART	Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi
SULT	Sülfotransferaz
Trp-P-1	3-amino-1,4-dimethyl-5 <i>H</i> -pyrido[4,3- <i>b</i>]-indole
Trp-P-2	3-amino-1-methyl-5 <i>H</i> -pyrido[4,3- <i>b</i>]indole
UDPGT	UDP-glukuronosiltransferaz
Uyg	Uygulama
YMA	Yüksek Metabolik Aktivite

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Heterosiklik aminlerin sentezi (Jägerstad vd 1998)	3
Şekil 2.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in gelişim evreleri (Graf vd 1984)	13
Şekil 2.2. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in hayat döngüsü	13
Şekil 2.3. Kanat trikomlarının görünümü a) normal b) farklılaşmış fakat ne <i>flare</i> ne de <i>mwh</i> olarak sınıflandırılmayacak trikomlar c) <i>mwh</i> trikomlar d) <i>flare</i> genotipe ait trikomlar (Graf vd 1984)	15
Şekil 2.4. <i>Drosophila</i> kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde kullanılan belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki yerleşimleri (Kaya 2000).....	16
Şekil 2.5. <i>flr3</i> / TM3, <i>Bd^S</i> bireylerindeki homozigot letal etkiler (Kaya 2000).....	17
Şekil 2.6. a) Dengeleyici kromozom taşımayan normal ve b) dengeleyici kromozom taşıyan <i>Bd^S</i> (serrat) bireylerinin kanat fenotipleri	17
Şekil 2.7. Dengelenmiş heterozigot <i>mwh/Bd^S</i> ve transheterozigot <i>mwh/flr³</i> bireylerin elde edilebilmesi için <i>mwh/mwh</i> ve <i>flr³/TM3,Bd^S</i> bireyleri arasındaki çaprazlamalar (Kaya 2000)	21
Şekil 2.8. <i>Drosophila melanogaster</i> 'de değişik uygulama zamanları (Graf vd 1984).....	22
Şekil 2.9. <i>Drosophila melanogaster</i> 'de kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin şematik olarak gösterilmesi	25
Şekil 2.10. Kanat sektörlerinin gruplandırılması.....	27
Şekil 2.11. Küçük tek tip <i>mwh</i> mutant klonların görünümü.....	29
Şekil 2.12. Büyük tek tip <i>mwh</i> mutant klonların görünümü.....	29
Şekil 2.13. Büyük tek tip <i>flr</i> mutant klonların görünümü	30
Şekil 2.14. İkiz mutant klonların görünümü.....	30
Şekil 2.15. <i>mwh/flr³</i> genotipindeki bireylerde görülebilecek genetik anormaliler (Graf vd 1984)	31
Şekil 3.1. <i>mwh/flr³</i> genotipli bireylerde IQ'nun toplam klon frekans dağılımları (NMA)	39
Şekil 3.2. <i>mwh/TM3</i> genotipli bireylerde IQ'nun toplam klon frekans dağılımları (NMA)	39

Şekil 3.3. IQ'nun klorofil a ve klorofil b uygulamalarında toplam klonların frekans dağılımları (NMA)	43
Şekil 3.4. <i>mwh/flr³</i> genotipli bireylerde MeIQx'in toplam klon frekans dağılımları (NMA)	47
Şekil 3.5. <i>mwh/TM3</i> genotipli bireylerde MeIQx'in toplam klon frekans dağılımları (NMA)	47
Şekil 3.6. MeIQx'in klorofil a ve klorofil b uygulamalarında toplam klonların frekans dağılımları (NMA)	50
Şekil 3.7. <i>mwh/flr³</i> genotipli bireylerde IQ'nun toplam klon frekans dağılımları (YMA)	54
Şekil 3.8. <i>mwh/flr³</i> genotipli bireylerde MeIQx'in toplam klon frekans dağılımları (YMA)	54
Şekil 3.9. 5 ppm MeIQx'in klorofil a ve klorofil b uygulamalarında toplam klonların frekans dağılımları (YMA)	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan bileşiklerin kimyasal yapıları.....	19
Çizelge 2.2. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi.....	33
Çizelge 3.1. Normal metabolik aktiviteye sahip bireylerde kontrol gruplarının 48±4 ve 72±4 saatlik larvalara uygulamalarından elde edilen veriler (N.K).....	35
Çizelge 3.2. Yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerde kontrol gruplarının 48±4 ve 72±4 saatlik larvalara uygulamalarından elde edilen veriler (N.K).....	36
Çizelge 3.3. IQ uygulamasından elde edilen normal ve serrat kanatlı bireylerin verileri (NMA).....	38
Çizelge 3.4. 72. saat larvalara IQ ve Klf a ve Klf b' nin birlikte uygulamalarından elde edilen veriler (NMA).....	41
Çizelge 3.5. 48. saat larvalara Klf a ve Klf b ön uygulamalarından sonra 72. saatte IQ uygulamasından elde edilen veriler (NMA).....	42
Çizelge 3.6 MeIQx uygulamasından elde edilen normal ve serrat kanatlı bireylerin verileri (NMA).....	46
Çizelge 3.7. 72. saat larvalara MeIQx ve Klf a ve Klf b' nin birlikte uygulamalarından elde edilen veriler (NMA).....	48
Çizelge 3.8. 48. saat larvalara Klf a ve Klf b ön uygulamalarından sonra 72. saatte MeIQx uygulamasından elde edilen veriler (NMA).....	49
Çizelge 3.9. IQ uygulamasından elde edilen normal kanatlı bireylerin verileri (YMA).....	52
Çizelge 3.10.MeIQx uygulamasından elde edilen normal ve serrat kanatlı bireylerin verileri (YMA).....	53
Çizelge 3.11.MeIQx 5 ppm dozlarının klorofil a ve klorofil b uygulamaları.....	56

1. GİRİŞ

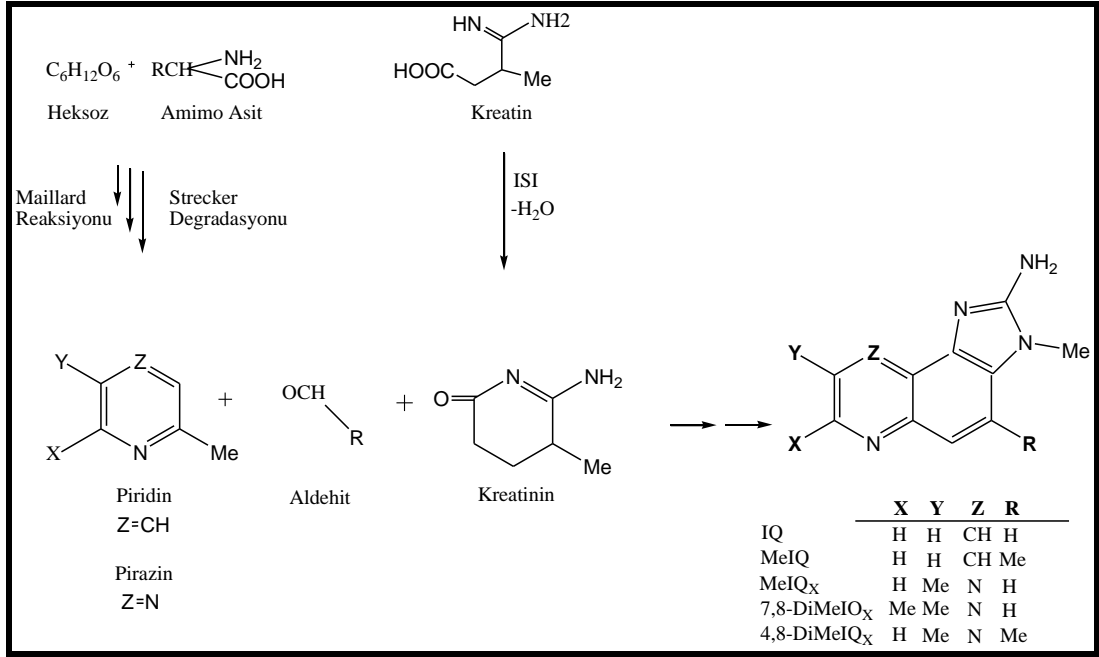
Yaşamın vazgeçilmez gereksinimlerinden olan beslenme, tüm yaş grubundaki kişilerin sağlıklarını ve yaşam kalitelerini etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Kişilerin yaşam şekillerinin sadece bir yönüdür. Aynı zamanda toplumlar arasında da beslenme alışkanlıkları değişiklik göstermektedir. Bazı toplumlarda sebze ağırlıklı beslenme tercih edilirken bazı toplumlarda et ve et ürünleri daha fazla rağbet görmektedir. İnsan beslenmesinde hayvansal kaynakların kullanımı yaklaşık 5 milyon yıl öncesi gibi uzun bir geçmişe sahiptir (Larsen 2003).

Geçmişten günümüze bu süreç içerisinde besinleri daha yenilebilir hale getirmek için çeşitli hazırlama yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemler besinlerin tat ve görünüm açısından iştah açıcı cazibelerini artırmakla birlikte onların saklama sürecinde bozulmalarını geciktirir ve bakteriyolojik açıdan daha güvenilir besinlerin oluşmasını sağlar (Robbana-Barnat vd 1996). Bununla birlikte besin maddelerinin işlenmesi ve pişirilmesi esnasında birçok genotoksik madde veya pişirme toksikantı çeşidi oluştuğu bilinmektedir. Akrilamid, polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve nitrozaminler besinlerin işlenmesi ile oluşan genotoksik maddelere örnek verilebilir (Jägerstad ve Skog 2005). Özellikle et ve et ürünlerinin yüksek sıcaklıklarda pişirilmesi ile oluşan ve çiğ ette bulunmayan heterosiklik aminler (HCA) ise diğer bir grubu oluşturmaktadır. Heterosiklik aminler kreatin/kreatinin, amino asitler ve/veya şekerin yüksek sıcaklıklarda oluşturdukları küçük moleküllerdir ve genellikle bir tanesine ekzosiklik amino grubu takılı 2 veya 3 halkadan oluşmaktadırlar (Jägerstad ve Skog 2005). Kimyasal yapılarına göre HCA'lar Amino-karbolin ve Aminoimidazo-azaren (AIA)'ler olmak üzere 2 ana gruba ayrılırlar.

Amino-karbolin grubu bileşikler (pirido-indol veya pirido-imidazol'ler) genellikle ekzosiklik amino grubuna bazen de piridin halkasına takılı ekzosiklik metil grubuna sahiptirler. Jägerstad vd (1998) tarafından bildirildiğine göre; Sugimura, amino-karbolinlerin amino asitlerin veya proteinlerin pirolize olmaları yoluyla ortaya çıktıklarını belirtmiştir ve serbest radikal reaksiyonları vasıtasıyla oluştuğunu varsayılmaktadır. Piroliz 300°C üzerindeki sıcaklıklarda meydana gelir ve radikal

reaksiyonları ile birçok reaktif parçalar oluşturur. Daha sonra bu parçaların yoğunlaşarak yeni HCA'ları oluşturdukları düşünülmektedir. Hem hayvansal hem de bitkisel besinlerin ısıtılmasıyla oluşabilen amino-karbolinler öncül madde olarak keratin/kreatinin'e bağımlı değildir. Örneğin α ve γ karbolinler ya triptofan ya da hayvansal veya bitkisel kökenli proteinlerin (albumin, kazein veya soya fasülyesi globulin'i) pirolizi ile oluşmaktadır (Jägerstad vd 1998).

AIA grubu bileşikler (İmidazo-quinolin, İmidazo-quadiazoxalin'ler, İmidazo-piridin'ler) 2-amino-imidazo grubuna ve imidazol halkasındaki nitrojenlerden birine bağlı metil grubuna sahiptir. Temel öncülleri kreatin/kreatinin, amino asit ve şeker olan bu grup HCA'ların Maillard reaksiyonları sonucunda oluştuğu düşünülmektedir (Jägerstad vd 1998). Maillard reaksiyonlarının kimyası oldukça karmaşık olmakla birlikte tek bir reaksiyondan ziyade çeşitli reaksiyonları kapsar. Maillard reaksiyonlarının bazı basamaklarında HCA yapısında bulunan pirazinler, piridinler, quinolinler, quinoksalinler ve pirido[3,4-d]imidazoller oluşur (Jägerstad vd 1998, Murkovic 2004). Quinolin, quinoksalin veya piridin kuyruklarına takılı olan metil gruplarının sayısı ve pozisyonu bu grubun üye çeşitliliğine katkıda bulunmaktadır (Şekil 1.1). Isıtma esnasında kreatin'in halkasal formdaki kreatinine dönüşmesi (siklizasyon) ile AIA'nın amino-imidazo parçasının meydana geldiği belirtilmektedir (Jägerstad vd 1998). Yüksek sıcaklıklarda dönüşüm hızı daha fazladır ve böylece kreatinin miktarı da sıcaklığa bağlı olarak artar. Hekzos ve amino asitler arasındaki Maillard reaksiyonları ile oluşan piridin veya pirazin ürünleri molekülün geri kalan kısmını oluşturmaktadır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Heterosiklik aminlerin sentezi (Jägerstad vd 1998)

Meydana gelen reaksiyon zincirlerinde ortaya çıkan serbest radikallerin çeşitli HCA'ların oluşumunda işe karıştıkları tespit edilmiştir (Kikugawa 1999). Örneğin, karışım içerisinde kreatinin ile birlikte alkilpiridin serbest radikali bulunursa imidazoquinolin mutajenlerinin (IQ) dialkilpirazin serbest radikali bulunursa da imidazoquinoksalin mutagenlerinin (MeIQ_x) oluştuğu belirtilmektedir (Pearson vd 1992).

Pişmemiş et ve balık kasında HCA oluşumu için gerekli tüm öncül maddeler bulunmaktadır. Amino asitler ve şekerler sırasıyla kas proteini ve glikojenden sağlanır. Kreatin sadece kas hücrelerinde önemli seviyede var olan bir enerji metabolitidir ve pişirme esnasında Maillard reaksiyonlarıyla besinin karakteristik tadını ve kokusunu oluştururlar. Et ürünlerinin yüksek sıcaklıkta pişirilmesi sırasında ng/g düzeyinde HCA oluşmaktadır. Genelde 200°C ve daha yukarı sıcaklıklarda tavada kızartma ve ızgarada pişirme yöntemleriyle yüksek miktarlarda HCA ürünü meydana gelirken kaynatma ile çok az miktarda HCA oluşur veya hiç oluşmaz, ayrıca derin yağda kızartma, rosto ve fırınlama işlemleri değişken miktarlarda ürün vermektedir (Skog vd 1998). İnsanların maruz kaldıkları HCA miktarının beslenme alışkanlıkları ve pişirme tekniklerine bağlı olarak birkaç ng/gün ile birkaç µg/gün arasında olduğu hesaplanmıştır (Jägerstad ve

Skog 2005). Besinlerin pişirilmesindeki ve beslenme alışkanlıklarındaki farklılıklar nedeniyle oluşan kimyasala maruz kalma bireyler arasında çeşitlilik gösterir. Aynı zamanda detoksifikasyondan sorumlu enzimlerin polimorfik yapıda olması kişilerin metabolik potansiyellerinin de farklı olmasına neden olur. Bu enzimlerdeki genetik polimorfizm çevresel ajanların detoksifikasyonu ve metabolik aktivasyonu arasındaki dengeyi etkiler. Metabolik aktivitelerinin hızlı veya yavaş olmalarına göre bir popülasyondaki bireylerin HCA'ları metabolize etme hızları, oluşturdukları metabolit miktarları ve dolayısıyla etkilenme dereceleri birbirlerinden farklı olmaktadır. Detoksifikasyon mekanizmasının asıl amacı canlıların maruz kaldıkları çeşitli maddeleri vücuttan uzaklaştırmaktır. Yağda çözünen bileşikler biyolojik zarlardan kolaylıkla geçerler ve vücutta birikim yaparlar. Bu nedenle yağda çözünürlük bileşiğin vücuttan atılımını kısıtlar. Vücuttan uzaklaştırmanın en kolay yolu suda çözünür hale getirip idrar yoluyla dışarıya atmaktır.

Detoksifikasyon mekanizması faz I ve faz II reaksiyonları olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Faz I reaksiyonlarında ana bileşik, oksidasyon, redüksiyon ve hidroliz reaksiyonları ile türevlerine dönüştürülür. Bu fazda birçok enzim bulunmasına rağmen en önemli enzim sistemi çeşitli alt tipleri olan sitokrom P450 (stk. P450) enzim sistemidir. Stk. P450 enzimlerinin ilaç veya diğer yabancı bileşiklerin metabolizmasında rol oynadığı bilinmektedir. Bu enzim sistemindeki değişiklikler yabancı kimyasalların metabolizmasını da etkilemektedir. Bu fazdan sonra oluşan metabolitler ortamdan uzaklaştırılıp zararsız hale getirilebilir ya da faz II reaksiyonlarına katılabilirler. Faz II reaksiyonlarında da faz I reaksiyonlarında olduğu gibi çeşitli enzimler iş görmektedir. Faz II reaksiyonlarında, ara metabolite polar gruplar eklenerek metabolitin suda çözünürlüğü kolaylaştırılır. Ancak bazen detoksifiye edilmeye çalışılan madde biyoaktivasyona uğrar ve ana bileşikten daha zararlı bir hale gelebilir.

Besinlerin hazırlanması sırasında açığa çıkan HCA'lar da DNA'da hasar oluşturmak için metabolik aktivasyona gerek duyan promotajenlerdir (Schut ve Snyderwine 1999). Radyoaktif işaretli HCA'ların hızlı bir şekilde ortamdan kaybolmaları ve ürede değişmemiş olarak çok az miktarda bulunmaları bunların oldukça büyük oranda metabolize olduklarını göstermektedir (Gooderham vd 2001). HCA'lar

çeşitli yabancı kimyasal metabolize edici enzimler aracılığıyla (sitokrom P450=stk.P450, sülfotransferaz=SULT, glutatyon-S-transferaz=GST, *N*-asetil transferaz=NAT, UDP-glukuronosiltransferaz=UDPGT) oldukça karmaşık bir metabolizmaya uğrarlar (Kassie vd 2003). HCA'ların biyoaktivasyon yolunun, stk. P450 ile oksidasyon sonucu hidroksilamin türevlerine dönüştürülmesiyle başladığı belirtilmektedir (Sinha 2002, Schut ve Snyderwine 1999). Yapılan epidemiyolojik bir çalışmada stk. P450 grubu olan CYP1A2 enziminin inhibitörü kullanılarak AIA grubu MeIQx ve PhIP HCA'larının değişmeden idrarda görülme oranlarına bakılmıştır. İnhibitör madde kullanımından önce HCA'lar idrarda az miktarda bulunurken inhibitör madde verilimi ile değişmeden atılan HCA miktarında artış görülmüştür. Sonuç olarak CYP1A2 enziminin bu HCA'ların metabolizmasından sorumlu olduğu, inhibitör madde verilimi ile metabolizmalarının engellendiği sonucuna varılmıştır (Boobis vd 1994). Dolayısıyla öncelikle CYP1A2 enzimi ile *N*-hidroksilasyon meydana gelmektedir (Butler vd 1989). AIA'ların nükleik asitlerle oldukça zayıf bir şekilde etkileşen *N*-hidroksilamin metabolitleri ikinci metabolik aktivasyon basamağında *N*-asetiltransferaz tip 2 (NAT2) enzimi ile asetilasyona uğrarlar (Sadrieh vd 1996, Davis vd 1993a, Sinha, 2002).

HCA'ların olası zararlı etkileri arasında çeşitli kanser tiplerini genellikle de kolon kanserini oluşturabileceği yönünde çalışmalar bulunmaktadır (Gooderham vd 2001, Shin vd 2007). Kanserojenik potansiyele sahip maddeler bakteriyel mutajenite test sistemlerinde % 90 oranında mutajenik etki göstermektedir (National Research Council 1983). Bu yüksek orandaki mutajen-kanserojen ilişkisi nedeniyle maddelerin sadece kanserojenik değil aynı zamanda genotoksik açıdan da değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir. HCA'ların ortaya çıkarabileceği olası genetik hasarları belirleyebilmek için çeşitli model organizmalarla ve hücre gruplarıyla araştırmalar yapılmıştır (Durling ve Abramsson-Zetterberg 2005, Heddle vd 2001, Itoh vd 2003, Knize vd 2003, Knasmüller vd 1999, Lynch vd 1998, Pfau vd 1999, Watanabe-Akanuma vd 1997). Birçok kısa dönem testlerin sonucunda bu bileşiklerin genotoksisite gösterilmekle birlikte bakteriyel ve ökaryotik hücrelerde etkili mutajenler oldukları belirtilmektedir. Gooderham vd'nin (2001) bildirdiğine göre; Felton ve Knize, HCA'ların Ames *Salmonella typhimurium* mutajenite testinde çevre

kayması ve nokta mutasyona neden olan güçlü promutajenler olduklarını ifade etmektedirler. Ancak metabolik aktivasyon istekleri ve türler arasındaki farklılıklar bu bileşiklerin genotoksik etkilerini değiştirebilmekte ve bakteri hücrelerindeki kimyasal kaynaklı mutasyonlar bazen memeli hücre sistemlerinde açıkça gösterilememektedir. Örneğin PhIP, zayıf bakteriyel mutajenken ökaryotik hücrelerde (Chinese Hamster Ovaryum=CHO hücreleri) daha etkin mutajenite göstermektedir (Thompson vd 1987). Şeker ve amino asitlerin Maillard reaksiyonlarıyla AIA'ları oluşturması esnasında ortaya çıkan serbest radikal ara metabolitleri (pirazin katyon radikali ve karbon merkezli radikaller) (Kikugawa 1999) DNA'ya atak yaparak hasar oluşumuna neden olabilmektedir. Çoğu HCA'da var olan imidazo parçasının ekzosiklik amino grubundan türevlenen nitrenyum iyonu guanin bazlarında N-C zincirlerinin oluşumu vasıtasıyla DNA hasarları üretirler. (Colvin vd 1998). Bununla birlikte Robbana-Barnat vd'nin (1996) bildirdiğine göre; Jägerstad ve Skog, kreatin/kreatinin aksine karışıma eklenen amino asit tipine bağlı olarak mutajenik profilin değişebileceğini ve ayrıca farklı amino asitlerin aynı mutajenik molekülü oluşturabileceğini belirtmişlerdir. Örneğin treonin, glisin, lizin, alanin ve serin amino asitlerinin hepsi sıklıkla eş zamanlı olarak MeIQx ve DiMeIQx bileşiklerinin oluşumuna neden olurlar. Organizmada biriken DNA hasarları oluştukları doku veya organa bağlı olarak çeşitli mutasyonel hastalıkların ortaya çıkmasına katkıda bulunabilirler. Çoğu kanserin de hücre düzeyinde çeşitli mutasyonlar sonucu ortaya çıkan bir süreç olduğu düşünüldüğünde organizmanın HCA biyokullanımını indirgeyecek yöntemlerin tespit edilmesi önemli bir süreçtir.

Zararlı etkilerinden korunma için ilk akla gelen yöntem besin içerisinde bulunan HCA'ların miktarını uygun pişirme teknikleriyle azaltmaktır. Bu nedenle de yapılan çalışmaların bir kısmı pişirme esnasında bu bileşiklerin nasıl oluştuğunu anlamaya yöneliktir. Bu amaçla farklı araştırmacılar modelleme yöntemleriyle HCA'ları oluşturmayı hedefleyerek (Skog vd 1992, Jackson ve Hargraves 1995) farklı sıcaklık ve pişirme zamanlarının HCA oluşumuna etkilerini araştırmışlardır (Jägerstad vd 1998). Balogh vd'nin (2000) kırmızı etin elektrikli ızgarada farklı sıcaklıklarda ve 6 – 10 dakika pişirme süresinde oluşan HCA miktarlarını karşılaştırdıkları çalışmada, sıcaklığın 175°C'den 200°C ve 225°C'ye çıkartılmasıyla HCA oluşumunun belirgin şekilde arttığı

ve 225°C’de oluşan toplam HCA konsantrasyonunun 175°C’de oluşan miktara göre 6 kat daha fazla olduğu görülmektedir.

Modelleme yoluyla yapılan çalışmalar pişmiş et ve et ürünlerinde oluşan HCA’larla aynı ürünleri oluşturmuştur. Besinler içerisinde HCA’ların miktarını etkileyen çeşitli faktörler genel olarak etin tipi, pişirme tekniği, pişmişlik derecesi, pişirme sıcaklığı olarak belirtilse de kimyasal ve fiziksel parametreler, öncü maddelerin konsantrasyonları, pH, pişirme zamanı, yağ içeriği, ısı ve kütle taşınma şartları HCA oluşumunu etkileyen diğer faktörlerdir (Jägerstad vd 1998).

Bir sonraki adım bu ürünleri ve/veya öncüllerini ortamdan uzaklaştırmak veya oluşan miktarlarını azaltmak için farklı stratejiler geliştirmek şeklinde olmuştur (Puangsombat and Smith 2010, Persson vd 2003). Bu amaçla pişirme zamanının ve sıcaklığının azaltılması ile oluşan ürün miktarının değişimi belirlenmeye çalışılmıştır ve HCA oluşumunda serbest radikallerin rolünün olması pişirme esnasında antioksidan maddelerin kullanımının etkin bir uygulama şekli olabileceğini düşündürmüştür. Balogh vd’nin (2000) yapmış olduğu yukarıda bahsedilen çalışmada en yüksek HCA miktarının elde edildiği grupta kırmızı et pişirilmeden önce üzerine ayrı ayrı vitamin E (%1 ve %10 derişimleri) ve *Oleoresin rosemary* (%1 ve %10 derişimleri) eklenmesiyle HCA miktarlarında önemli düzeyde azalma olduğu gösterilmiştir (Balogh vd 2000).

Monti vd (2001) ise yeni mahsül işlenmemiş zeytinyağı ile 1 yıllık beklemiş zeytinyağını karşılaştırdıklarında, taze zeytinyağının antioksidan kapasitesinin bir yıllık yağa göre daha fazla olduğunu ve ayrıca HCA oluşumunu beklemiş yağa göre daha etkin bir şekilde azalttığını belirlemişlerdir. Kahverengi şeker, zeytinyağı, sirke, elma şarabı, sarımsak, hardal, limon suyu ve tuz ile marine edilmiş tavuk göğüs eti ile marine edilmemiş tavuk eti karşılaştırıldığında sonuçta marine edilmiş tavuklarda toplam HCA oranının azaldığı gösterilmiştir (Salmon vd 1997). Ayrıca pişmiş biftekte HCA oluşumunu önlemek için baharat (Murkovic vd 1998) ve meyve ekstraktlarının (Vitaglione vd 2002, Cheng vd 2007) ilave edilmesi HCA oluşumunu etkin bir şekilde azaltmaktadır. Çeşitli pişirme teknikleri ve katkı maddeleri ile HCA oluşumunu önlemeye yönelik çalışmaların yanı sıra mikrodalga fırınların kimyasal oluşumunu önlemeye yönelik etkileri de araştırılmıştır. Etin 200°C veya 250°C’de 6 dakika

kızartılmasından önce mikrodalga fırında işlem görmesi HCA öncüllerini (kreatin, kreatinin, amino asit, glikoz) azaltmaktadır (Felton vd 1994).

Et pişirilmeden önce ya da pişirilme esnasında yapılan çeşitli müdahalelerle HCA oluşumunu azaltmanın mümkün olduğu gösterilmiştir ancak yine de tamamen yok olmamakta ve dolayısıyla az miktarda da olsa yeme yoluyla vücuda alınmaktadır. Yeme sıklığına bağlı olarak da vücutta birikim yapabilmektedir. Vücuda alındıktan sonra bu bileşikler etkisiz hale getirebilecek ya da oluşturdukları hasarları azaltabilecek yeni yöntem veya madde arayışı devam etmektedir. Besinin kimyasal kompozisyonu HCA oluşumunda, antioksidan içeriği de oluşan HCA'nın genotoksik etkisinin azaltılmasında önemli etkenlerdir. Bu açıdan öğünlerde farklı besin çeşitlerinin tüketilmesi önemli bir faktör olabilir. HCA'ların ve/veya metabolitlerinin oluşturabileceği genetik hasarlara karşı kimyasal koruyucu faktörlerin tüketimi genotoksik etkinin değiştirilmesinde önemlidir.

Sebze ve meyveler sadece protein, karbohidrat kaynağı olmayıp pek çok farklı fonksiyonel kimyasal bileşikler de içermektedir. Yeşil ve sarı renkli sebzeler vitaminler gibi çok değerli fakat düşük konsantrasyonlu bileşikler ihtiva etmektedir. Bunlar antioksidatif, antimutajenik, alerji baskılayıcı, kan basıncı düzenleyici veya kolesterol düşürücü pek çok yararlı biyolojik aktiviteye sahiptir. Antimutajenik ve antikanserojenik özelliklere sahip bileşiklerin bulunması ve araştırılması son zamanlarda büyük önem kazanmıştır. Mutajen oluşumunun önlenmesi, mutajenin doku ve hücre organizasyonla durdurulması, hücre içinde bulunan bileşiklerle engellenmesi, premutajenik veya mutajenik lezyonların kimyasal bileşiklerle veya çeşitli tamir mekanizmalarıyla nötralizasyonu ve hatalı DNA tamirinin engellenmesi gibi antimutagenезisi etkileyen çeşitli faktörler bulunmaktadır (Hartman ve Shankel 1990). Antimutajenik etkisi bilinen fazla miktarda madde olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Birçok epidemiyolojik ve deneysel çalışma antioksidan içeriği zengin besinlerin belirli kanser tiplerini ve mutasyon frekansını azalttığını göstermiştir. (Block 1991, Byers ve Perry 1992, De Flora vd 2001, Fabiani vd 2001).

Mutajenite testleri herhangi bir kimyasalın modern toksikolojik profilinin tamamlayıcı kısmını oluşturmaktadır (Graf vd 1983). İnsan popülasyonlarının maruz

kaldığı genetik riski belirlemek için amaçlanan çalışmalarda memeli model organizmalar vazgeçilmez bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte deney hayvanlarının kullanımında sayısal açıdan etik olarak bazı sınırlamalar getirilmesi farklı alternatif metodların geliştirilmesine yön vermiştir. İnsan gen havuzuna potansiyel olarak zararlı kimyasalları belirlemeyi amaçlayan taramalarda alt organizasyonlu (sub-memeli) canlılar ve hücre kültürü yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak kimyasal maddelerin metabolizmaları ve dağılımları göz önünde bulundurulduğunda *in vivo* çalışmaların *in vitro* çalışmalardan daha üstün olduğu düşünülebilir. *In vitro* sistemlerin *in vivo* sistemlerdeki hücreler arasında bulunan düzenleyici, sinerjetik ve antagonistik etkileri yansıtamamaları dezavantajdır. Bu nedenle de *in vitro* çalışmaların sonuçları *in vivo* koşullarda yapılan çalışmaların sonuçlarından farklı olabilmektedir. *Drosophila melanogaster*, memelilerin yerine geçebilecek uygun alt organizasyonlu ökaryotik bir organizmadır. Bu sinekler genetik çalışmalar için birçok avantajı olan deneysel organizmalardır.

Son yıllarda yapılan birçok çalışma, insan hastalıklarında *D. melanogaster*'in model organizma olarak kullanılmasını desteklemektedir. *Drosophila* genom dizi analizi, insan hastalıklarında belirlenen genlerin %60'ından fazlasının *Drosophila* ortoloğu olduğunu göstermiştir. Ortoloji ortak bir atadan gelen farklı türlerdeki genleri tanımlamaktadır. Kansere, nörolojik hastalıklar, metabolizma bozuklukları, malformasyon bozuklukları ve renal hastalıkları belirleyen genlerin büyük olasılıkla *Drosophila*'da kopyaları bulunmaktadır (Bernards ve Hariharan 2001).

Drosophila larvaları, ergin evredeki vücudun çeşitli kısımlarını oluşturmak üzere çoğalmaya ve farklılaşmaya uğrayan diploit yapıdaki imaginal disk hücrelerine sahiptir. Bu disk hücrelerinin memeli hücreleriyle benzer hücre döngüsüne sahip olması *Drosophila*'nın tümör genezis basamaklarında çoğalma sürecinin araştırılmasında model olarak kullanılmasına olanak vermektedir. *Drosophila* imajinal disklerinin biyolojik özellikleri, kansere hassas birçok memeli hücresi ile benzerdir (Potter vd 2000).

Drosophila somatik dokularında genetik değişimleri belirlemek için en fazla kullanılan kısa dönem mutasyon testi kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)'dir. *Drosophila* SMART, tek bir bileşik veya kompleks karışımların

genotoksisitesini belirlemek için çok yönlü, etkili ve ucuz kısa dönem *in vivo* genotoksisite testidir. Sinek kanatlarındaki trikomlarda fenotipik olarak ifade edilen belirleyici genlerin heterozigotluğunun kaybını belirlemek için geliştirilmiştir. Bu test sistemi genotoksik ajanların hücre bölünmesi sırasında nokta mutasyon, kromozom kırıkları veya kaybı ya da mitotik rekombinasyon yetenekleri ile ilgili hızlı bilgi elde edilmesini sağlar (Graf vd 1984, 1989, Guzmán-Rincón ve Graf 1995, Vogel vd 1999). Kimyasal uygulanan *Drosophila* larvaları uygulamadan sonra birkaç hücre bölünmesi geçirir ve böylece somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonlar hücrenin bölünme süreciyle yavru hücrelere aktarılırlar. Somatik hücrelerdeki mutasyonel olayların veya rekombinasyonun neden olduğu genotipik değişimler fenotipik olarak kolayca gözlemlenebilir klonlar olarak ortaya çıkmaktadır.

SMART'da, standart bir çaprazlama ile normal seviyede stk. P450 enzimine sahip sinekler çaprazlanır (Graf vd 1989). Böylelikle test edilen kimyasal normal sürecinde metabolize edilir. Bununla birlikte aynı belirleyici genlere sahip ancak yüksek metabolik aktivite özelliği gösteren yani yüksek stk. P450 enzim seviyesi (Graf ve Van Schaik 1992) sunan sinekler aynı genetik test sistemi ile çaprazlanabilir. Sonuçta kimyasal madde daha hızlı bir şekilde metabolitlerine parçalanır. Kullanılan bu özel hatlar sayesinde dışarıdan herhangi bir aktivasyon sisteminin eklenmesine gerek duymadan promutajen veya prokanserojenler aktive edilebilir. Her iki çaprazlama grubunun karşılaştırılmasıyla aslında ana bileşiğin ve metabolitlerinin genotoksik etkileri karşılaştırılmış olur. Yüksek metabolik aktiviteye sahip hatlar ile yapılan farklı çalışmalar bulunmaktadır (Osaba vd 1999, Kaya vd 2000, Ramirez-Victoria vd 2001, Idaomar vd 2002, Rojas-Molina vd 2005). Ayrıca *Drosophila* SMART genotoksisite çalışmalarının yanı sıra antigenotoksisite çalışmaları için de uygun bir araştırma metodudur (Graf vd 1998).

Retinol, β -karoten, askorbik asit, α -linoleik asit ve α -tokoferol gibi antimutajenik maddeler DNA'yı birçok çevresel faktöre karşı korumaktadırlar. Bu bileşikler için genel anlamda vitamin terimi kullanılmaktadır. Ancak vitamin sınıfına girmeyen yeşil pigmentlerin de benzer özellikler gösterdikleri bilinmektedir. Bitki hücrelerinin içerdikleri yeşil (klorofil) ve sarı (karotenoid ve ksantofil) pigmentler toplamda 3:1

oranındadır (Negishi vd 1997). Klorofilin suda çözünebilir yarı sentetik bir klorofil türevidir ve gerek klorofil gerekse klorofilin'in antigenotoksik etkileri farklı organizmalarla yapılan farklı test sistemleriyle gösterilmiştir (Sugiyama vd 1996, Negishi vd 1989, Negishi vd 1997). Klorofil'in suda çözünmeyen yapısından dolayı, suda çözünür bir türev olan klorofilin lipofilik klorofil'e alternatif olarak kullanılmaktadır (Kim vd 1999). Yapılan çalışmalar bitkisel kaynaklı olan klorofil ve klorofilin'in DNA hasarlarına karşı koruyucu etkisinin diğer bileşiklerden daha aktif olduğunu göstermiştir (Gentile ve Gentile 1991, Negishi vd 1989, Negishi vd 1990, Ong vd 1989, Renner 1990, Terwel ve Van Der Hoeven 1985). İyonize radyasyon sonucu ortaya çıkan reaktif oksijen türlerinin (ROS) etkisiz hale getirilmesinde (Bolor vd 2000) ve ROS'ların neden olduğu oksidatif hasarlara karşı mitokondrinin korunmasında oldukça etkili bir antioksidan (Bolor vd 2000, Kamat vd 2000), ayrıca aflotoksinin neden olduğu hasarlara karşı da etkili bir antikanserijen (Egner vd 2003) olduğu belirtilmektedir. Klorofil ile yapılan çalışma sayısı klorofilin'e oranla kısıtlıdır.

Bu çalışmada et ve et ürünlerinin pişmesi ile sıklıkla oluşan IQ (2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline) ve MeIQx (2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline) HCA'larının genotoksik etkilerine karşı klorofil a ve klorofil b bileşiklerinin koruyucu etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında MeIQx ve IQ HCA'larının olası genotoksik etkilerini belirlemek için SMART yöntemi uygulanmıştır. Ortaya çıkabilecek genotoksik etkinin bileşiğin kendisinin mi yoksa parçalanma ürünlerinin mi oluşturduğunun araştırılması amacıyla hem normal metabolik aktiviteye (*mwh/mwh* ve *flr³/TM3 Ser*) hem de yüksek metabolik aktiviteye (NORR/NORR; *mwh/mwh* ve NORR/NORR; *flr³/TM3 Ser*) sahip *Drosophila* bireyleri kullanılmıştır. İkinci aşamada ise yeşil sebze ve meyvelerde büyük oranda bulunan klorofil a ve klorofil b pigmentlerinin IQ ve MeIQx'in genotoksitesine karşı koruyucu etkilerinin olup olmadığı araştırılmıştır.

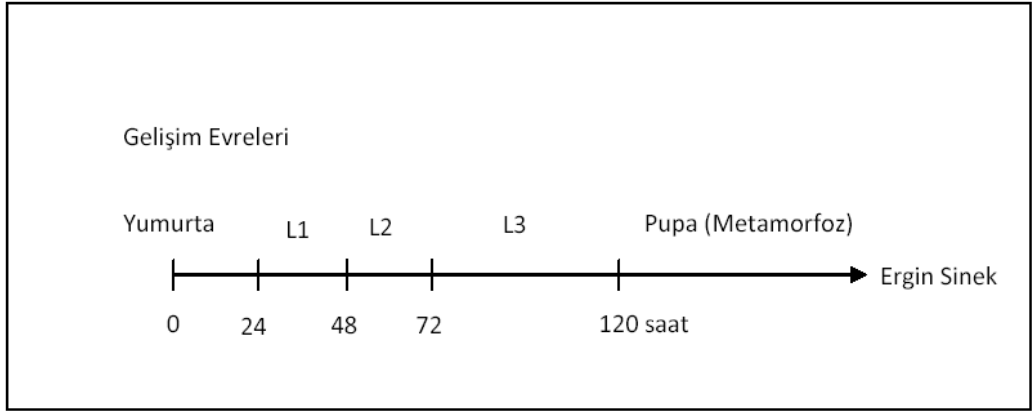
2. MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada, genotoksik ve antijenotoksik etkilerin araştırılmasında *D. melanogaster* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) kullanılmıştır. Bu test çaprazlama sonucu elde edilen transheterozigot larvaların kanat imajinal disk hücrelerinde heterozigotluğun kaybolarak fenotipte gözlenmesi esasına dayanır (Graf vd 1984, 1989). Kalıcı kanat preparatlarının hazırlanması ile istenilen zamanda değerlendirmenin yapılması, %70'lik alkolde *Drosophila* kanatlarının bozulmadan saklanması ve test edilecek maddenin imajinal disk hücrelerinde daha fazla sayıdaki hedef hücrelere ulaşması bu test sistemini diğer *Drosophila* testlerine göre daha avantajlı kılmaktadır.

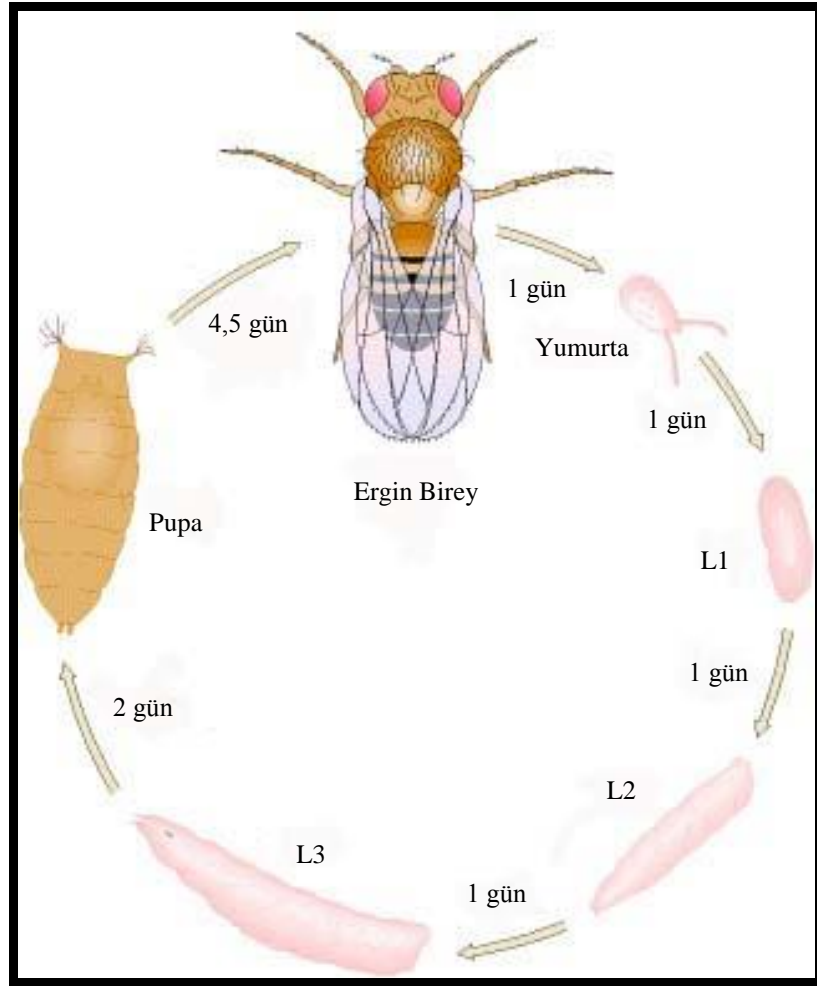
2.1. *Drosophila melanogaster*'in Hayat Döngüsü

Diptera ordosundan tam başkalaşım gösteren (holometabol) bir böcek olan *Drosophila melanogaster*, diploid bir organizma olup dört çift kromozom taşımaktadır (Rothwell 1993). İdeal yaşam koşulları olan 25°C ve %60 bağıl nem ortamında olgunlaşma süreci 9 ile 11 gün arasında değişmektedir. *D. melanogaster* hatları, ideal yaşam koşullarına (25°C ve %60 bağıl nem) sahip özel iklim odasında standart Lewis besin ortamında (Lewis ve Bacher 1968) kültüre alınmaktadır. Standart Lewis besin içeriği mısır unu (104 gr), şeker (94 gr), maya (19 gr), agar (5–6 gr), distile su (1020 ml) ve asit karışımı (6 ml)'indan oluşmaktadır.

Hazırlanan besi yerlerine aktarılan kültürlerin burada yumurta bırakarak çoğalmaları sağlanır. Beyaz renkte, 0.5 mm uzunluğunda ve 0.2 mm çapında oval yapıda olan *Drosophila* yumurtaları besi yeri üzerinde çıplak gözle rahatlıkla ayırt edilebilirler. Baş kısmında besin içerisine batmasını engelleyen iki tane filament bulunmaktadır. Bir günlük embriyonik gelişimin ardından yumurtadan çıkan larva üç farklı gelişim evresi (L1, L2, L3) geçirir (Şekil 2.1). 3. evre sonunda larva genellikle besi yerinden ayrılıp kültür şişelerinin duvarlarında kuru bir yere yerleşerek pupa evresine geçer. Son evre olan pupa evresi yaklaşık 4–4.5 gün sürer ve artık birey dışarıya çıkmaya hazırdır. *D. melanogaster*'in hayat döngüsü Şekil 2.2.'de gösterilmektedir.



Şekil 2.1. *Drosophila melanogaster*'in gelişim evreleri (Graf vd 1984)



Şekil 2.2. *Drosophila melanogaster*'in hayat döngüsü (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Pupadan ilk çıktıklarında sinekler normal ergin yapısından biraz farklı gözükmektedir. Vücut normale göre daha büyük ve açık renklidir. Yaklaşık bir saat içinde vücut rengi koyulaşarak normal halini alır. Başlangıçta kanatlar sıkıca katlanmıştır ve gri renkte gözükürler. Kanat damarlarına hemolenf pompalanınca kanatlar yavaşça açılır. Kanatlar ve vücudun diğer kısımları ilk başta ince ve hassas gözükmektedir. Ancak havanın oksijenine maruz kaldığında birkaç saat içinde sertleşir.

Erkek bireyler eşeyssel olgunluğa erişmiş halde pupadan çıkmalarına rağmen dişi bireylerin eşeyssel olgunluğa erişmesi için 6–12 saat gibi bir zamanın geçmesi gerekmektedir. Henüz döllenme yeteneğine sahip olmadıkları için virjin (bakire) olarak adlandırılırlar ve çalışmalarda genellikle virjin dişiler kullanılırlar. Ergin bireylerin ortalama yaşam süreleri 40–50 gün arasında değişmektedir (Graf vd 1992).

2.2. Kullanılan Hatların Genetik Yapısı

Kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde kullanılan hatlar üçüncü kromozomları üzerinde iki belirleyici gen taşımaktadırlar. Bu çalışmada sahip oldukları metabolik aktivitelere göre iki farklı kültür kullanılmıştır.

Normal metabolik aktiviteye sahip kültürler: Bu çaprazlamada kullanılan *Drosophila* hatlarının *stk.P450* enzim aktivitesi normal seviyededir. Çalışmada kullanılan bireylerin genetik yapısı aşağıdaki gibidir (Lindsley ve Grell 1968, Garcia-Bellido ve Dapena 1974, Lindsley ve Zimm 1992,);

- *mwh / mwh*
- *flr³ / ln (3LR) TM3, ri p^p sep bx^{34e} e^s Bd^s*

kısaca;

- *flr³ / TM3, Bd^s* olarak gösterilmektedir.

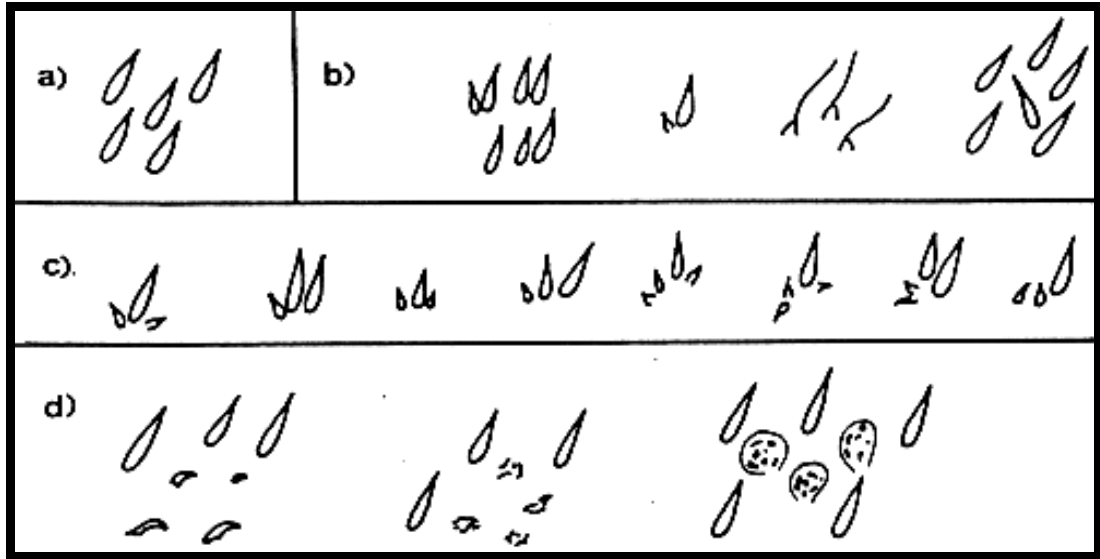
Yüksek metabolik aktiviteye sahip kültürler: Sonradan genetik çaprazlamalarla oluşturulan bu hatlar standart çaprazlamadaki bireylerden daha fazla seviyede enzim aktivitesine sahiptirler. Genetik yapıları aşağıdaki gibidir;

- NORR / NORR; *mwh* / *mwh*
- NORR / NORR; *flr*³ / *ln* (3LR) TM3, *ri p^p sep bx^{34e} e^s Bd^s*

kısaca;

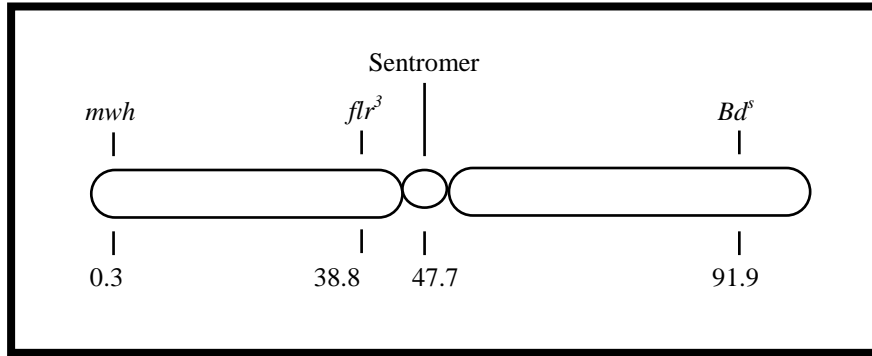
- NORR / NORR; *flr*³ / TM3, *Bd^s* olarak gösterilmektedir.

***mwh* (Multiple Wing Hair):** Çoklu kanat kılı aleli (*mwh*, 3-0.3) taşıyan hatlar kültür içersinde tamamen homozigot haldedir. Bu marker gen homozigot resesif halde iken fenotipte gözlenebilir. *mwh* mutasyonu, 3. kromozomun sol kolunun ucunda yerleşmiştir (Şekil 2.4) ve homozigot şartlarda normal yaban tip kılların yerine bir kökten çoklu kılların çıkması şeklinde fenotipe yansımaktadır (Şekil 2.3c).

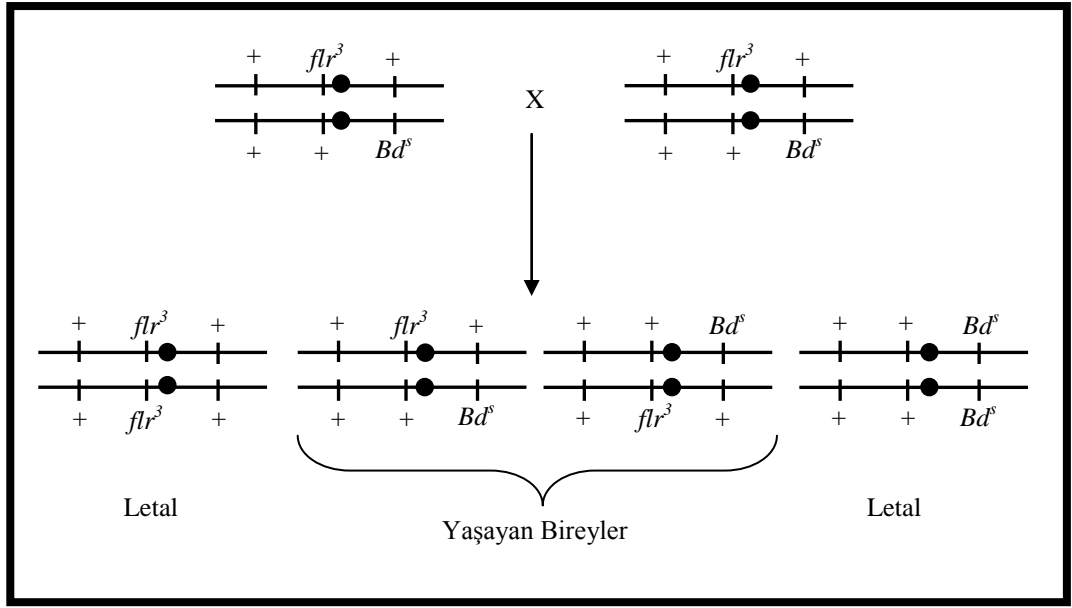


Şekil 2.3. Kanat trikomlarının görünümü a) normal b) farklılaşmış fakat ne *flare* ne de *mwh* olarak sınıflandırılmayacak trikomlar c) *mwh* trikomlar d) *flare* genotipe ait trikomlar (Graf vd 1984)

*flr*³ / TM3, *Bd*^s: *flare*³ (*flr*³, 3-38.8), kanatlardaki kılların yapısını etkileyen resesif mutasyondur. Kanatlardaki düz ve uzun kılların yerine kısalmış, nokta şeklinde, balon şeklinde veya kalın ve düzgün olmayan bir şekilde fenotipe yansıyabilmektedirler (Şekil 2.3d). 3. kromozomun sol kolunda fakat sentromere daha yakın konumda yerleşmiştir (Şekil 2.4). Homozigot halde embriyonik evrede öldürücü etkisi olmasına (Şekil 2.5) rağmen, disk hücrelerinde homozigot *flr* hücreler görülebilir ve mutant kıllar üretilebilir. Bireyleri, *flr* alelinin letal etkisinden korumak için çoklu inversiyonlar taşıyan TM3 dengeleyici kromozomu kullanılmaktadır ve homozigot halde yine letal etki gösteren dominant belirleyici, *Beaded-Serrate* (*BdS*) geni de TM3 üzerinde taşınmaktadır. Dengeleyici kromozom, letal etkisinden korunmak istenen genin bulunduğu homolog kromozomlardan birinde bulunur. Ayrıca dengeleyici kromozom rekombinasyonu baskılayarak mutasyon ve rekombinasyonun birbirinden ayrılmasını da sağlamaktadır. TM3 dengeleyici kromozomu 3. kromozom üzerinde bulunduğundan bu kromozomda meydana gelebilecek rekombinasyonu baskılamaktadır.

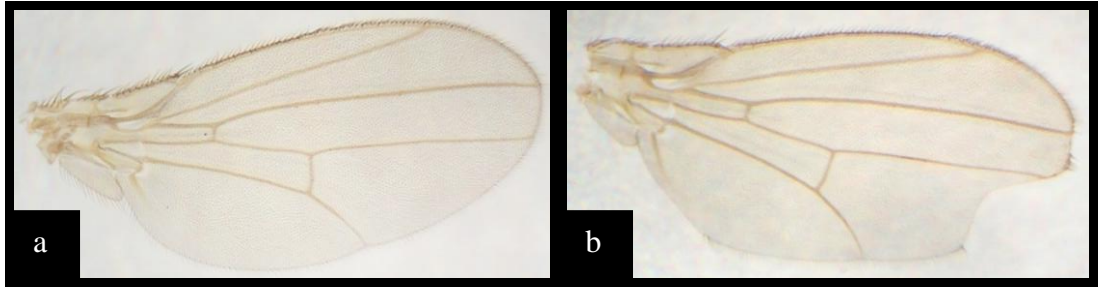


Şekil 2.4. Drosophila kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde kullanılan belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki yerleşimleri (Kaya 2000)



Şekil 2.5. *flr*³ / TM3, *Bd*^S bireylerindeki homozigot letal etkiler (Kaya 2000)

Belirleyici genleri taşıyan bireylerin çaprazlanmasından sonra iki farklı kanat fenotipine sahip bireyler oluşur. Normal fenotipteki kanatların kenarları düzgün bir yapı gösterirken, *Bd*^S (*Beaded Serrat*) genini taşıyan bireylerde kanat kenarları girintilidir (Şekil 2.6). Homozigot halde letal etki gösteren dominant *Bd*^S geni, TM3 dengeleyici kromozomunun üzerinde yer alır ve böylelikle TM3 dengeleyici kromozomuna sahip bireyler kanat fenotiplerinin incelenmesiyle diğer bireylerden kolaylıkla ayrılırlar.



Şekil 2.6. a) Dengeleyici kromozom taşımayan normal ve b) dengeleyici kromozom taşıyan *Bd*^S (*serrat*) bireylerinin kanat fenotipleri

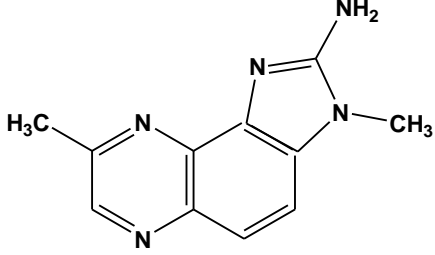
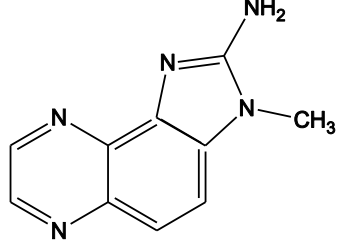
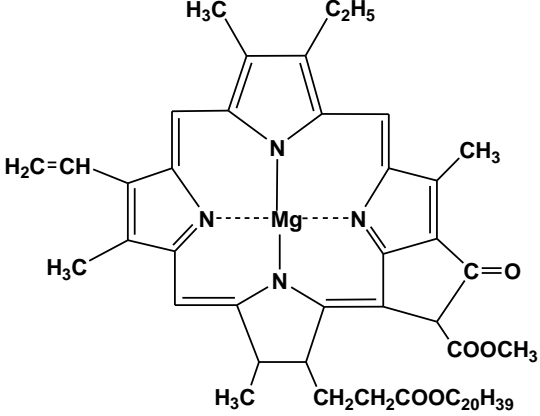
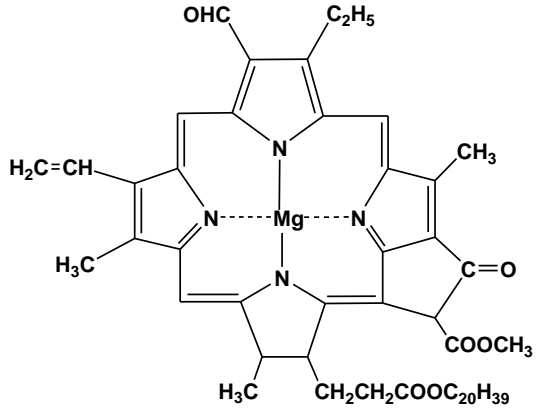
2.3. Kimyasal Gruplar

Bu çalışmada, et ve et ürünlerinin pişirilmesi ile kimyasal reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan IQ ve MeIQx (Toronto Research Chemicals Inc.) HCA'larının hem normal metabolik aktiviteye hem de yüksek metabolik aktiviteye sahip *D. melanogaster* hatlarında kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile genotoksik etkilerine karşı klorofil a ve klorofil b (Sigma) maddelerinin koruyucu etkileri araştırılmıştır.

Yapılan çalışmada kimyasalların çözündüğü ve genotoksik etkisi olmayan distile su negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Ayrıca test sistemimizin çalıştığından emin olmak için mutajenik etkisinin olduğunu bildiğimiz EMS (etil metan sülfonat) de pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Dimetil sülfoksit (DMSO) ise çözücü kontrol olarak kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan HCA bileşiklerinin ve klorofil gruplarının kimyasal yapıları Çizelge 2.1.'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan bileşiklerin kimyasal yapıları

K i m y a s a l A d ı (G r u p)	K i m y a s a l Y a p ı s ı
<p>M e I Q x (A m i n o - i m i d a z o)</p> <p>2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline</p> <p>Saflık derecesi: %100</p> <p>Moleküler ağırlık: 213.23</p> <p>Toronto Chemical Research (Katolog no:A606600)</p>	
<p>I Q (A m i n o - i m i d a z o)</p> <p>2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline</p> <p>Saflık derecesi: %100</p> <p>Moleküler ağırlık:198.22</p> <p>Toronto Chemical Research (Katolog no:A616500)</p>	
<p>K l o r o f i l a</p> <p>Klorofil a (C₅₅H₇₂MgN₄O₅)</p> <p>Saflık derecesi: %100</p> <p>Moleküler ağırlık:893.52</p> <p>Sigma (Katolog no:C5753-10MG)</p>	
<p>K l o r o f i l b</p> <p>Klorofil b (C₅₅H₇₀MgN₄O₆)</p> <p>Saflık derecesi: %100</p> <p>Moleküler ağırlık:907.5</p> <p>Sigma (Katolog no:C5878)</p>	

2.4. Çaprazlamaların Yapılması ve Transheterozigot Larvaların Elde Edilmesi

Deneysel süreçte normal ve yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerle iki farklı çaprazlama grubu oluşturuldu. $flr^3 / TM3, Bd^S$ hattında yumurta verimi daha yüksek olduğu için bu bireyler her iki çaprazlama grubunda da dişi bireyler olarak seçildi. Erkek bireyler olarak da mwh/mwh hatları kullanıldı. Öncelikle çaprazların oluşturulmasında yeterli sayıda erkek ve virjin dişi seçebilmek için kullanılacak olan kültürler daha önceden hazırlanan besi yerine aktararak sayıları artırıldı. Transheterozigot larvaların elde edilmesinde kullanılan dişi bireylerin virjin olduğundan emin olmak için 4'er saat aralıklarla pupadan çıkan dişi bireyler toplanarak yeni bir besin ortamına alındılar. Genç bireylerin üreme verimliliği daha fazla olduğundan 3-7 günlük bireyler kullanılmasına dikkat edildi. Her şişeye ortalama 35 ♀ ve 35 ♂ birey konularak çaprazlama şişeleri oluşturuldu. Yapılan çaprazlamalar aşağıda gösterildiği gibidir;

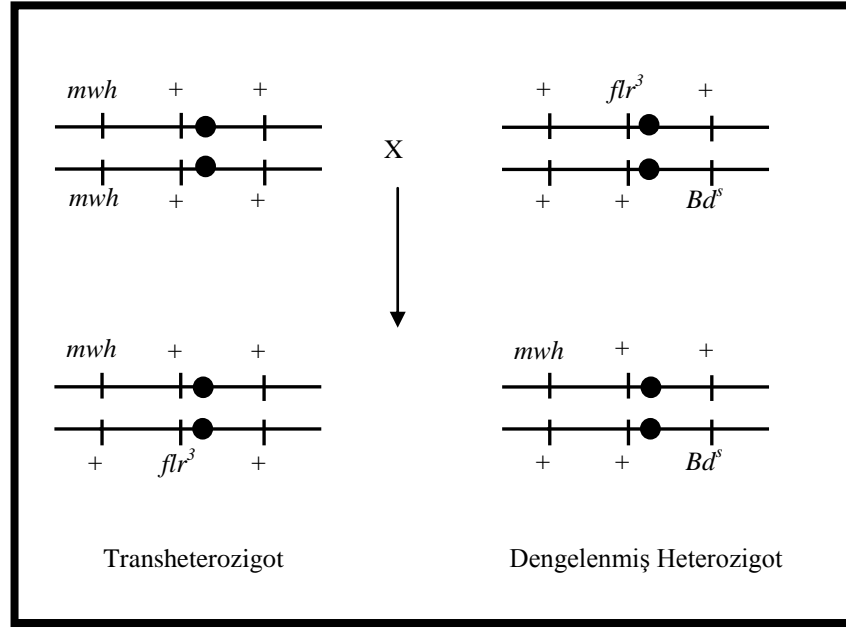
Normal metabolik aktiviteye sahip bireylerin çaprazlanması

$$\begin{array}{ccc} \text{♀} & & \text{♂} \\ & & \\ flr^3 / TM3, Bd^S & \text{X} & mwh / mwh \end{array}$$

Yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerin çaprazlanması

$$\begin{array}{ccc} \text{♀} & & \text{♂} \\ & & \\ NORR /NORR; flr^3 / TM3, Bd^S & \text{X} & NORR /NORR mwh / mwh \end{array}$$

Erkek ve dişi bireyler döllenme ve embriyogenezin gerçekleşmesi için en az bir gün aynı ortamda bırakıldılar. Daha sonra bireyler yeni bir besin ortamına alınarak 8 saat boyunca yumurta bırakmaları sağlandı. Böylece aynı larval evrede olan transheterozigot larvalar elde edilmiş oldu. Aynı bireyler yumurta toplama işlemi için defalarca kullanıldı. Larvaların elde edilebilmesi için yapılan çaprazlama Şekil 2.7.'de gösterilmektedir (Graf vd 1984, 1989, Van Schaik ve Graf 1991).

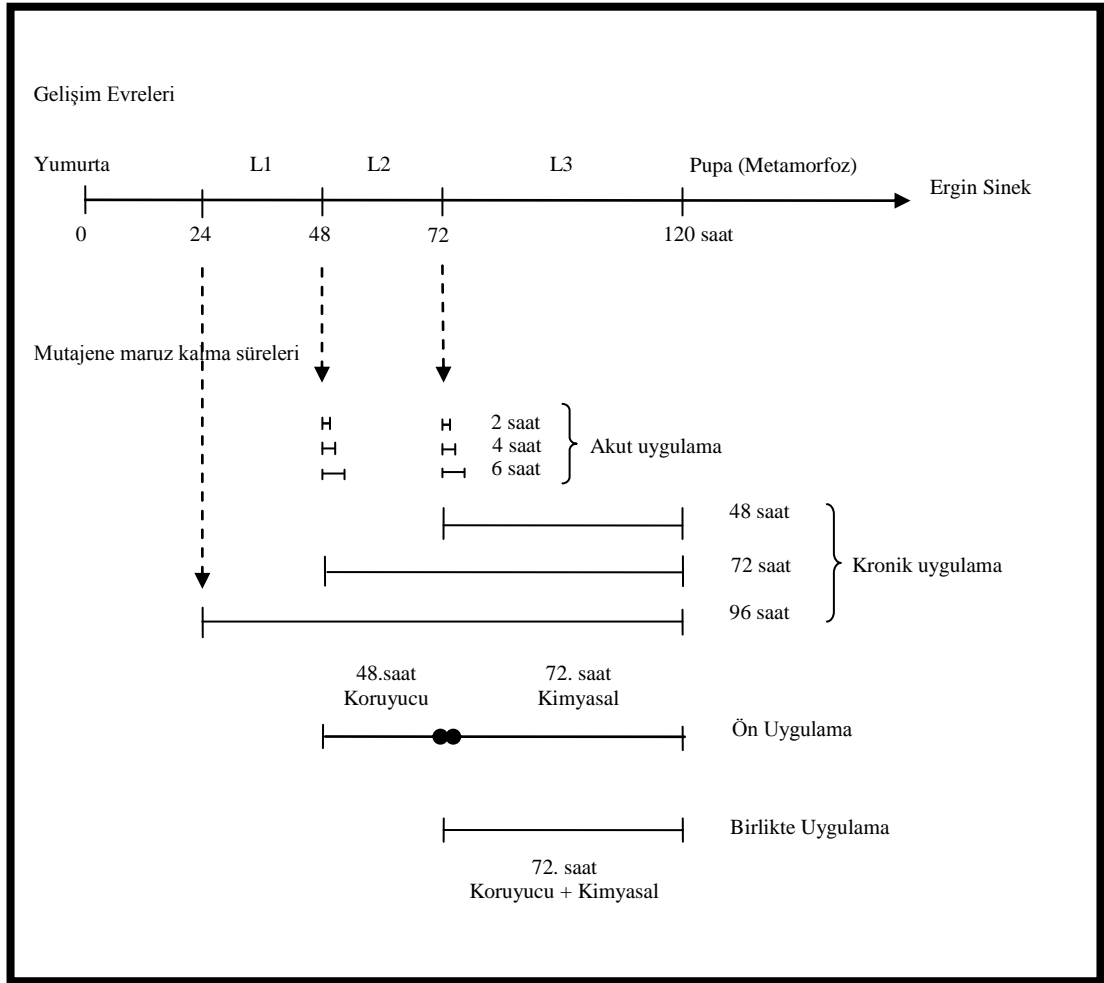


Şekil 2.7. Dengelenmiş heterozigot mwh/Bd^S ve transheterozigot mwh/flr^3 bireylerin elde edilebilmesi için mwh/mwh ve $flr^3/TM3, Bd^S$ bireyleri arasındaki çaprazlamalar (Kaya 2000)

2.5. Uygulama Gruplarının Oluşturulması ve Uygulamaların Yapılması

Öncelikle IQ ve MeIQx HCA'larının normal metabolik aktiviteye sahip bireylerde tek başlarına mutajenik ve/veya rekombinojenik etkileri araştırıldı. Daha sonra belirlenen 3 genotoksik doza karşı klorofil a ve klorofil b'nin iki dozu ile farklı zamanlarda uygulamalar yapıldı.

SMART yönteminde farklı zaman ve periyotlarda akut veya kronik uygulamalar yapmak mümkündür (Graf vd 1984). Planlanan çalışmanın amacına göre değişik uygulama zamanları seçilebilir (Şekil 2.8). Örneğin bir kimyasalın genotoksik etkisi belirlenmek istenirse çoğunlukla 72 ± 4 saatlik larvalar kullanılmaktadır. Eğer antigenotoksisite çalışması yapılacaksa hem 48 ± 4 saatlik hem de 72 ± 4 saatlik larvalar kullanılabilir.



Şekil 2.8. *Drosophila melanogaster*'de değişik uygulama zamanları (Graf vd 1984)

Drosophila larvalarındaki imajinal diskler, larval gelişim periyodu boyunca sürekli mitotik bölünme ile büyüyen hücrelerdir. Kanat imajinal disk hücreleri, birinci larval evrede yaklaşık 50–100 kadardır ve üçüncü larval evrede (72 saatlik larva) bu sayı yaklaşık 24.400'e ulaşmaktadır (Graf 1995). Larval gelişimdeki sürekli hücre bölünmesi, imajinal disklerdeki hedef hücre sayısının artmasına neden olur. Böylece mutajen uygulanan larvanın yaşının artması ile birlikte klon indüksiyon frekansının artması beklenir (Graf 1995). Bu yüzden Graf (1995), kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi için mutajen uygulanmasında en uygun zamanın 72. saat olduğunu bildirmektedir.

Bizim yapmış olduğumuz çalışmada, uygulama için iki farklı zaman periyodu seçildi. İlk başta 48 ± 4 saatlik larvalara klorofil a ve klorofil b ile ön uygulama yapılmasının ardından 72 ± 4 saatlik olduklarında HCA uygulaması yapıldı. İkinci grupta ise klorofil a ve klorofil b HCA'larla eş zamanlı olarak 72 ± 4 saatlik larvalara uygulandı (Şekil 2.8).

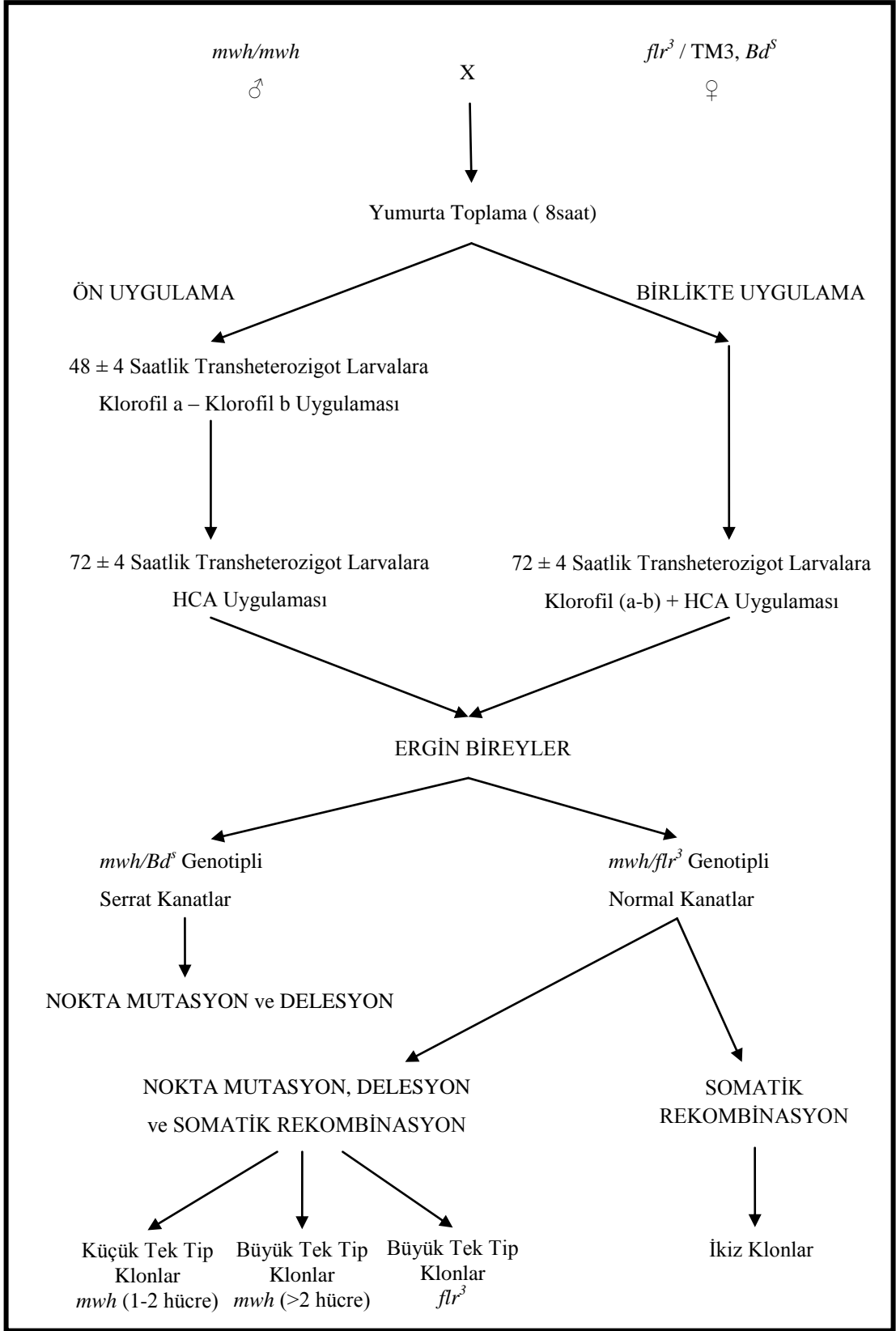
İzlenen deneysel yol aşağıda gösterilmektedir;

- 1) Ön çalışmalarla 72 ± 4 saatlik *Drosophila* larvalarında genotoksik etki gösteren HCA dozları bulundu.
- 2) Negatif kontrol distile su ve çözücü kontrol DMSO 48 ± 4 ve 72 ± 4 saatlik *Drosophila* larvalarına uygulandı.
- 3) Klorofil a ve klorofil b dozları 48 ± 4 ve 72 ± 4 saatlik *Drosophila* larvalarına uygulandı.
- 4) Pozitif kontrol EMS 72 ± 4 saatlik *Drosophila* larvalarına uygulandı.
- 5) Antimutajen ve HCA bileşiklerinin dozları 72 ± 4 saatlik *Drosophila* larvalarına eş zamanlı olarak uygulandı.
- 6) Antimutajen dozlarının 48 ± 4 saatlik *Drosophila* larvalarına ön uygulamalarının ardından larvalar 72 ± 4 saatlik olduklarında HCA dozları uygulandı.
- 7) Uygulama sonucunda elde edilen bireyler kanat preparatları hazırlanıncaya kadar %70'lik etil alkolde saklandı.
- 8) Elde edilen bireylerin kanatları Faure solusyonunda stereo mikroskop (Nikon SMZ645) altında vücuttan ayrılarak preparatları hazırlandı ve hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Nikon YS100) 40X büyütme objektifte incelendi.

Elde edilen veriler bilgisayarda MICROSTA paket programı ile değerlendirilerek istatistiksel farklılığın olup olmadığı tespit edildi.

Yukarıda verilen deneysel süreç hem normal metabolik aktiviteye sahip hem de yüksek metabolik aktiviteye sahip transheterozigot *Drosophila* larvalarına ayrı ayrı uygulandı.

Oluşturulan çaprazlama şişelerindeki bireyler taze besi yerine alınarak sekiz saat boyunca buraya yumurta bırakmalarına izin verildi. Toplanan döllenen yumurtalardan çıkan larvalar kurulan deneysel düzeneğe göre ikinci (48 ± 4 saat sonra) veya üçüncü larval evreye ulaştığında (72 ± 4 saat sonra), içinde buldukları besinler musluk suyuyla yıkanarak ve ince gözenekli metal elekten geçirilerek ayrıldılar. Uygulama ortamı olarak kullanılan plastik tüpler içerisine birer ölçü (~ 4.5 gr) hazır *Drosophila* besini (Drosophila Instant Medium) (Formula 4-24, Carolina Biological Supply Co., Burlington, NC, ABD) konuldu. Besinler uygulamadan hemen önce hazırlanmış kimyasal derişimlerinin 9 ml'si ile ıslatıldı. 72 ± 4 saatlik larvalar için besin heterosiklik aminlerin veya heterosiklik amin + klorofil bileşiklerinin değişik dozlarıyla, 48 ± 4 saatlik larvalar için ise klorofil a ve klorofil b dozlarıyla ıslatıldı. Her bir tüp içerisine musluk suyu altında ayrılan larvalardan 1–2 spatül dolusu (yaklaşık 100 larva) konuldu ve tüplerin ağızları sünger tıkaçlarla kapatıldı. Kimyasal uygulanan tüpler $25 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 'deki inkübatöre (Sanyo) konuldu. Böylece 72 ± 4 saatlik larvaların, 48 saat süresince ortama konulan kimyasal karışımı ile ıslatılmış hazır besinle beslenerek kronik olarak kimyasala maruz kalmaları sağlandı. 48 ± 4 saatlik larvalar ise bir gün sonra aynı saatte yani 72 ± 4 saatlik olduklarında musluk suyu altında tekrar yıkandılar ve böylece bir gün önce uygulanmış olan antimitojenler ortamdaki uzaklaştırıldı. Daha sonra hazır besin heterosiklik aminlerin farklı dozlarıyla ıslatılarak yeni bir uygulama tüpü hazırlandı yıkanan larvalar buraya aktarıldı. Larvalar, ergin sinek haline gelene kadar inkübatörde bekletildi. Yapılan deneysel sürecin kısa özeti Şekil 2.9'da gösterilmiştir.



Şekil 2.9. *Drosophila melanogaster*'de kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin şematik olarak gösterilmesi

2.6. Ergin Bireylerin Toplanması ve Kanat Preparatlarının Hazırlanması

Uygulamalardan sonra ergin hale gelip pupadan çıkan bireyler eterle bayılarak %70'lik etil alkol içerisinde +4°C'de kanat preparatları hazırlanmaya kadar saklandı. Preparatlar hazırlanacağı zaman bu bireyler saat camına alınarak kanat morfolojilerine göre ayrıldılar.

Preparatı hazırlanmak istenen fenotipe sahip bireyler distile su içerisine aktarıldılar. Çukur lam üzerine 1–2 damla faure solusyonu damlatılarak distile su içerisindeki bireyler birer birer solüsyon içerisine alındılar. Sonra ince uçlu pens ve iğne yardımıyla stereo mikroskop (Nikon SMZ645) altında bireylerin kanatları vücutlarından ayrıldı. Ayırma işleminde, kanada ve üzerindeki kıllara zarar verilmemesine dikkat edildi. Aynı bireye ait kanatlar çiftler halinde düzgün bir şekilde lam üzerine yerleştirildi. Çalışılan her bir derişim için hem normal ve hem de serrat kanatlı bireylerden rastgele olarak seçilen 40 bireyin (80 kanat) kanat preparatları hazırlandı. Frei ve Würçler (1995) her bir derişim için 80 kanadın istatistiki değerdendirmelerde yeterli olduğunu belirtmişlerdir.

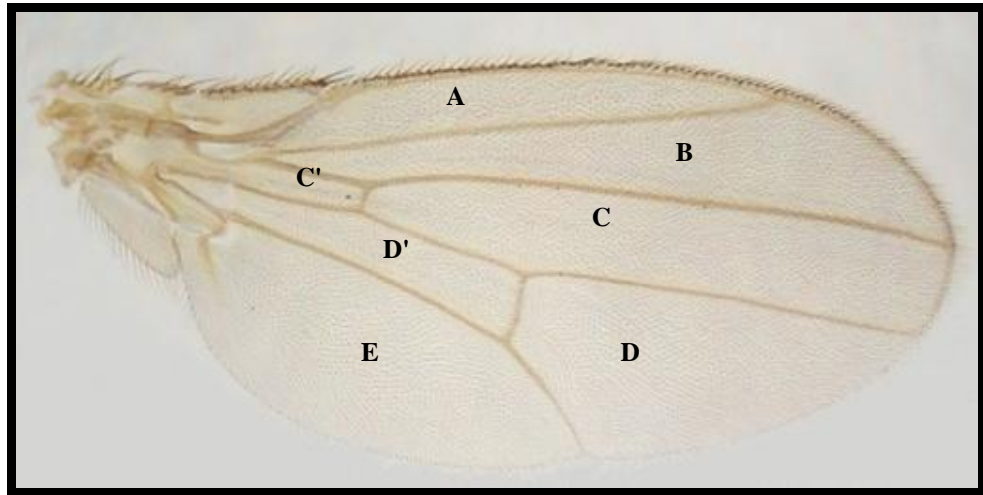
Hazırlanan preparatlar bir gün süre ile tozsuz bir ortamda kuruması için bekletildi. Kuruyan preparatların üzerine 1–2 damla Faure solüsyonu damlatılarak lamel (24X60 mm) ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı. Preparatlar kurutma kağıdına sarıldıktan sonra kanatların düzgün şekilde sabitlenmesi amacıyla üzerlerine metal bloklar konarak iki gün kurumaya bırakıldı. Preparatlar tamamen kuruduktan sonra suyla yıkanarak solüsyon kalıntısı temizlendi ve sayıma hazır hale getirildi.

Kanat preparatlarının yapımında kullanılan Faure solusyonu Kaya'nın (2000) belirttiğı gibi Gum Arabic (30 gr), Gliserol (20 ml), Kloral hidrat (50 gr) ve Distile Su (50 ml) kullanılarak hazırlanmıştır.

Daha önce de bahsedildiği gibi üçüncü kromozom üzerinde bulunan *Beaded Serrat* geni kanat kenarlarında girintilerin olmasına neden olmaktadır. Bu nedenle uygulamadan elde edilen bireyler kanat morfolojilerine göre normal kanatlı (transheterozigot *mwh/flr³*) ve serrat kanatlı (dengelenmiş heterozigot *mwh/TM3, Bd^S*) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. Bu kanatlardan normal fenotipe sahip (*mwh/flr³*) kanatlar hem mutasyon hem de rekombinasyon sonucu oluşan klonları içermesine karşın serrat (*mwh/TM3, Bd^S*) kanatlar dengeleyici kromozomun rekombinasyonu baskılaması nedeniyle sadece mutasyon sonucu oluşan klonları içermektedir (Zordan vd 1994, Kaya vd 1999). Hem mutasyonel olayları hem de rekombinasyonu belirleyebilmek için her iki fenotipteki kanatların preparatları ayrı ayrı hazırlanarak değerlendirildi.

2.7. Kanat Preparatlarının Mikroskoptaki Analizi

Hazırlanan kanat preparatları ışık mikroskobunda (Nikon YS100) 40X büyütme objektif ile incelendi. Graf vd'nin (1984) tanımladığı gibi kanat üzerindeki sayım yapılacak alanlar incelemede kolaylık sağlaması açısından A, B, C, C', D, D' olarak gruplandırıldı (Şekil 2.10). Her bir grup için kanadın dorsal ve ventral yüzündeki hücre tabakaları mikrovida yardımıyla kontrol edilerek mutant klonların olup olmadığı incelendi ve bunların kayıtları tutuldu (Kaya 2000).



Şekil 2.10. Kanat sektörlerinin gruplandırılması

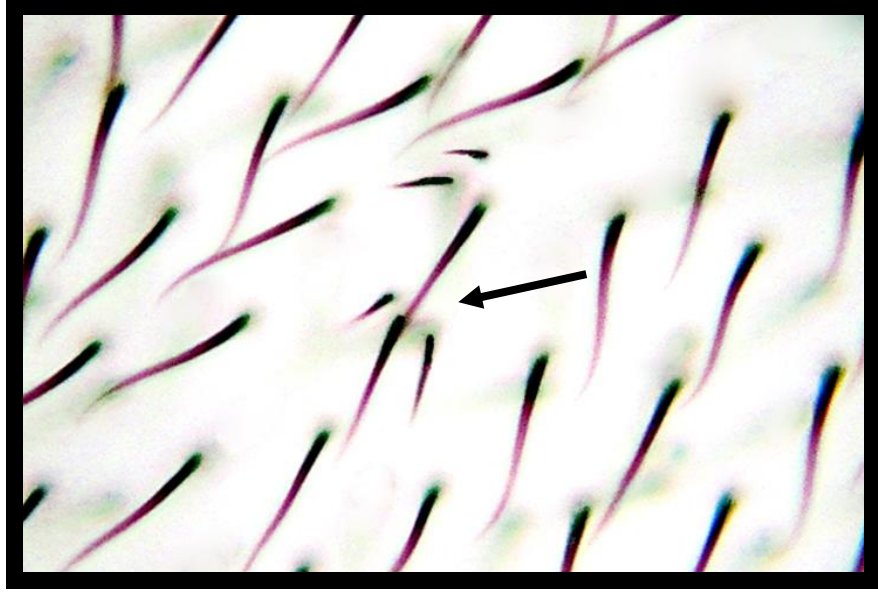
Sayımda mutant klonlar, küçük tek tip klon, büyük tek tip klon ve ikiz klon olmak üzere üç kategoride değerlendirildi. Bu sınıflandırmanın biyolojik açıdan anlamlı olduğu Graf vd (1984) tarafından gösterilmiştir.

Küçük Tek Tip Klon: Sadece 1 veya 2 tane *mwh* hücresinden oluşan klon tipidir (Şekil 2.11).

Büyük Tek Tip Klon: 3 veya daha fazla sayıda *mwh* hücre içeren klonlar *mwh* büyük tek tip klonlar (Şekil 2.12), 4 veya daha fazla sayıda *flare* hücrelerinden oluşan klonlar ise *flare* büyük tek tip klonlar olarak sınıflandırılır (Şekil 2.13). Dörtten daha az sayıda gözlenen sadece *flare* fenotipteki trikoma oluşturduğu klonların varyasyon nedeniyle olduğu, bu yüzden *flare* fenotipteki klonlar için dörtten daha fazla sayıdaki hücrelerin sayıma dahil edilmesi gerektiği (Szabad vd 1983) belirtildiği için sayımda dörtten daha fazla sayıdaki flare klonlar dikkate alınmıştır.

İkiz Klonlar: *mwh* ve *flare* hücrelerinin aynı klon içerisinde yan yana bulunduğu klon tipidir (Şekil 2.14).

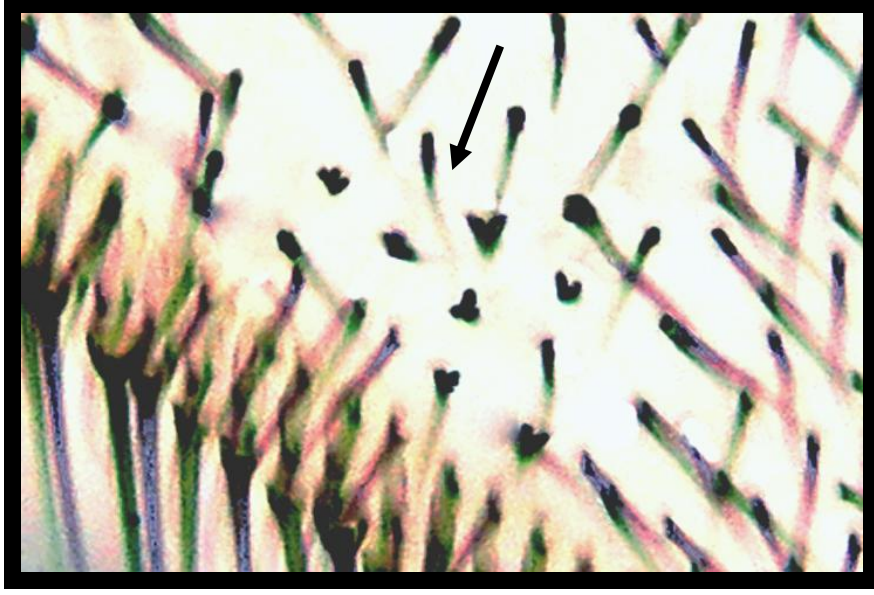
mwh ve *flr* hücreleri aynı klon içerisinde bulunabildikleri gibi yan yana iki ayrı klon olarak da bulunabilirler. Birbirine komşu iki mutant klon arasında üç yada daha fazla sayıda yaban tip trikoma sahip hücre sırası varsa bunlar iki farklı klon olarak değerlendirildi (Graf vd 1984). *mwh* klonlar nokta mutasyon, delesyon, ayrılmama ve rekombinasyon sonucu ortaya çıkmaktadırlar (Şekil 2.15). *flare* klonlar nokta mutasyon, delesyon ve belki de çifte crossing-over sonucu, ikiz klonlar ise flare geni ile sentromer arasında gerçekleşen bir rekombinasyon sonucu ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.15) (Graf vd 1984).



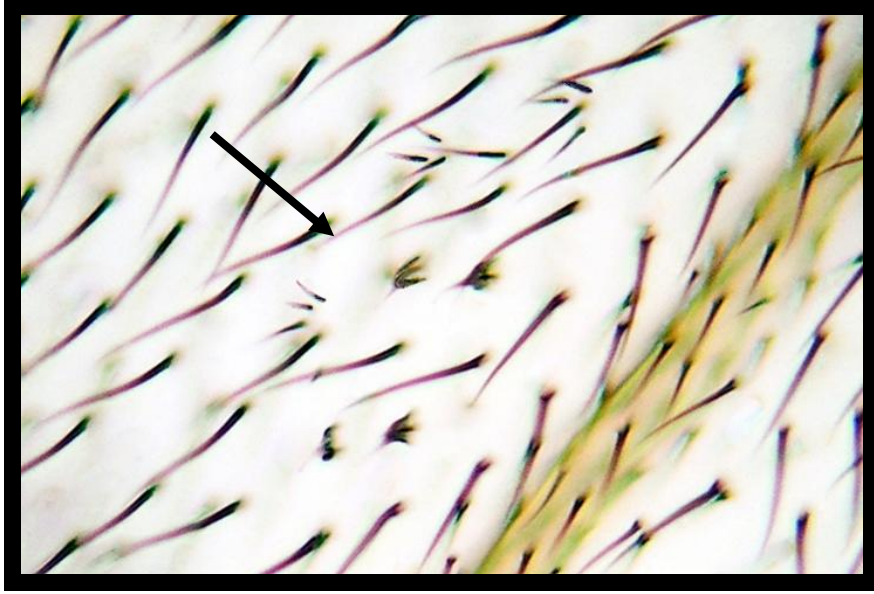
Şekil 2.11. Küçük tek tip *mwh* mutant klonların görünümü



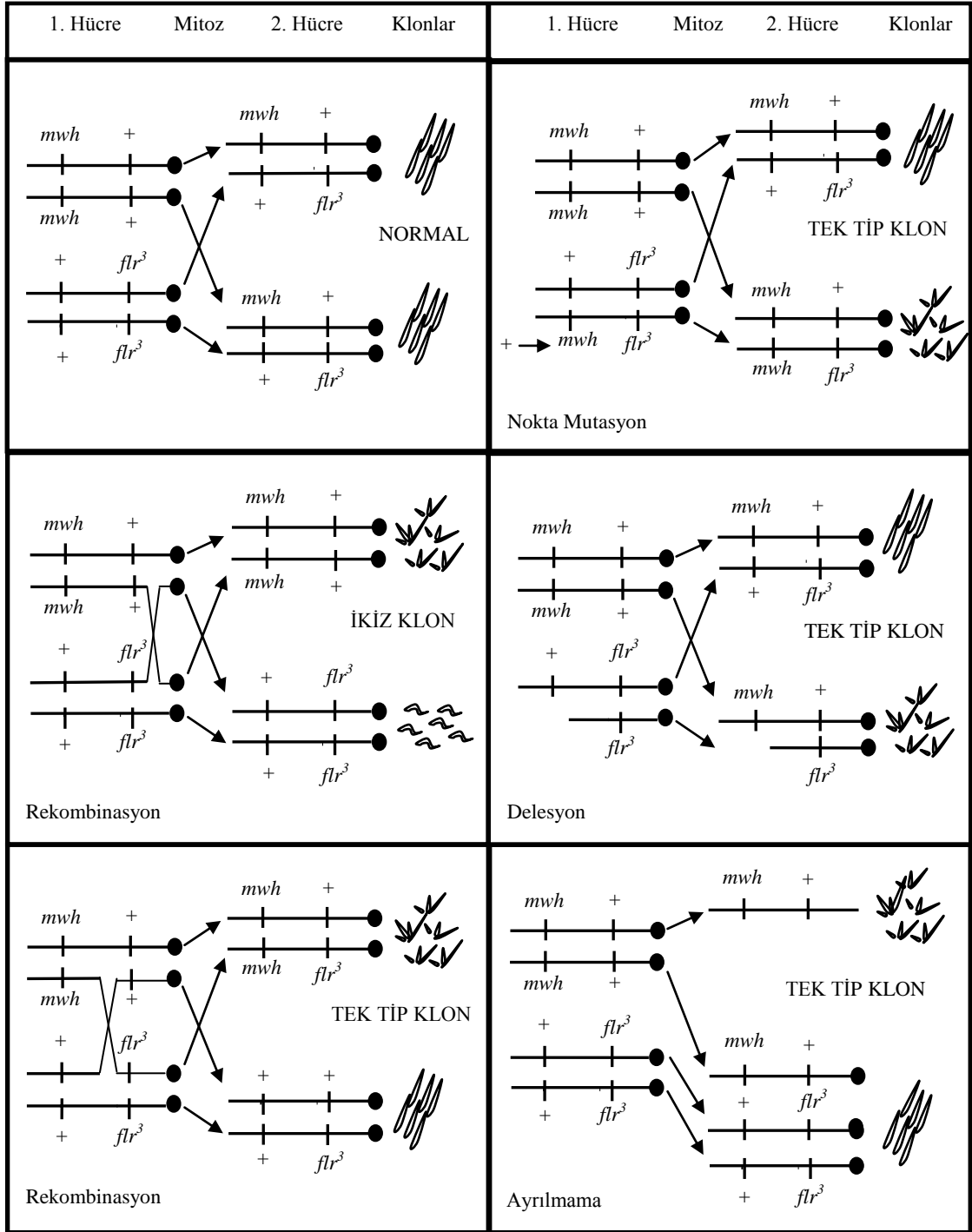
Şekil 2.12. Büyük tek tip *mwh* mutant klonların görünümü



Şekil 2.13. Büyük tek tip *flr* mutant klonların görünümü



Şekil 2.14. İkiz mutant klonların görünümü



Şekil 2.15. mwh/flr^3 genotipindeki bireylerde görülebilecek genetik anormaliler (Graf vd 1984)

2.8. Klon İndüksiyon Frekansının Hesaplanması

Kronik uygulamalarda her hücrede ve her hücre bölünmesindeki ortalama indüksiyon frekansı aşağıdaki formül ile hesaplanmaktadır (Szabad vd 1983).

$$f = \frac{n}{NC} \times 10^{-5}$$

Sadece *mwh* klonlar göz önüne alınırsa, denklemdeki “ f ” *mwh* klonların indüksiyonunun ortalama frekansını, “ n ” gözlenen toplam *mwh* klon sayısını, “ N ” analiz edilen kanat sayısını ve “ C ” bir kanat üzerindeki incelenebilecek hücre sayısını göstermektedir. Daha önceki yapılan çalışmalarla bu sayının 24.400 olduğu belirlenmiştir (Garcia-Bellido ve Merriam 1971).

2.9. Verilerin Değerlendirilmesi

Sayımlar sonucunda elde edilen veriler *Drosophila* SMART için hazırlanmış olan bilgisayar programı (Microsta) yardımıyla değerlendirildi. Değerlendirme yapılmadan önce iki farklı hipotez kuruldu. Orijinal (null) hipotez’de (Ho) uygulamalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark olmadığı varsayıldı. Alternatif hipotez’de (Ha) ise uygulama grubundaki indüklenen mutasyon oranının kontrol grubundan m defa daha fazla olduğu varsayıldı. Orijinal ve alternatif hipotezler Binomial Şartlı Test kullanılarak hesaplandı.

Hesaplama sonucunda eğer uygulama grubundaki (nt) mutant sektör sayısı çizelge değerine eşit veya büyükse Ho red edildi. Aynı şekilde, kontrol grubundaki (nc) mutant sektör sayısı eğer çizelge değerine eşit veya büyükse HA red edildi. Orijinal ve alternatif hipotezlerin kabul veya red edilmesinde karar verilirken Kastenbaum ve Bowman (1970) çizelgesinden yararlanıldı.

Değerlendirmenin nasıl yapıldığı Çizelge 2.2’de gösterilmiştir (Selby ve Olson 1981, Frei ve Würzler 1988).

Çizelge 2.2. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi

HİPOTEZLER		H _A	
		KABUL (1-β)	RED (β)
H ₀	KABUL (1-α)	ÖNEMSİZ FARK $P=(1-\alpha)(1-\beta)=1-\alpha-\beta+\alpha\beta$	NEGATİF $P=(1-\alpha)\beta=\beta-\alpha\beta$
	RED (α)	POZİTİF $P=\alpha(1-\beta)=\alpha-\alpha\beta$	ZAYIF POZİTİF $P=\alpha\beta$

Bu değerlendirmelerle sonuçlar; H₀ ve H_A'nın kabul veya red edilmesine göre Çizelge 2.2. kullanılarak pozitif (+), zayıf pozitif (z), önemsiz fark (i) veya negatif (-) olarak değerlendirildi.

3. BULGULAR

Drosophila kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile IQ ve MeIQx'in genotoksik etkilerine karşı klorofil a ve klorofil b'nin koruyucu etkilerini belirlemek amacıyla öncelikle bu iki heterosiklik amin için genotoksik doz taraması yapılmıştır. Her iki kimyasal için 1, 2 ve 5 ppm dozlarının kullanılması uygun bulunmuştur. Ayrıca negatif, pozitif ve çözücü kontrol gruplarıyla birlikte klorofil a ve klorofil b'nin de genotoksik potansiyeline bakılmıştır. Gerek heterosiklik aminler gerekse klorofiller %0.5'lik DMSO içerisinde çözülmeleri nedeniyle bu bileşikler distile su yerine DMSO ile karşılaştırılarak istatistiksel analizleri yapılmıştır. Ancak DMSO bileşiğinin etkisini belirlemek için sonuçlar distile su sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Hem normal hem de yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerle yapılan çaprazlamalardan elde edilen kontrol gruplarının sonuçları Çizelge 3.1–3.2'de verilmiştir. DMSO, klorofil a ve klorofil b'nin her iki dozunun sonuçları negatif kontrol olarak kullanılan distile suyun sonuçları ile karşılaştırıldığında genotoksik etki bulunmamıştır (Çizelge 3.1, 3.2).

Çizelge 3.1. Normal metabolik aktiviteye sahip bireylerde kontrol gruplarının 48±4 ve 72±4 saatlik larvalara uygulamalarından elde edilen veriler (N.K)

Dozlar	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 cells) (m=2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 cells) (m=5)			İkiz klonlar (m=5)			Toplam mwh klonları (m=2)			Toplam klonları (m=2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10 ⁻⁵ hücre)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
72. saat uygulamaları																	
Distile su	80	16	0,20		1	0,01		0	0,00		17	0,21		17	0,21		0,87
1 mM EMS	80	163	2,04	+	89	1,11	+	32	0,40	+	273	3,41	+	284	3,55	+	13,99
% 0,5 DMSO	80	23	0,29	-	3	0,04	i	0	0,00	i	26	0,33	i	26	0,33	i	1,33
Klf a 0,5 µM	80	14	0,18	-	4	0,05	i	2	0,03	i	17	0,21	-	17	0,21	-	0,87
Klf a 1 µM	80	20	0,25	-	2	0,03	-	3	0,04	i	25	0,31	-	25	0,31	-	1,28
Klf b 0,5 µM	80	19	0,24	-	5	0,06	i	2	0,03	i	26	0,33	-	26	0,33	-	1,33
Klf b 1 µM	80	23	0,29	-	3	0,03	i	0	0,00	i	27	0,34	-	27	0,34	-	1,38
48. saat uygulamaları																	
Distile su	80	17	0,21		0	0,00		1	0,01		18	0,23		18	0,23		0,92
% 0,5 DMSO	80	22	0,26	i	1	0,01	i	0	0,00	i	22	0,26	i	23	0,29	i	1,13
Klf a 0,5 µM	80	11	0,14	-	0	0,00	i	0	0,00	i	11	0,14	-	11	0,14	-	0,56
Klf a 1 µM	80	10	0,13	-	2	0,03	i	0	0,00	i	12	0,15	-	12	0,15	-	0,61
Klf b 0,5 µM	80	8	0,10	-	1	0,01	i	0	0,00	i	9	0,11	-	9	0,11	-	0,46
Klf b 1 µM	80	11	0,14	-	1	0,01	i	0	0,00	i	12	0,15	-	12	0,15	-	0,61

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.

Çizelge 3.2. Yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerde kontrol gruplarının 48±4 ve 72±4 saatlik larvalara uygulamalarından elde edilen veriler (N.K)

Dozlar	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 cells) (m=2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 cells) (m=5)			İkiz klonlar (m=5)			Toplam mwh klonları (m=2)			Toplam klonları (m=2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10 ⁻⁵ hücre)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
72. saat uygulamaları																	
Distile su	72	44	0,61		3	0,04		3	0,04		50	0,69		50	0,69		2,84
1 mM EMS	80	72	0,90	+	10	0,13	i	3	0,04	-	82	1,025	+	85	1,06	+	4,20
% 0,5 DMSO	72	41	0,57	-	4	0,06	i	0	0,00	-	44	0,61	-	45	0,63	-	2,50
Klf a 0,5 µM	80	54	0,68	-	4	0,05	-	2	0,03	i	59	0,74	-	60	0,75	-	3,02
Klf a 1 µM	80	46	0,58	-	10	0,13	i	1	0,01	i	56	0,70	-	57	0,71	-	2,86
Klf b 0,5 µM	80	60	0,75	-	4	0,05	-	2	0,03	i	65	0,81	-	66	0,83	-	3,32
Klf b 1 µM	80	55	0,69	-	11	0,14	i	0	0,00	i	66	0,83	-	66	0,83	-	3,38
48. saat uygulamaları																	
Distile su	80	32	0,40		2	0,03		1	0,01		35	0,44		35	0,44		1,79
% 0,5 DMSO	80	35	0,44	-	2	0,03	i	2	0,03	i	39	0,49	-	39	0,49	-	1,99
Klf a 0,5 µM	80	38	0,48	-	4	0,05	i	0	0,00	i	41	0,51	-	42	0,53	-	2,10
Klf a 1 µM	80	23	0,29	-	2	0,03	i	3	0,04	i	26	0,33	-	28	0,35	-	1,33
Klf b 0,5 µM	80	31	0,39	-	8	0,10	i	2	0,03	i	39	0,49	-	41	0,51	-	1,99
Klf b 1 µM	80	41	0,51	-	0	0,00	i	0	0,00	i	41	0,51	-	41	0,51	-	2,10

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05

3.1. Normal Metabolik Aktivite Uygulamaları

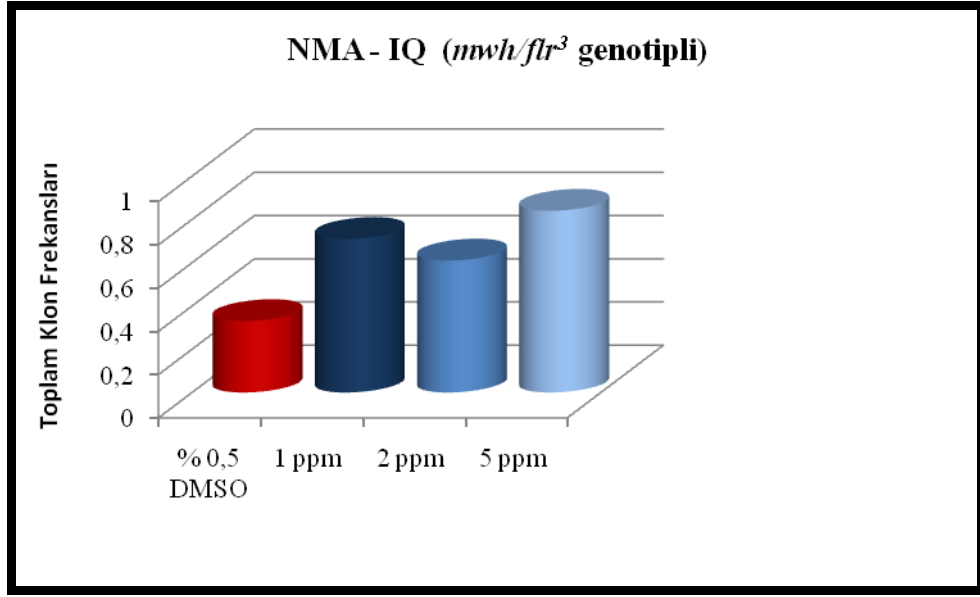
3.1.1. IQ uygulamaları

Amino-imidazo grubu heterosiklik amin olan IQ'nun normal metabolik aktiviteye sahip 72 ± 4 saatlik larvalarda yapılan ön çalışmalarla 1, 2 ve 5 ppm'lik dozlarının genotoksik etkileri belirlenmiştir. IQ'nun çalışılan üç derişiminde (1, 2 ve 5 ppm), *mwh/flr³* genotipli yani normal kanat fenotipinde olan bireylerde gözlenen mutant klon sayısının arttığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlar DMSO ile karşılaştırıldığında pozitif olarak kaydedilmiştir. Aynı dozlar için *mwh/TM3* genotipindeki yani serrat kanat fenotipindeki bireylerden elde edilen sonuçlar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel önemde bir farkın olmadığı gözlenmiştir. Normal fenotipli kanatlar ile serrat fenotipli kanatların sonuçlarının incelenmesi, meydana gelen genotoksik etkinin mutasyonel olaylar sonucunda mı yoksa rekombinasyon sonucunda mı ortaya çıktığını karar vermemize yardımcı olur. Normal fenotipte ortaya çıkan pozitif sonuçlar hem mutasyon hem de rekombinasyon sonucunda meydana gelmektedir. Ancak serrat kanatlı fenotipe sahip bireylerde bulunan dengeleyici kromozom (TM3) rekombinasyonu engellediği için pozitif sonuçlar sadece mutasyondan kaynaklanmaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlara bakıldığında serrat kanatlarda mutasyon gözlenmemektedir. Dolayısıyla normal kanatlı bireylerde elde edilen pozitif sonuçlar rekombinasyon sonucunda ortaya çıkmıştır (Çizelge 3.3). Toplam klonlardaki frekans dağılımı Şekil 3.1 ve Şekil 3.2'de görülmektedir. Serrat kanatlı bireylerde pozitif sonuçların bulunmaması nedeniyle çalışmanın bundan sonraki kısımlarında normal metabolik aktiviteye sahip bireyler açısından *mwh/TM3* genotipindeki bireylerin kanat preparatlarının hazırlanmasına gerek görülmemiştir.

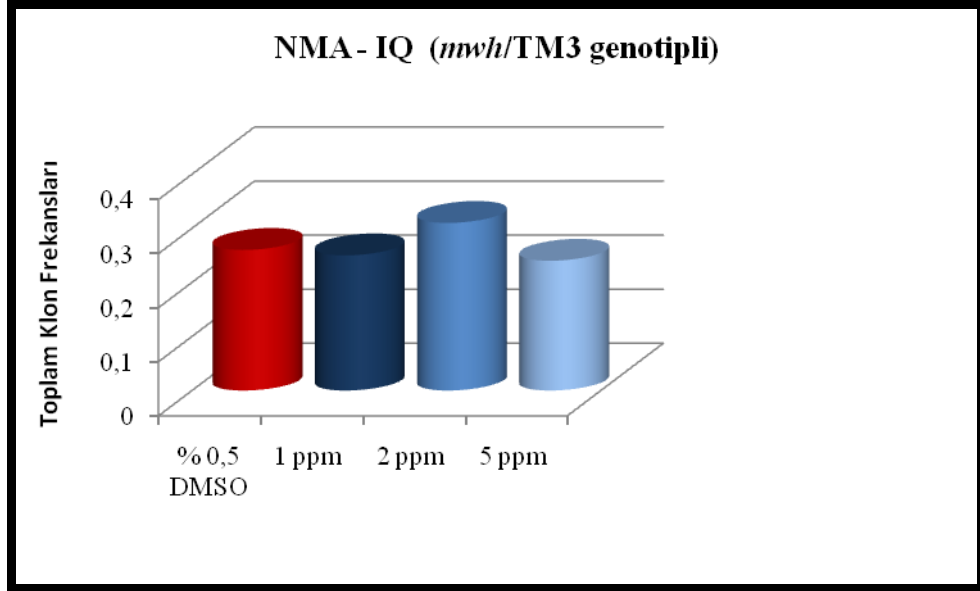
Çizelge 3.3. IQ uygulamasından elde edilen normal ve serrat kanatlı bireylerin verileri (NMA)

Dozlar	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 cells) (m=2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 cells) (m=5)			İkiz klonlar (m=5)			Toplam mwh klonları (m=2)			Toplam klonları (m=2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10 ⁻⁵ hücre)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
N. Kanat																	
%0,5 DMSO	80	23	0,29	-	3	0,04	i	0	0,00	i	26	0,33	i	26	0,33	i	1.33
1 ppm	80	43	0,54	+	9	0,11	+	5	0,06	i	57	0,71	+	57	0,71	+	2,92
2 ppm	80	36	0,45	+	11	0,14	+	2	0,03	i	49	0,61	+	49	0,61	+	2,51
5 ppm	80	48	0,60	+	13	0,16	+	6	0,08	+	66	0,83	+	67	0,84	+	3,43
S. Kanat																	
%0,5 DMSO	80	19	0,24	-	2	0,03	-				21	0,26	-	21	0,26	-	1.08
1 ppm	80	14	0,18	-	6	0,08	i				20	0,25	-	20	0,25	-	1,02
2 ppm	80	20	0,23	-	5	0,06	i				25	0,31	i	25	0,31	i	1.12
5 ppm	70	17	0,24	i	0	0,00	-				17	0,24	-	17	0,24	-	0.99

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.



Şekil 3.1. *mwh/flr³* genotipli bireylerde IQ'nun toplam klon frekans dağılımları (NMA)



Şekil 3.2. *mwh/TM3* genotipli bireylerde IQ'nun toplam klon frekans dağılımları (NMA)

3.1.1.1. Eş zamanlı uygulamalar: klorofil + IQ (NMA)

Bu uygulama grubunda IQ'nun her bir dozunun klorofil a ve klorofil b koruyucularının dozları ile hazırlanmış karışım solüsyonu 72 ± 4 saatlik yani üçüncü evre larvaların besinlerine karıştırılarak uygulama yapılmıştır. Birlikte uygulamaların sonuçlarını karşılaştırmak için her bir kimyasal dozu kendi uygulama grubu için kontrol olarak seçilmiştir. Her bir doz tek başına incelendiğinde genotoksik etki göstermektedir (Tablo 3). $0.5 \mu\text{M}$ Klorofil a + 2 ppm ve $0.5 \mu\text{M}$ Klorofil b + 2 ppm IQ dozları hariç diğer tüm gruplar klorofil a ve klorofil b dozları ile birlikte uygulandıklarında klon indüksiyon frekanslarında gözle görülür şekilde azalma olmuştur. (Çizelge 3.4). Her iki dozda da klon indüksiyon frekansı artış göstermemekle birlikte toplam klonlardaki frekans değişimi istatistiksel olarak negatif sonuç vermiştir. Genel olarak klorofil maddelerinin artan dozuna bağlı olarak genotoksik etkide azalış gözlenmektedir. (Çizelge 3.4). Toplam klonlardaki frekans dağılımı Şekil 3.3'de görülmektedir.

3.1.1.2. Ön uygulamalar: 48 ± 4 saat klorofil + 72 ± 4 saat IQ (NMA)

Bu grup uygulamalarda larvalar 48 ± 4 saatlik olduklarında klorofil a ve klorofil b maddeleri ayrı ayrı uygulandı. Larvalar 72 ± 4 saate ulaştıklarında ise ana kimyasal madde ile muamele edildiler. Ön uygulamalar sonucunda klon frekansları tek başına kimyasal uygulamalarının klon frekanslarına göre azalmıştır. Sonuçlar birlikte uygulamalarla karşılaştırıldığında ön uygulamaların daha etkin olduğu gözlenmiştir (Çizelge 3.5). Toplam klonlardaki frekans dağılımı Şekil 3.3'de görülmektedir.

Çizelge 3.4. 72. saat larvalara IQ ve Klf a ve Klf b' nin birlikte uygulamalarından elde edilen veriler (NMA)

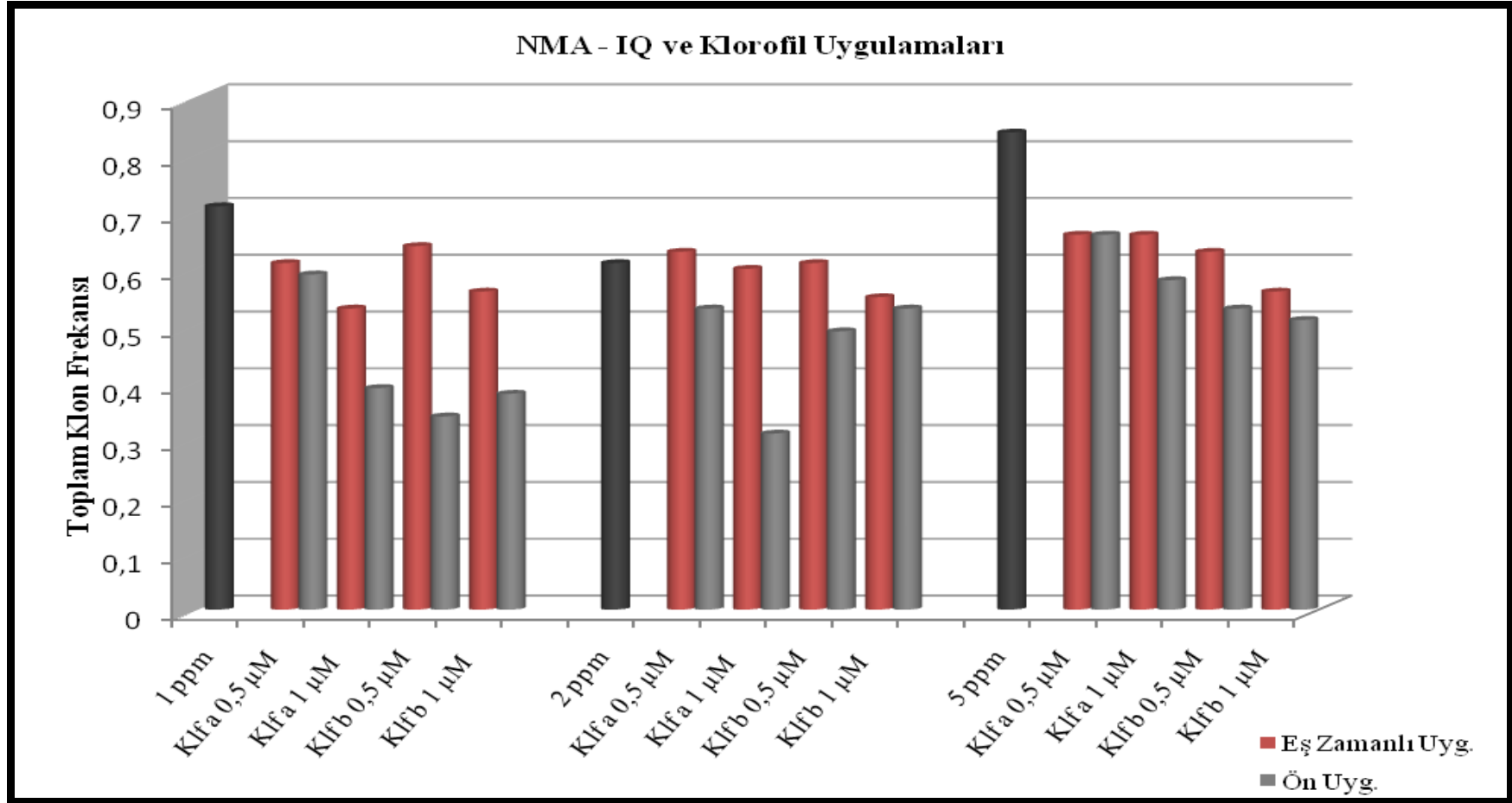
Dozlar	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 cells) (m=2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 cells) (m=5)			İkiz klonlar (m=5)			Toplam mwh klonları (m=2)			Toplam klonları (m=2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10 ⁻⁵ hücre)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
N. Kanat		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
% 0,5 DMSO	80	23	0,29		3	0,04		0	0,00		26	0,33		26	0,33		1,54
1 ppm	80	43	0,54	+	9	0,11	+	5	0,06	i	57	0,71	+	57	0,71	+	2,92
Klf a 0,5 µM	80	39	0,49	-	8	0,10	-	2	0,03	-	49	0,61	-	49	0,61	-	2,51
Klf a 1 µM	80	34	0,43	-	5	0,06	-	3	0,04	-	42	0,53	-	42	0,53	-	1,74
Klf b 0,5 µM	80	46	0,58	-	4	0,05	-	1	0,01	-	51	0,64		51	0,64	-	2,61
Klf b 1 µM	80	37	0,46	-	5	0,06	-	3	0,03	-	45	0,56	-	45	0,56	-	2,30
2 ppm	80	36	0,45	i	11	0,14	+	2	0,03	i	49	0,61	+	49	0,61	+	2,50
Klf a 0,5 µM	80	40	0,50	-	7	0,09	-	3	0,04	i	49	0,61	-	50	0,63	-	2,50
Klf a 1 µM	80	35	0,44	-	9	0,11	-	4	0,05	i	48	0,60	-	48	0,60	-	2,45
Klf b 0,5 µM	80	37	0,46	-	12	0,15	-	0	0,00	-	49	0,61	-	49	0,61	-	2,50
Klf b 1 µM	80	37	0,46	-	4	0,05	-	3	0,04	i	44	0,55	-	44	0,55	-	2,25
5 ppm	80	48	0,60	+	13	0,16	+	6	0,08	+	66	0,83	+	67	0,84	+	3,43
Klf a 0,5 µM	80	39	0,49	-	11	0,14	-	3	0,04	-	53	0,66	-	53	0,66	-	2,71
Klf a 1 µM	80	42	0,53	-	7	0,09	-	4	0,05	-	52	0,65	-	53	0,66	-	2,66
Klf b 0,5 µM	80	35	0,44	-	8	0,10	-	7	0,09	i	50	0,63	-	50	0,63	-	2,56
Klf b 1 µM	80	37	0,46	-	5	0,06	-	3	0,04	-	45	0,56	-	45	0,56	-	2,30

Fr., frekans; D,,istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; z, zayıf pozitif; m=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0,05

Çizelge 3.5. 48. saat larvalara Klf a ve Klf b ön uygulamalarından sonra 72. saatte IQ uygulamasından elde edilen veriler (NMA)

Dozlar	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 cells) (m=2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 cells) (m=5)			İkiz klonlar (m=5)			Toplam mwh klonları (m=2)			Toplam klonları (m=2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10 ⁻⁵ hücre)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
N. Kanat		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
% 0,5 DMSO	80	23	0,29		3	0,04		0	0,00		26	0,33		26	0,33		1,54
1 ppm	80	43	0,54	+	9	0,11	+	5	0,06	i	57	0,71	+	57	0,71	+	2,92
Klf a 0,5 µM	80	38	0,48	-	8	0,10	-	1	0,01	-	46	0,58	-	47	0,59	-	2,35
Klf a 1 µM	80	29	0,36	-	1	0,01	-	1	0,01	-	31	0,39	-	31	0,39	-	1,58
Klf b 0,5 µM	80	19	0,24	-	8	0,10	-	0	0,00		27	0,34	-	27	0,34	-	2,15
Klf b 1 µM	80	28	0,38	-	2	0,03	-	0	0,00		30	0,38	-	30	0,38	-	1,53
2 ppm	80	36	0,45	+	11	0,14	+	2	0,03	i	49	0,61	+	49	0,61	+	2,50
Klf a 0,5 µM	80	35	0,44	-	5	0,06	-	2	0,03	i	42	0,53	-	42	0,53	-	2,15
Klf a 1 µM	80	19	0,24	-	6	0,08	-	0	0,00	-	25	0,31	-	25	0,31	-	1,28
Klf b 0,5 µM	80	33	0,41	-	5	0,06	-	1	0,01	-	39	0,49	-	39	0,49	-	2,00
Klf b 1 µM	80	37	0,46	-	4	0,05	-	1	0,01	-	42	0,53	-	42	0,53	-	2,15
5 ppm	80	48	0,60	+	13	0,16	+	6	0,08	+	66	0,83	+	67	0,84	+	3,43
Klf a 0,5 µM	80	42	0,53	-	8	0,10	-	3	0,04	-	52	0,65	-	53	0,66	-	2,66
Klf a 1 µM	80	37	0,46	-	9	0,11	-	0	0,00	-	46	0,58	-	46	0,58	-	2,35
Klf b 0,5 µM	80	37	0,46	-	4	0,05	-	1	0,01	-	42	0,53	-	42	0,53	-	2,15
Klf b 1 µM	80	34	0,43	-	5	0,06	-	2	0,03	-	41	0,51	-	41	0,51	-	2,10

Fr., frekans; D,,istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; z, zayıf pozitif; m=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0,05



Şekil 3.3. IQ'nun klorofil a ve klorofil b uygulamalarında toplam klonların frekans dağılımları (NMA)

3.1.2. MeIQx uygulamaları

MeIQx'in normal metabolik aktiviteye sahip 72 ± 4 saatlik larvalarda yapılan ön çalışmaları sonucunda IQ ile aynı dozların (1, 2 ve 5 ppm) kullanılmasına karar verildi. Her üç derişimde de *mwh/flr³* genotipli bireylerde genotoksik etki görüldü. Sonuçlar *mwh/TM3* genotipindeki bireylerin sonuçlarıyla karşılaştırıldığında aynı şekilde rekombinojenik olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3.9). Serrat kanatlı bireylerde 1 ve 2 ppm dozu negatif sonuç gösterirken 5 ppm dozundaki frekans artışı istatistiksel olarak önemsizdir ve pozitif sonuçların bulunmaması nedeniyle çalışmanın bundan sonraki kısımlarında normal metabolik aktiviteye sahip bireyler açısından *mwh/TM3* genotipindeki bireylerin kanat preparatlarının hazırlanmasına gerek görülmemiştir. Toplam klonlardaki frekans dağılımı Şekil 3.4 ve Şekil 3.5'de görülmektedir.

3.1.2.1. Eş zamanlı uygulamalar: klorofil + MeIQx (NMA)

MeIQx 1ppm dozunun birlikte uygulamalarında $0.5 \mu\text{M}$ Klr b uygulaması hariç diğer uygulamalarda toplam klon frekanslarında azalma görülmüştür. $0.5 \mu\text{M}$ Klr b dozundaki klon indüksiyon frekansında azalma görülmekle birlikte toplam klon frekansı istatistiksel olarak negatif sonuç vermiştir. 2 ppm dozunun genotoksik etkisi tüm uygulama gruplarında hem klorofil a hemde klorofil b'nin her iki dozu tarafından azaltılmıştır. Klorofil b $0.5 \mu\text{M}$ dozu, 5 ppm MeIQx dozuyla uygulandığında klon frekanslarındaki artış istatistiksel anlamda negatiftir. Diğer dozlarda ise klon frekansları azalmıştır. Genel olarak eş zamanlı uygulamalara bakıldığında ise MeIQx'in genotoksik etkisinin klorofil a ve klorofil b ile eş zamanlı uygulamalarının klon frekanslarının azalmasında etkili olduğu bulunmuştur (Çizelge 3.10). Toplam klonlardaki frekans dağılımı Şekil 3.6'da görülmektedir.

3.1.2.2. Ön uygulamalar: 48 ± 4 saat klorofil + 72 ± 4 saat MeIQx (NMA)

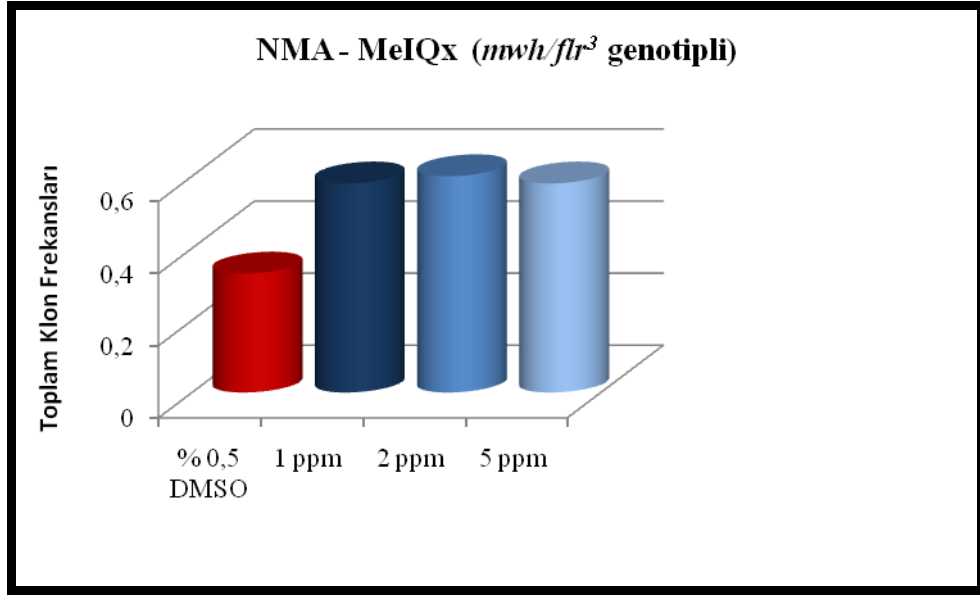
Ön uygulama gruplarının sonuçları birlikte uygulamaların sonuçlarıyla karşılaştırıldığında MeIQx'in genotoksik etkisindeki azalmanın daha fazla olduğu görülmektedir. Genel olarak klorofil'in artan dozuna bağlı olarak klon indüksiyon frekansında azalma olmaktadır. Diğer taraftan toplam klonlar açısından yapılan

değerlendirmede tüm uygulama dozlarının sonuçlarının istatistiksel olarak negatif olduğu görülmektedir (Çizelge 3.11). Toplam klonlardaki frekans dağılımı Şekil 3.6'da görülmektedir.

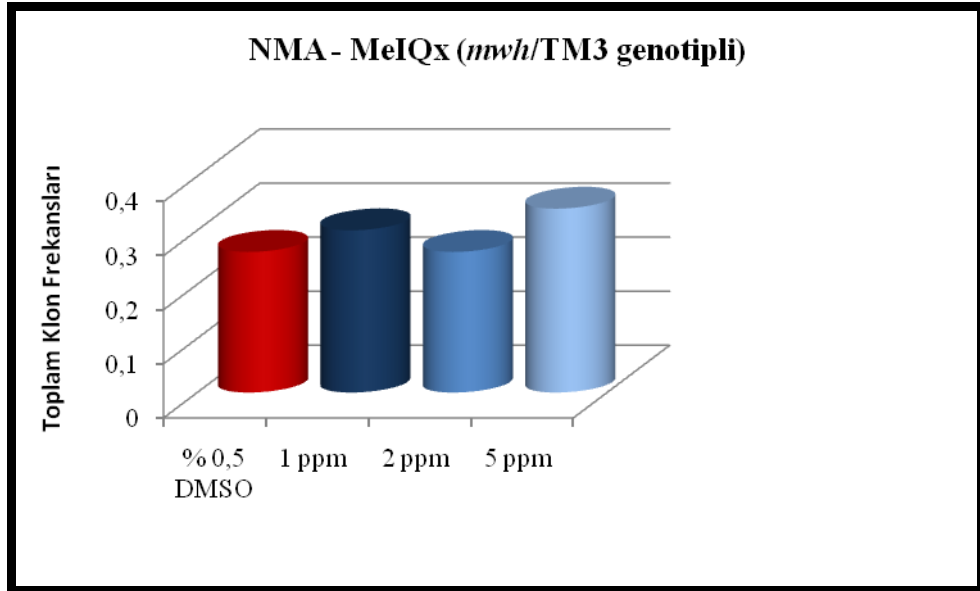
Çizelge 3.6. MeIQx uygulamasından elde edilen normal ve serrat kanatlı bireylerin verileri (NMA)

Dozlar	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 cells) (m=2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 cells) (m=5)			İkiz klonlar (m=5)			Toplam mwh klonları (m=2)			Toplam klonları (m=2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10 ⁻⁵ hücre)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
N. Kanat																	
%0,5 DMSO	80	23	0,29	-	3	0,04	i	0	0,00	i	26	0,33	i	26	0,33	i	1,33
1 ppm	80	40	0,50	+	5	0,06	i	1	0,01	i	46	0,58	+	46	0,58	+	2,36
2 ppm	80	42	0,53	+	6	0,08	i	0	0,00	i	48	0,60	+	48	0,60	+	2,46
5 ppm	80	41	0,51	+	4	0,05	i	1	0,01	i	46	0,58	+	46	0,58	+	2,36
S. Kanat																	
%0,5 DMSO	80	19	0,24	-	2	0,03	-				21	0,26	-	21	0,26	-	1,08
1 ppm	80	23	0,29	i	1	0,01	i				24	0,30	-	24	0,30	-	1,23
2 ppm	80	20	0,25	-	1	0,01	i				21	0,26	-	21	0,26	-	1,08
5 ppm	80	26	0,33	i	1	0,01	i				27	0,34	i	27	0,34	i	1,38

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.



Şekil 3.4. *mwh/flr³* genotipli bireylerde MeIQx'in toplam klon frekans dağılımları (NMA)



Şekil 3.5. *mwh/TM3* genotipli bireylerde MeIQx'in toplam klon frekans dağılımları (NMA)

Çizelge 3.7. 72. saat larvalara MeIQx ve Klf a ve Klf b' nin birlikte uygulamalarından elde edilen veriler (NMA)

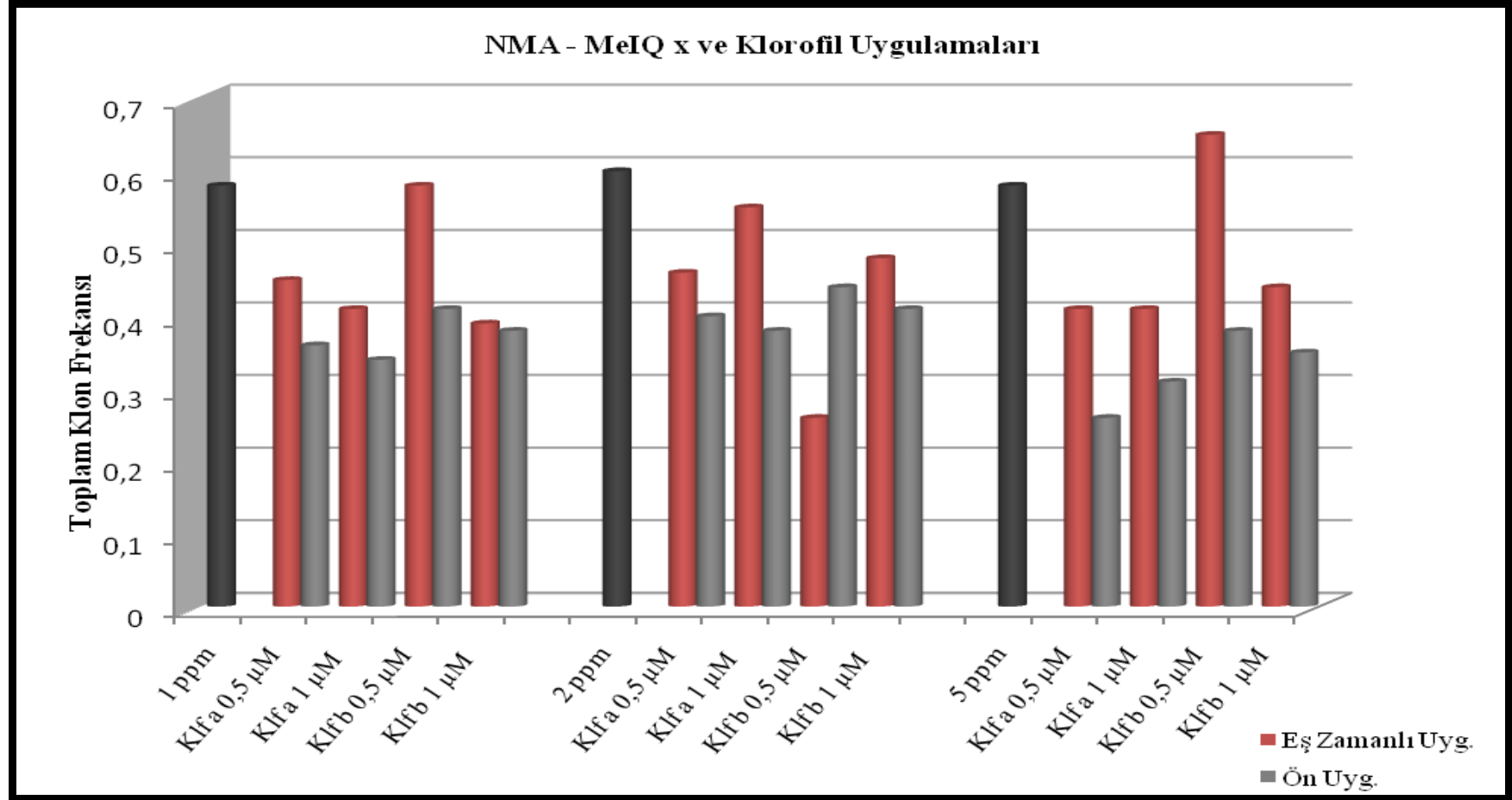
Dozlar	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 cells) (m=2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 cells) (m=5)			İkiz klonlar (m=5)			Toplam mwh klonları (m=2)			Toplam klonları (m=2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10 ⁻⁵ hücre)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
N. Kanat		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
% 0,5 DMSO	80	23	0,29	i	3	0,04	i	0	0,00	i	26	0,33	i	26	0,33	i	1,54
1 ppm	80	40	0,50	+	5	0,06	i	1	0,01	i	46	0,58	+	46	0,58	+	2,36
Klf a 0,5 µM	80	35	0,44	-	1	0,02	-	0	0,00	i	36	0,45	-	36	0,45	-	1,84
Klf a 1 µM	80	32	0,40	-	2	0,03	-	0	0,00	i	33	0,41	-	33	0,41	-	1,69
Klf b 0,5 µM	80	42	0,53	-	4	0,05	-	0	0,00	i	45	0,56	-	46	0,58	-	2,30
Klf b 1 µM	80	28	0,35	-	3	0,04	-	0	0,00	i	31	0,39	-	31	0,39	-	1,58
2 ppm	80	42	0,53	+	6	0,08	i	0	0,00	i	48	0,60	+	48	0,60	+	2,46
Klf a 0,5 µM	80	32	0,40	-	5	0,06	-	0	0,00	i	35	0,44	-	37	0,46	-	1,79
Klf a 1 µM	80	43	0,54	-	1	0,01	-	0	0,00	i	43	0,54	-	44	0,55	-	2,25
Klf b 0,5 µM	80	21	0,26	-	0	0,00	-	0	0,00	i	21	0,26	-	21	0,26	-	1,07
Klf b 1 µM	80	37	0,46	-	1	0,01	-	0	0,00	i	38	0,48	-	38	0,48	-	1,94
5 ppm	80	41	0,51	+	4	0,05	i	1	0,01	i	46	0,58	+	46	0,58	+	2,36
Klf a 0,5 µM	80	25	0,31	-	7	0,09	i	1	0,01	i	33	0,41	-	33	0,41	-	1,69
Klf a 1 µM	80	31	0,39	-	2	0,03	-	0	0,00	i	33	0,41	-	33	0,41	-	1,69
Klf b 0,5 µM	80	50	0,63	-	1	0,01	-	1	0,01	i	52	0,65	-	52	0,65	-	2,66
Klf b 1 µM	80	33	0,41	-	2	0,03	-	0	0,00	i	35	0,44	-	35	0,44	-	1,79

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.

Çizelge 3.8. 48. saat larvalara Klf a ve Klf b ön uygulamalarından sonra 72. saatte MeIQx uygulamasından elde edilen veriler (NMA)

Dozlar	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 cells) (m=2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 cells) (m=5)			İkiz klonlar (m=5)			Toplam mwh klonları (m=2)			Toplam klonları (m=2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10 ⁻⁵ hücre)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
N. Kanat		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
%0,5 DMSO	80	23	0,29	i	3	0,04	i	0	0,00	i	26	0,33	i	26	0,33	i	1,54
1 ppm	80	40	0,50	+	5	0,06	i	1	0,01	i	46	0,58	+	46	0,58	+	2,36
Klf a 0,5 µM	80	25	0,32	-	3	0,04	-	1	0,01	i	28	0,35	-	29	0,36	-	1,43
Klf a 1 µM	80	25	0,31	-	2	0,03	-	0	0,00	i	27	0,34	-	27	0,34	-	1,38
Klf b 0,5 µM	80	31	0,39	-	2	0,03	-	0	0,00	i	33	0,41	-	33	0,41	-	1,69
Klf b1 µM	80	30	0,38	-	0	0,00	-	0	0,00	i	30	0,38	-	30	0,38	-	1,53
2 ppm	80	42	0,53	+	6	0,08	i	0	0,00	i	48	0,60	+	48	0,60	+	2,46
Klf a 0,5 µM	80	29	0,36	-	4	0,05	-	0	0,00	i	32	0,40	-	32	0,40	-	1,63
Klf a 1 µM	80	27	0,34	-	2	0,03	-	1	0,01	i	30	0,38	-	30	0,38	-	1,53
Klf b 0,5 µM	80	35	0,44	-	0	0,00	-	0	0,00	i	35	0,44	-	35	0,44	-	1,79
Klf b 1	80	32	0,40	-	1	0,01	-	0	0,00	i	33	0,41	-	33	0,41	-	1,69
5 ppm	80	41	0,51	+	4	0,05	i	1	0,01	i	46	0,58	+	46	0,58	+	2,36
Klf a 0,5 µM	80	21	0,26	-	0	0,00	-	0	0,00	i	21	0,26	-	21	0,26	-	1,07
Klf a 1 µM	80	24	0,30	-	1	0,01	-	0	0,00	i	25	0,31	-	25	0,31	-	1,28
Klf b 0,5 µM	80	27	0,34	-	2	0,03	-	1	0,01	i	30	0,38	-	30	0,38	-	1,53
Klf b 1 µM	80	25	0,31	-	3	0,04	-	0	0,00	i	28	0,35	-	28	0,35	-	1,43

Fr., frekans; D,,istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0,05,



Şekil 3.6. MeIQx'in klorofil a ve klorofil b uygulamalarında toplam klonların frekans dağılımları (NMA)

3.2. Yüksek Metabolik Aktivite Uygulamaları

3.2.1. IQ uygulamaları

Yüksek metabolik aktiviteye sahip bireyler kimyasalın parçalanma ürünlerinin etkisinin belirlenmesi için uygun hatlardır. Kimyasalı hızlı bir şekilde metabolize ettikleri için ana üründen çok parçalanma ürünlerinin etkisi görülecektir. Yüksek metabolik aktiviteli bireylerde IQ uygulama sonuçlarının hiçbirinde istatistiksel anlamda önemli bir artış gözlenmemiştir (Çizelge 3.9). Aynı kimyasal dozlarının normal metabolik aktiviteye sahip bireylerde pozitif sonuçlar göstermesi IQ'nun doğrudan kendisinin genotoksik etki göstermesi ile ilişkilidir. Normal kanatlı bireylerde pozitif sonuçların bulunmaması nedeniyle serrat kanatlı bireylerin preparatlarının hazırlanmasına ve sayımlarının yapılmasına gerek duyulmamıştır.

Yüksek metabolik aktiviteli bireylerde IQ'nun çözücü kontrol olarak kullanılan DMSO'ya göre istatistiksel düzeyde önemli bir fark göstermemesi nedeniyle klorofil a ve b ile yapılan antimitojenite çalışmaları tez kapsamında değerlendirilmemiştir.

3.2.2. MeIQx uygulamaları

MeIQx'in 1, 2 ve 5 ppm uygulamalarında IQ uygulamalarına benzer sonuçlar gözlenmiştir. Ancak 5 ppm MeIQx dozu IQ'dan farklı olarak toplam *mwh* klonlarda pozitif, toplam klonlarda ise zayıf pozitif sonuçlar göstermiştir. Diğer iki dozda ise negatif sonuçlar bulunmuştur (Çizelge 3.10). Bu nedenle sadece 5 ppm MeIQx dozuna ait serrat kanatlı bireylerin preparatları incelenmiştir (Çizelge 3.10). Ancak pozitif sonuç bulunmamıştır. Toplam klonlardaki frekans dağılımı Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'de görülmektedir.

Yüksek metabolik aktiviteli bireylerde MeIQx'in 1 ve 2 ppm düşük dozları klon frekanslarında çözücü kontrol olarak kullanılan DMSO'ya göre istatistiksel düzeyde önemli bir fark göstermediği için klorofil a ve b ile yapılan antimitojenite çalışmaları tez kapsamında değerlendirilmemiştir. Sadece 5 ppm dozuna karşı klorofil a ve klorofil b'nin eş zamanlı ve ön uygulama gruplarındaki etkileri incelenmiştir.

Çizelge 3.9. IQ uygulamasından elde edilen normal kanatlı bireylerin verileri (YMA)

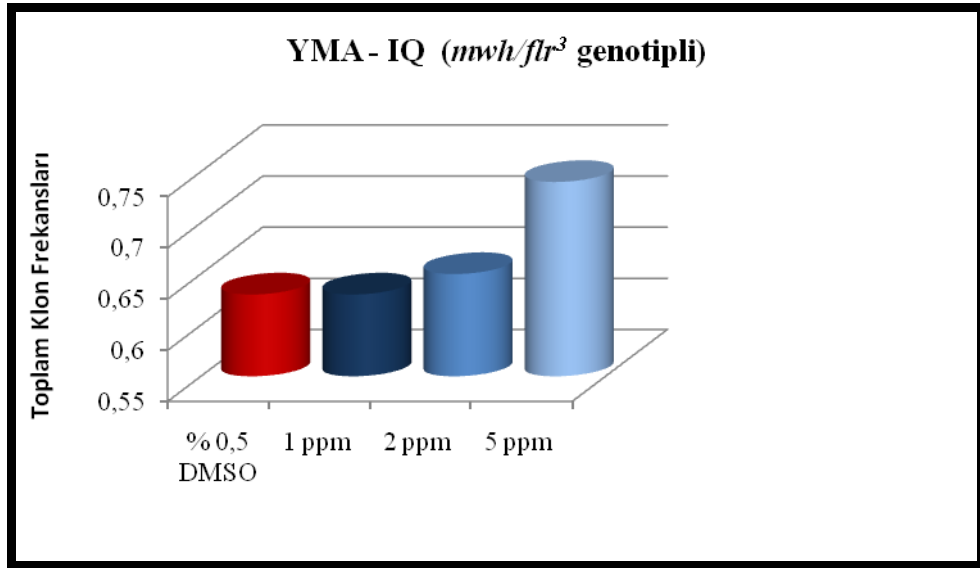
Dozlar	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 cells) (m=2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 cells) (m=5)			İkiz klonlar (m=5)			Toplam mwh klonları (m=2)			Toplam klonları (m=2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10 ⁻⁵ hücre)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
N. Kanat																	
% 0,5 DMSO	72	41	0,57	-	4	0,06	i	0	0,00	-	44	0,61	-	45	0,63	-	2,50
1 ppm	80	47	0,59	-	2	0,03	-	1	0,01	i	50	0,63	-	50	0,63	-	2,56
2 ppm	80	48	0,60	-	4	0,05	-	0	0,00	i	52	0,65	-	52	0,65	-	2,66
5 ppm	80	46	0,58	-	11	0,14	i	2	0,03	i	56	0,70	-	59	0,74	-	2,86

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark, z, zayıf pozitif; m=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.

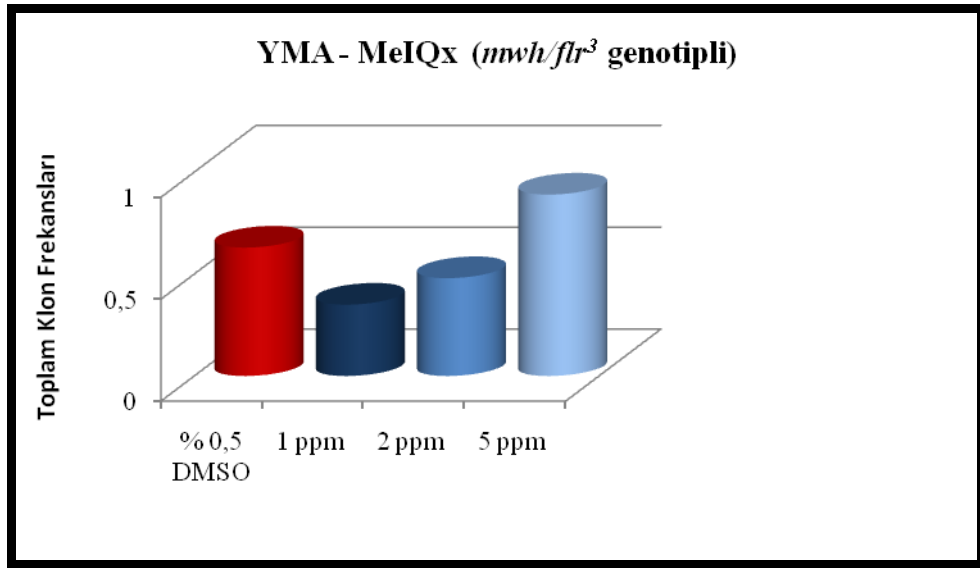
Çizelge 3.10. MeIQx uygulamasından elde edilen normal ve serrat kanatlı bireylerin verileri (YMA)

Dozlar	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 cells) (m=2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 cells) (m=5)			İkiz klonlar (m=5)			Toplam mwh klonları (m=2)			Toplam klonları (m=2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10 ⁻⁵ hücre)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
N. Kanat																	
% 0,5 DMSO	72	41	0,57		4	0,06		0	0,00		44	0,61		45	0,63		2,50
1 ppm	80	25	0,31	-	3	0,04	-	0	0,00	i	28	0,35	-	28	0,35	-	1,43
2 ppm	80	33	0,41	-	4	0,05	-	1	0,01	i	38	0,48	-	38	0,48	-	1,94
5 ppm	80	65	0,81	+	6	0,08	i	0	0,00	i	71	0,89	+	71	0,89	z	3,63
S. Kanat																	
% 0,5 DMSO	80	36	0,45	-	1	0,01	-				37	0,46	-	37	0,46	-	1,89
5 ppm	80	33	0,41	-	2	0,03	i				35	0,44	-	35	0,44	-	1,79

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.



Şekil 3.7. *mwh/flr³* genotipli bireylerde IQ'nun toplam klon frekans dağılımları (YMA)



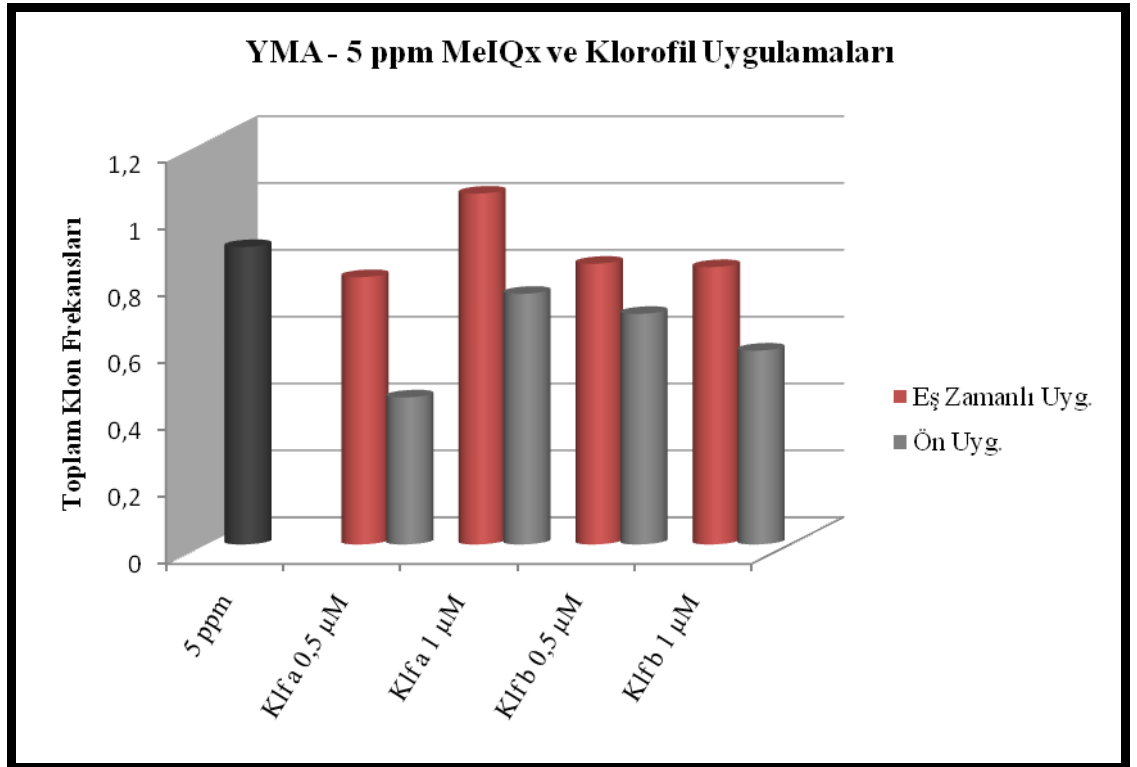
Şekil 3.8. *mwh/flr³* genotipli bireylerde MeIQx'in toplam klon frekans dağılımları (YMA)

3.2.2.1. Eş zamanlı uygulamalar: klorofil + MeIQx (YMA)

Eş zamanlı uygulamalarda klorofil a 1 μM dozu 5ppm MeIQx ile uygulandığında toplam *mwh* ve toplam klon frekanslarında artışa neden olmasına rağmen, ortaya çıkan fark istatistiksel anlamda negatif sonuç göstermektedir. Klorofil'in diğer dozları ise klon frekanslarının azalmasına neden olmuştur (Çizelge 3.11). Toplam klonlardaki frekans dağılımı Şekil 3.9'da görülmektedir.

3.2.2.2. Ön uygulamalar: 48 ± 4 saat klorofil + 72 ± 4 saat MeIQx (NMA)

Ön uygulama gruplarında klorofil a ve klorofil b eş zamanlı uygulama grubuna göre daha etkili gözükmektedir. MeIQx 5 ppm dozunda toplam *mwh* klonlarındaki pozitif etki ile toplam klonlardaki zayıf pozitif etki klorofil a ve b'nin tüm dozları ile etkili bir şekilde azaltılmıştır (Çizelge 3.11). Toplam klonlardaki frekans dağılımı Şekil 3.9'da görülmektedir.



Şekil 3.9. 5 ppm MeIQx'in klorofil a ve klorofil b uygulamalarında toplam klonların frekans dağılımları (YMA)

Cizelge 3.11. MeIQx 5 ppm dozlarının klorofil a ve klorofil b uygulamaları

Dozlar	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 cells) (m=2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 cells) (m=5)			İkiz klonlar (m=5)			Toplam mwh klonları (m=2)			Toplam klonları (m=2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10 ⁻⁵ hücre)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
N. Kanat		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
%0,5 DMSO	72	41	0,57		4	0,06		0	0,00		44	0,61		45	0,63		2,50
5 ppm	80	65	0,81	+	6	0,08	i	0	0,00	i	71	0,89	+	71	0,89	z	3,63
72 ± 4 saatlik larvalara Eş Zamanlı Uygulamalar																	
Klf a 0,5 µM	80	55	0,69	-	7	0,09	i	2	0,03	i	64	0,80	-	64	0,80	-	3,27
Klf a1 µM	80	75	0,94	-	6	0,08	i	3	0,04	i	84	1,05	-	84	1,05	-	4,30
Klf b 0,5 µM	80	60	0,75	-	5	0,06	-	2	0,03	i	67	0,84	-	67	0,84	-	3,43
Klf b 1 µM	80	62	0,78	-	3	0,04	-	1	0,01	i	66	0,83	-	66	0,83	-	3,38
48 ± 4 saatlik larvalara Klf a ve Klf b ön uygulamaları																	
Klf a 0,5 µM	80	28	0,35	-	7	0,09	i	0	0,00	i	35	0,44	-	35	0,44	-	1,79
Klf a 1 µM	80	56	0,70	-	3	0,04	-	1	0,01	i	59	0,74	-	60	0,75	-	3,02
Klf b 0,5 µM	80	50	0,63	-	3	0,04	-	2	0,03	i	55	0,69	-	55	0,69	-	2,81
Klf b 1 µM	80	41	0,51	-	5	0,06	-	0	0,00	-	44	0,55	-	46	0,58	-	2,25

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; m=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05

4. TARTIŞMA

Yiyecek maddelerinin besin değerlerinin yanı sıra güvenilirliği ve insan sağlığına etkileri üzerine gittikçe büyüyen bir ilgi bulunmaktadır. Bunun sonucu olarak besinlerin fiziksel performansa etkilerinin yanında genetik potansiyele ve çeşitli hastalıkların ortaya çıkma risklerine yönelik araştırmalar da giderek artmaktadır. Besinler içerisinde doğal olarak bulunan mutajenler olduğu gibi öncül maddelerin işlem görmesi sonucu oluşabilen kimyasal maddeler de bulunabilmektedir. Örneğin, et içerisinde bulunan protein ve şeker öncülleri yüksek ısıya maruz kaldıktan sonra HCA'lara dönüşmektedirler. Bu bileşikler besinlerle birlikte sıklıkla vücudumuza aldığımız genotoksik bileşiklerdir. Normal bir besinle beslenen insanların idrarlarında dahi farklı tip HCA'ların bulunduğu tespit edilmiştir (Ushiyama vd 1991). Bu bileşiklerin genotoksik potansiyellerini belirleyebilmek için çeşitli araştırmalar yapılmış ve çalışmaların çoğu HCA'ların mutajenik ve/veya kanserojenik olduklarını ortaya koymuştur (Wakabayashi vd 1992, Lynch vd 1998, Wild ve Kerdar 1998, Schut ve Snyderwine 1999, Sinha vd 2001, Dashwood 2002, Nishikawa vd 2005).

Bu çalışmada et ve et ürünlerinin pişirilmesi ile sıklıkla oluşan iki HCA bileşiği çalışıldı. Öncelikle amino-imidazo grubu HCA'lar olan IQ ve MeIQx'in normal ve yüksek metabolik aktiviteye sahip *Drosophila* hatları kullanılarak SMART ile genotoksik etkileri araştırıldı. Elde edilen sonuçlar her iki kimyasalın 1, 2 ve 5 ppm'lik dozlarının normal metabolik aktiviteye sahip bireylerde genotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Her üç derişimin, *mwh/flr³* genotipli bireylerde toplam klon frekanslarını artırırken *mwh/TM3* genotipindeki bireylerde istatistiksel önemde fark oluşturmadıkları gözlenmiştir. Normal ve serrat fenotipli kanatlardan elde edilen verilerin karşılaştırılması genotoksik etkinin rekombinasyon sonucunda ortaya çıktığını göstermektedir. Çünkü serrat fenotipli bireylerde bulunan TM3 dengeleyici kromozomu rekombinasyonu baskılamaktadır. Dolayısıyla bu fenotipte açığa çıkan genotoksik etkinin mutasyon sonucu olduğu anlamına gelir. Elde ettiğimiz bulgulara göre mutasyon frekansının gözlenmemesi bize rekombinasyonun meydana geldiğini göstermektedir. Klon frekansları incelendiğinde IQ'nun MeIQx'den daha etkili olduğu ve

rekombinasyon sonucu ortaya çıkan ikiz klonların frekansını daha fazla arttırdığı da belirlenmiştir.

IQ ve MeIQx'in rekombinojenik olduğuna dair bir başka sonuç Paladino vd'nin (1999) *Saccharomyces cerevisiae* YB110 ve YHE2 soyları ile yapmış oldukları çalışmadan elde edilmiştir. Pfau vd'nin (1999) çalışmaları ile uyumlu olarak, elde ettiğimiz sonuçlar her iki kimyasalın mitotik rekombinasyon frekansını artırdığını göstermektedir. Ayrıca her iki kimyasalın MCL-5 hücrelerinde doza bağlı olarak *in vitro* şartlarda mikronükleus oluşumuna (Pfau vd 1999), alkali tek hücre jel elektroforezinde (COMET) DNA tek iplik kırıklarına (Pfau vd 1999), *in vitro* hücre kültüründe kromozom bozukluklarına (Thompson vd 1983) ve kardeş kromatidlerde parça değişimine (SCE) neden oldukları belirlenmiştir (Tohda vd 1980, Aeschbacher ve Ruch 1989). Daha önce yapılan bir çalışmada IQ ve MeIQx'in *Drosophila* SMART yöntemi ile genotoksik etkilerinin bulunması elde ettiğimiz sonuçları destekler niteliktedir (Yoo vd 1985).

IQ lambda/*lacZ* transgenik farelerin kolon *cII* geninde (Itoh vd 2003), MeIQx *lacI* transgenik farelerin (Itoh vd 2000) ve *gpt* delta transgenik farelerin (Masumura vd 2003) kolon ve karaciğerinde mutasyon frekansının artışına neden olmuştur. *Gpt* delta transgenik farelerde en baskın görülen mutasyon tipi G:C'nin T:A'ya transversiyonları olarak belirlenmiştir. Masumura vd'nin (2003) sonuçlarını destekleyecek nitelikte Kudo vd (1991), IQ ve MeIQx'in rat Zymbal bezi skuamoz hücre karsinomasında çoğu 13. kodonda transversiyon sonucu oluşan c-Ha-ras mutasyonlarının ortaya çıktığını göstermişlerdir.

Farklı test sistemleri kullanılarak yapılan çalışmaların sonuçları genel olarak IQ ve MeIQx'in genotoksik potansiyellerini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte çelişkili bir şekilde CHO hücrelerinde yürütülen mikronükleus çalışmasında PhIP ve Trp-P-1 pozitif bulunurken IQ, MeIQ ve MeIQx yüksek konsantrasyonlarda bile pozitif sonuç göstermemiştir (Knasmüller vd 1999). Ortaya çıkan bu çelişkiler çalışmaların yürütüldüğü test sistemlerinde tüm faktörlerin standart olmamasından kaynaklanıyor olabilir. Her sistemin çalışma yönteminin farklı olması ortaya değişik sonuçların

çıkmasına ve her çalışmada kimyasalın etkisinin farklı bir boyutunu göstermesine neden olabilir.

Birçok diğer kanserojen madde gibi HCA'ların da metabolik aktivasyona uğradıktan sonra genotoksik etkilerini sergiledikleri belirtilmektedir (Mortelmans ve Zeiger 2000). HCA'ların rodentlerdeki çoklu organ kanserojenitesinin, karaciğerde oluşan metabolitlerin hedef organlara dağılması sonucunda oluştuğu düşünülmektedir. Hedef dokularda enzimatik veya enzimatik olmayan reaksiyonlar *N*-hidroksi metabolitlerini DNA hasarı oluşturabilme kapasitesindeki elektrofillere dönüştürürler (Turesky 1991). Alternatif olarak ekstrahepatik dokularda da metabolik aktivasyon meydana gelebilmektedir. Her dokudaki metabolik aktivasyon seviyesi farklı olabileceği gibi heterosiklik aminlerin doku ve organlarda meydana getirdikleri DNA hasarı ve tümör oluşumunun derecesi de farklılık gösterecektir. Örneğin, kolon S9 fraksiyonu kullanılarak *Salmonella* ile yapılan mutajenite testinde PhIP'nin metabolik aktivasyona uğramadığı belirlenmiş ve kolondaki enzim aktivitesinin yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır (Malfatti 1996). Ancak bunun tersine prostatta PhIP'yi *N*-hidroksi formuna dönüştüren stk. P4501A2 enzim seviyesinin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir (Yang vd 2003).

IQ ve MeIQx'in CD-1 erkek farelere *in vivo* şartlarda intraperitoneal olarak enjeksiyonunun ardından sindirim ve boşaltım sistemi organlarının mukoza hücrelerindeki DNA hasarı COMET testi ile değerlendirilmiştir ve her iki HCA kolonda istatistiksel olarak önemli düzeyde DNA hasarına neden olmuştur. Fakat ince bağırsak ve mesanede hasar gözlenmemiştir (Sasaki vd 1998). Yine COMET sistemi ile IQ, MeIQ, MeIQx, PhIP, Trp-P-1, Trp-P-2 HCA'larının fare karaciğer, akciğer, böbrek, beyin, dalak, kemik iliği ve mide mukozalarındaki genotoksik etkileri araştırılmıştır. İntraperitoneal yapılan uygulama sonucunda IQ, MeIQ, MeIQx, ve Trp-P-2 mide karaciğer, akciğer ve beyinde, Trp-P-1 mide, karaciğer ve akciğerde, PhIP karaciğer, böbrek ve beyinde DNA hasar oluşumunu uyarmıştır (Sasaki vd 1997). Dokulara özgü farklılıklar daha önce de bahsedildiği gibi metabolik aktivasyondan sorumlu enzim seviyelerinin farklı olmasından kaynaklanabilir (Lynch vd 1996). Bununla birlikte, HCA'ların farklı konjugasyon reaksiyon istekleri bulunabilmektedir. Örneğin, IQ,

CYP1A2 ve NAT2 ekspresyonu yapan hücrelerde daha mutajenik iken PhIP, CYP1A2 ve SULT1A1 ekspresyonu yapan hücrelerde daha mutajeniktir (Kassie vd 2003).

İn vitro şartlarda dışarıdan çeşitli S9 fraksiyonları eklenerek yapılan çalışmalarda *S.typhimurium* TA98 suşunda MeIQx'in (Sinha vd 2001), *S. typhimurium* YG10119 suşunda IQ ve MeIQx'in mutajenik etki gösterdiği ve MeIQx'in IQ'dan daha etkili olduğu bulunmuştur (Pfau vd 1999). Aynı şekilde NAT enzim aktivitesine sahip maya soylarında (*S. cerevisiae* YB110 - YHE2) IQ gen değişimi ve tranlokasyon frekansında doza bağlı artış göstermiştir (Paladino vd 1999). İnsan NAT-2 ekspresyonu yapamayan soyda ise mitotik rekombinasyon frekansında önemli bir artış gözlenmemesi IQ'nun rekombinojenik ürünlere aktivasyonun NAT-2 enziminin varlığına bağlı olduğunu göstermektedir. Aynı şekilde NAT-2 ekspresyonu yapmayan soyda MeIQx gen değişimi ve translokasyon frekansında artışa neden olmamıştır (Paladino vd 1999). Bu çalışmalarda HCA bileşiklerinin metabolik aktivasyona uğradıktan sonra oluşturdukları metabolitlerinin genotoksik etkinin oluşmasında rolü olduğu görülmektedir. Ancak bizim yapmış olduğumuz çalışmada yüksek metabolik aktiviteye sahip *Drosophila* soylarında IQ ve MeIQx farklı sonuçlar göstermiştir.

Yüksek metabolik aktiviteye sahip bireyler ile yaptığımız çalışmanın sonucunda IQ'nun 3 dozunda da genotoksik etki ortaya çıkmamıştır. Bununla birlikte normal metabolik aktiviteli bireylerde pozitif sonuçların bulunması bize IQ'nun doğrudan kendisinin genotoksik olduğunu göstermektedir. Stk. P450IA enzimlerinin aktivitesini uyaran 3- Metilkolanteren (3-MC)'in Fischer F344 sıçanlarına ön uygulaması ile IQ'nun dağılımı ve DNA hasar oluşumundaki etkisinin araştırıldığı çalışmanın sonuçları bizim sonuçlarımızı destekler niteliktedir (Snyderwine vd 1993). Radyoaktif işaretli IQ uygulamasından üç hafta sonra ekstrahepatik dokularda radyoaktivite seviyesi kontrol grubuna göre azalmıştır. Karaciğerde radyoaktivite azalmamasına rağmen IQ-DNA hasar seviyesi hem karaciğerde hem de böbrek, kolon, ince bağırsak, mesane, kalp ve akciğer gibi ekstrahepatik dokularda oldukça büyük oranda azalmıştır. Beyinde ve testiste kontrol grubunda DNA hasarı gözlenmesine rağmen 3MC ön uygulaması yapılan sıçanlarda hasar gözlenmemiştir (Snyderwine vd 1993). 48. saatte, 3MC uygulanmış sıçanlarda DNA hasar seviyesinin kontrol grubuna göre daha az olduğu

tespit edilmiştir ve elde edilen verilere göre *in vivo* şartlarda stk. P450IA enzimlerinin uyarılması ile IQ'nun detoksifikasyon hızının arttığı sonucuna varılmıştır (Snyderwine vd 1993). Neticede ortaya çıkan metabolitler bileşiğin kendisi kadar genotoksik değildir. Bizim sonuçlarımız da IQ'nun parçalanma ürünlerinin genotoksik olmadığını göstermektedir. Her iki sonuç birbiri ile örtüşmektedir. Ayrıca IQ'nun sülfamat metaboliti *N*- sülfamik asitin bakteriyel mutasyon sisteminde mutajenik olmadığı, sıçanlara uygulanan IQ'nun % 20 sinden fazlasının ürede ve dışkıda sülfamat olarak atıldığı görülmüştür. Çok az miktarda IQ metabolize olmadan üre, dışkı ve safradan izole edilmiştir. Böylece sıçanlarda IQ'nun detoksifikasyonu ve atılımında *N*-sülfatasyonun büyük katkısı bulunduğu belirtilmiştir (Turesky vd 1986). Oysaki Kassie vd (2003), IQ'nun NAT-2 enzim ekspresyonuna sahip hücrelerde daha mutajenik olduğunu bildirmiştir. Yapılan çalışmalar genel olarak tek bir enzim üzerine odaklanarak yapılan amaca yönelik çalışmalardır. Ayrıca *in vivo* organizmalarda sistem daha karmaşıktır ve detoksifikasyon mekanizmasındaki farklı enzimler ardı sıra etki ederek iş görmektedirler. Bir enzim diğer enzimin metabolitini substrat olarak kullanabilir. Örneğin Lynch vd'nin (1996) bildirdiğine göre; Timbrell, PhIP'nin *N*-hidroksi metabolitinin başta asetiltransferaz olmakla birlikte sülfotranferaz enzimi ile esterleşme tepkimesine uğradığını ve Lin ise, oluşan esterin GST enzimi ile kolayca detoksifiye edildiğini belirtmektedir. Dolayısıyla IQ'nun detoksifikasyonunda hem sülfatasyon hemde asetilasyonun etkilerinin olması mümkündür.

Yüksek metabolik aktiviteye sahip *Drosophila* hatlarında MeIQx'in düşük dozlarında (1 ve 2 ppm) genotoksik etki görülmemektedir. Elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde Hoshi vd (2004) Big Blue transgenik sıçanlarla yaptıkları mutajenite testinde MeIQx'in düşük dozlarının kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olmadığını bulmuşlardır. Ancak yüksek dozlarda *lacI* geni mutasyon frekansı önemli derecede artış göstermiştir. Çoğunlukla G bazı çerçeve kaymasıyla birlikte G → T transversiyonları uyarılmıştır (Hoshi vd 2004). Bizim sonuçlarımızda da MeIQx'in 5 ppm yüksek dozunda toplam klon frekansındaki artış zayıf pozitif olarak kendisini göstermiştir. Toplam *mwh* klonlar karşılaştırıldığında ise pozitif sonuç gözlenmiştir. Daha yüksek dozlar çalışılmış olsaydı doza bağlı olarak genotoksik etkinin artması

beklenebilirdi. Ancak düşük dozlarda kimyasalın parçalanma ürünlerinin genotoksik olmadığı, ana bileşiğin metabolitlerden daha etkili olduğu görülmektedir.

Benzer bir sonuç Turesky vd'nin (1988) yapmış olduğu çalışmadan elde edilmiştir. Radyoaktif olarak işaretli olan MeIQx intragastrik olarak Sprague-Dawley sıçanlarına uygulama yapıldıktan sonra 5 farklı metabolit safrada belirlenerek izole edilmiştir (Turesky vd 1988). Metabolik aktivasyon olsun ya da olmasın tüm metabolitlerin *S. typhimurium* TA98 suşunda mutajenik etkilerinin olmadığı bulunmuştur. Ayrıca β -glukronidaz içeren S-9 karışımı ile yapılan mutasyon çalışmasında yine aynı şekilde glukronit konjugantının mutajenik olmadığı gözlenmiştir (Turesky vd 1988). Bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak parçalanma ürünleri negatif sonuçlar vermiştir.

Organizmaların kimyasal aktivasyon veya detoksifikasyon kapasitelerindeki farklılık sonucunda aynı kimyasala karşı farklı tepkiler açığa çıkabilmektedir. Örneğin Fischer 344 sıçan, sinomolgus maymunu ve insan karaciğer mikrozomlarının IQ, MeIQx ve PhIP HCA'larını aktive etme kapasiteleri Ames *Salmonella* mutajenite testi ile karşılaştırılmıştır (Davis vd 1993b). Her üç türde de IQ'nun mutajenik aktivasyonu birbirine benzerdir. Bununla birlikte MeIQx ve PhIP için türler arasında farklılıklar bulunmaktadır. Bu iki HCA'yı aktive etme kapasitesi en fazla sırayla insan, sıçan ve maymun olarak sıralanmış ve en fazla farklılık MeIQx'de gözlenmiştir. Sıçan ve maymunda çeşitli dokularda MeIQx-DNA hasarı incelendiğinde, hasarın maymunda sıçan'a oranla oldukça az olduğu görülmüştür. Sonuçlara göre sinomolgus maymunlarında stk. P450 enzim sistemi vasıtasıyla MeIQx aktivite kapasitesinin düşük seviyede olduğu bildirilmiştir (Davis vd 1993b). Dolayısıyla farklı türlerde çelişkili sonuçların ortaya çıkması kaçınılmazdır.

Kanserle ilişkili genlerde somatik mutasyonların birikmesiyle kanserogenezis süreci arasında ilişki olduğu bilinmektedir. DNA hasarı ve geri dönüşümsüz baz değişimleri çok basamaklı kanserogenezisde önemli bir rol oynamaktadır (Hoshi vd 2004). Gerek epidemiyolojik olarak gerekse deneysel olarak HCA'ların tümör oluşumuna etkilerini gösteren çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır (Skog ve Solyakov 2002, Dashwood 2002).

Ekzojen ve endojen etkenlerin oluşturduğu genetik yüke karşı organizma mümkün olduğunca kendi tamir ve savunma sistemini kullanarak mutajenik olayları iyileştirme ve tersine çevirme eğilimindedir. Bunun yanı sıra dışarıdan alınacak takviyeler de bu sürecin hızlanmasına katkıda bulunabilir. İnsan besinleri mutajenik ve/veya kanserojenik maddelerin yanı sıra çeşitli antimutajen ve antikanserojen maddeleri de yapılarında bulundurmaktadırlar. İnsanların farklı çevresel genotoksik ajanlara maruz kalması özellikle bitki ve bitkisel ürünler gibi besinsel ilavelerin kullanımına dikkat çekmektedir. Halk arasında antimutajenik ve antikanserojenik özelliğe sahip doğal bileşiklerin kimyasal yapıdaki ilaç gruplarına göre daha az zararlı olduğuna dair genel bir yargı bulunmaktadır. Bu nedenle gerek mutajenezise gerekse kanserojenezise karşı alternatif olabilecek maddelerin araştırılması kaçınılmaz olmuştur. Araştırmalar sonucunda birçok maddenin antimutajenik etkisi gösterilmiştir. Çeşitli bitkilerden elde edilen uçucu yağların, vitaminlerin, flavonoidlerin ve flavonoid içeren bitkilerin, sarımsak bileşeni olarak sülfürlü bileşiklerin farklı yöntemlerle antigenotoksik etkileri gösterilmiştir (Ferguson vd 2004, Iciek vd 2009). Bununla birlikte antimutajenik etki farklı şekillerde ortaya çıkabilmektedir. Örneğin, bazı vitaminler (Odin 1997) ve polifenoller antioksidan olarak etki göstererek reaktif oksijen türlerini (ROS) ortamdan kaldırırlar (Alarco'n de la Lastra ve Villegas 2007). Bazı bitki polifenolleri DNA tamir etkileşimleri aracılığıyla antimutajenik etki gösterirken bazıları karaciğer, akciğer ve ince bağırsakta hem antioksidan hem de detoksifikasyon enzimlerinin (GST, katalaz ve kuinon redüktaz) aktivitesini önemli derecede artırmaktadırlar (Suzuki vd 2002). Dialil disülfid ve dialil sülfid gibi alil sülfidler hepatik GST aktivitesini uyarmak yoluyla hareket eden biyoaktif sarımsak bileşenleridir (Wu vd 2005). Brokoli, Brüksel lahanası, lahana ve karnıbahar içeren Brassicaceae ailesine ait sebzelerin içerisinde bulunan izotiyosiyanatlar ksenobiyotik metabolizmasını değiştirebilmektedirler (Valgimigli ve Iori 2009). Birçok besinsel bileşen hücre döngüsünün belli safhalarına etki edip hücreleri bloklayarak antiproliferatif etki gösterirler (Wu vd 2005). Hücre döngüsü tutuklanması DNA'nın etkin bir şekilde tamir edilme olasılığını artırır. Çeşitli besinsel lifler ve besinsel lif kaynakları heterosiklik amin gibi çeşitli hidrofobik kanserojenlere tutunarak antimutajeniteye katkıda bulunurlar. Hemin ve klorofilin gibi pirol halkası içeren pigmentlerin de benzer şekilde kanserojen tutma özellikleri bulunmaktadır. Klorofilin kanserojenleri durdurup onlarla sıkı sıkıya bağlanarak kullanılabilirliklerini

azaltır (Chiu vd 2003). Klorofilinde olduğu gibi DNA'ya atak yapmadan önce mutajeni inaktive eden bileşikler desmutajen, DNA replikasyonu ve tamir sistemine etki eden, DNA hasarının fiksasyonuna müdahale eden bileşikler de biyoantimutajen olarak adlandırılmaktadır. Günümüzde antigenotoksik etkiye sahip bileşiklerin araştırılması halen devam etmektedir.

Birçok çalışma HCA'ların oluşturduğu DNA hasarına karşı koruyucu olan besinsel bileşenleri belirlemeyi amaçlamıştır. Yenilebilir mantar türlerinin *Drosophila* DNA tamir test sisteminde MeIQx'in genotoksik etkisini azalttığı bulunmuştur (Taira vd 2005) Konjuge-linoleik asitin prostatta PhIP tarafından uyarılmış genotoksisiteyi azalttığı gösterilmiştir (Yang vd 2003). Ayrıca *Salmonella* mutajenite testinde S9 fraksiyonu eklenen çalışmada DiMeIQx, IQ, MeIQx, PhIP, Trp-P-2 HCA'larına karşı yeşil çay ve beyaz çayın antigenotoksik etkileri karşılaştırıldığında beyaz çayın koruyucu etkisinin daha fazla olduğu bulunmuştur. Tüm çaylar içerisinde en az işlem görmüş olan beyaz çay kurutma esnasında oksidasyona en az uğrayan ya da hiç uğramayan çay çeşidi olduğu için ROS süpürücü olarak hareket etmesi beklenebilir (Santana-Rios vd 2001).

Antigenotoksikite çalışmalarında SMART sistemi test bileşiklerinin uygulanması esnasında büyük çeşitlilik ve esneklik sağlamaktadır ve dolayısıyla farklı uygulama zamanları kullanılarak iki veya daha fazla bileşik test edilebilmektedir. Bu özelliklerinin yanı sıra kısa sürede sonuca ulaşılmasından dolayı SMART genotoksik araştırmaların yanında antigenotoksik araştırmalarda da oldukça uygun bir çalışma yöntemini oluşturmaktadır (Würgler ve Vogel 1986, Graf vd 1989).

Bu çalışmanın ikinci kısmında IQ ve MeIQx'in genotoksik etkilerini azaltmaya yönelik yeşil sebze ve meyvelerde bulunan klorofil türevlerinin (klorofil a ve klorofil b) etkileri araştırılmıştır. Klorofiller bitkilerde en bol bulunan yeşil pigmentlerdir ve özellikle yeşil meyve ve sebzelerin besinsel bileşenini oluştururlar. Ayrıca klorofil ve türevleri gıdaları renklendirmek amacıyla katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Egner vd 2001). Globulin yapısına eklenen hem grubuna benzer şekilde halkasal tetrapireol yapıdadır. Merkez metal atomu hem halkasında demir iken klorofil de magnezyumdur (DeVogel vd 2005).

Yaptığımız çalışmada normal ve yüksek metabolik aktiviteye sahip *Drosophila* hatlarına klorofil a ve klorofil b dozları hem HCA'larla birlikte eş zamanlı olarak hem de 48. saatte ön uygulama şeklinde besinle birlikte verilmiştir.

Normal metabolik aktiviteye sahip bireylerde, IQ ve klorofil eş zamanlı uygulamalarında 0.5 µM Klorofil a + 2 ppm IQ ve 0.5 µM Klorofil b + 2 ppm IQ dozları hariç diğer tüm gruplar genotoksik aktiviteyi azaltmıştır. Her iki doz da klon indüksiyon frekansında herhangi bir artış göstermemekle birlikte toplam klonlardaki frekans değişimi istatistiksel olarak negatif sonuç vermiştir. 2 ppm dozu hariç diğer dozlarda genotoksik etkideki azalma genel olarak klorofil maddelerinin dozuyla orantılıdır. Ön uygulama grubunda genotoksik etkideki azalma biraz daha dikkat çekmektedir. Ön uygulama eş zamanlı uygulama grubuna göre daha etkin antigenotoksik etki göstermiştir.

MeIQx 1 ve 5 ppm dozunun birlikte uygulamalarında 0.5 µM Kl r b uygulaması hariç diğer uygulamalarda genotoksik potansiyelin azaldığı görülmektedir. Bu dozlarda frekans artışı olmasına rağmen yapılan istatistiki analiz sonuçların negatif olduğunu göstermektedir. IQ eş zamanlı uygulamalarıyla karşılaştırıldığında genotoksik etkideki azalma daha belirgin olarak fark edilmektedir. Genel olarak ön uygulama grubundaki verilere göre, klorofil a ve klorofil b MeIQx'in genotoksik etkisini eş zamanlı uygulamalara göre daha etkili bir şekilde azaltmıştır. Demir vd (2008a, b), UV-B ile yapmış oldukları çalışmada hem klorofil hem de klorofilin ön uygulamasının koruyucu etkinliğin eş zamanlı uygulamaya oranla daha fazla arttığını belirlemişlerdir. Benzer şekilde *Drosophila* SMART ile gama radyasyonunun mutajenesininin 48. saat klorofilin ön uygulamasıyla azaldığı gösterilmiştir (Pimentel vd 1999).

Drosophila SMART yönteminde 84 ± 4 saatlik larvalara eş zamanlı uygulamaların klorofil ve klorofilin'in Trp-P-2 genotoksisitesini azalttıkları belirlenmiştir (Negishi vd 1989). Geç dönemde larval sindirim sisteminin PH'sının değişmesi nedeniyle klorofil + kimyasal etkileşiminin artmış olabileceği ve dolayısıyla koruyucu etkinliğin de buna paralel olarak artabileceği düşünülmektedir. Spektrofotometrik analizlerde sulu ortamda klorofil ve kimyasalın etkileşim içinde olduklarının belirlenmesi (Negishi vd 1997) bu düşüncüyü daha da kuvvetlendirmektedir. Böylece klorofil bileşikleri eş zamanlı

uygulamalarda desmutajenik etki göstererek kimyasalın kullanılabilirliğini azaltırlar. Ancak ön uygulama yapılan gruplarda daha etkin inhibisyon olması mutajen- klorofil etkileşiminin antigenotoksik etkide tek yol olmadığını düşündürmektedir. Yine spektrofotometrik veriler sonucunda klorofil'in DNA'da fosfat bağlarına ve büyük oluktaki G-C baz çiftinin N-7 G baz bölgesine bağlandığı gösterilmiştir (Neault and Tajmir-Riahi 1999, Tajmir-Riahi vd 2004). Böylece DNA ile kompleks oluşturan antimutajenler ROS'ların rahatlıkla atak yaptıkları DNA nükleofilik alanlarının korunmasını ve DNA çift ipliğinin stabilizasyonunu sağlarlar. Bir anlamda biyoantimutajenik özellik gösterdikleri söylenebilir. HCA metabolizmaları sırasında oluşan serbest radikallerin DNA'ya atak yapması bu yolla önleniyor olabilir. Ayrıca bakteriyel mutagenesis çalışmasında klorofil türevlerinin antimutajenik olduğu (Ferruzzi vd 2002) ve ıspanak su ekstraktından elde edilen klorofillerin 8-hidroksi-2'-deoksiguazin (8-OHdG) hasarını ve tek iplik DNA kırığını önemli derecede azalttığı (Hsu vd 2005) belirlenmiştir. Cho vd'nin (2006) yaptığı epidemiyolojik bir çalışmada klorofil'in ışık hasarına uğramış insan derisinde kollajen yapımının artması ve UV indüklü epidermal keratinosit hasarının azalmasıyla kırışıklıkları ve elastikiyeti iyileştirdiği belirtilmiştir. Klorofil ekstraktının ışık etkili kütin yaşlanmasını koruduğu ve tamir ettiği bildirilmektedir (Cho vd 2006). Demir vd'nin (2008a, b) yapmış oldukları çalışmada klorofil ve türevi olan klorofilinin benzer şekilde UV-B'nin oluşturduğu genotoksik hasarı etkili bir şekilde azalttığı gösterilmektedir. Böylece klorofil kimyasal ajanların yanı sıra fiziksel ajanların oluşturduğu zararlı etkilere karşı da etkin bir bileşik olduğu anlaşılmaktadır.

Klorofil ile yapılan az sayıdaki araştırmaya nispeten klorofilin ile yapılan çalışmalar oldukça fazladır. Klorofil pigmentlerinin suda çözünürlüğünün olmaması nedeniyle alternatif olarak yarı sentetik klorofilin bileşiğinin antigenotoksik etkileri çalışılmaktadır. Dolayısıyla klorofilin ile yapılan fazla sayıda çalışma bulunmaktadır. Klorofilinin antimutajenik, antioksidan ve antikanserojen özelliklerini sergileyen araştırmalar yapılmıştır. Klorofilinin, ROS'ların oluşturduğu hasarlara karşı mitokondri zararını koruduğu (Kamat vd 2000) ve karaciğerde lipit peroksidasyonunu inhibe ederek antioksidan aktivite sergilediği (Sato vd 1977, Sato vd 1980) aynı şekilde radyasyon tarafından uyarılan DNA ve mitokondriyal membran hasarını engellediği (Bloor vd.

2000) ve oksidatif hasara karşı DNA'yı etkili bir şekilde koruduğu gösterilmiştir (Kumar vd 1999). Ayrıca farelerde CrO₃ (kromium)'un oluşturduğu mikronükleus frekansını azalttığı (García-Rodríguez vd 2001) ve kimyasal indüklü deri tümörünün ilerlemesini engellediği (Chung vd 1999) gözlenmiştir. Benzer şekilde klorofilin'in koruyucu etkisini gösteren farklı çalışmalar bulunmaktadır (Breinholt vd 1995, Dashwood vd 1991, Kumar vd 2004, Morales-Ramírez vd 1995).

Klorofilinin etki mekanizmasının genellikle stk. P450 enzim sisteminin inhibe edilerek kimyasal aktivasyonunun engellemesi yoluyla olduğu belirtilmektedir (Yun vd 1995). Tachino vd (1994), *Salmonella*'da klorofilin'in benzo[a]pyrene'nin mutajenik aktivitesini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Spektrofotometrik çalışmalarda klorofilin'in stk. P450 enzimine bağlanmadığı ama enzimi dolaylı olarak inhibe ettiği belirtilmiştir. Böylece kimyasalın aktivasyonunu engelleyerek antimutajeniteye neden olduğu bildirilmiştir (Tachino vd 1994). Halbuki, Olvera vd (2000) yapmış oldukları *Drosophila* SMART uygulamalarında klorofilinin alkilleyici ajanların mutajenitelerini azaltırken metabolik aktivasyonun inhibe edilmesine gerek olmadığını söylemişlerdir. Sprague-Dawley sıçanlarında klorofilin'in, ön uygulamayla sindirim sisteminden IQ'nun emilimini azalttığı, eş zamanlı olarak uygulamayla da sindirim sisteminde IQ ile etkileşip kanserojen alınımını, dağılımını ve metabolizmasını azaltarak karaciğerde IQ-DNA bağlanmasını indirgediği belirtilmiştir (Dashwood 1992). Dolayısıyla *in vivo* şartlarda maddenin farklı hareket yolları bulunmakta ve alternatif mekanizmalarla etkilerini gösterebilmektedirler. Klorofilinin farklı mutajenlere karşı koruyucu etkilerinin aksine Negishi vd (2004) IQ'nun oluşturduğu DNA hasarını azaltmadığını göstermişlerdir ve IQ'nun *Drosophila*'da diğer organizmalardan farklı bir yolla hareket edebileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerde IQ'nun genotoksik etkiye neden olduğuna dair bir sonuç elde edilmemiştir. MeIQx bileşiğinin düşük dozlarında da genotoksik etki belirlenmemiştir. Diğer birçok çalışmanın aksine parçalanma ürünleri ana kimyasallar gibi genotoksik etki oluşturmamıştır. Bu nedenle IQ'nun her üç dozunun ve MeIQx'in iki düşük dozunun klorofil a ve klorofil b ile yapılan antimutajenite sonuçları tezde değerlendirilmemiştir Ancak 5 ppm dozundaki

frekans artışı istatistiksel olarak önemli düzeyde görülmektedir. Bu nedenle sadece bu dozda klorofil a ve klorofil b'nin antigenotoksik etkisi değerlendirilmiştir.

Eş zamanlı uygulamalarda 1 µM klorofil a uygulaması haricinde diğer klorofil uygulamalarında klon frekanslarında azalma olduğu belirlenmiştir. Klorofil a'nın bu dozundaki frekans artışı istatistiksel olarak negatif gözükmemektedir. Ön uygulama grubunda ise tüm dozlarda klon frekanslarının azaldığı görülmektedir. Normal metabolik aktiviteye sahip bireylerde olduğu gibi klorofil bileşiklerinin önceden uygulanması HCA'ların genotokisitesine karşı daha etkin bir koruma sağlamaktadır. Yapılan literatür taramasında bu kimyasallarla ilgili olarak doğrudan yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerle yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bakteriyel sistemlerle yapılan bir çalışmada alabalık karaciğer S9 fraksiyonu kullanılarak *Salmonella* mutajenite testinde klorofilinin farklı HCA'lara karşı antimutajenik etkisinin olduğu belirtilmektedir (Dashwood vd 1991). Yine *S. typhimurium* TA 1535/pSK 1002 suşunda klorofilinin metabolize edici enzim varlığında Trp-P-1'in uyardığı *umu C* geni ekspresyonunu baskılayıcı etki gösterdiği belirlenmiştir. Japon çayı yapraklarından izole edilen klorofil a antimutajenik olmakla birlikte klorofiline göre zayıf etki göstermiştir (Okai vd 1996). Ancak bu konuda klorofil a ve klorofil b ile yapılan farklı çalışmalar belirlenememiştir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada pişmiş et ve et ürünlerinin tüketilmesi ile vücudumuza aldığımız 2 heterosiklik amin bileşiğinin (IQ ve MeIQx) genotoksik etkilerine karşı yeşil sebze ve meyvelerde bulunan klorofil a ve klorofil b maddelerinin etkileri hem normal hem de yüksek metabolik aktiviteye sahip *Drosophila* hatları kullanılarak değerlendirilmiştir. Normal metabolik aktiviteye sahip bireylerde her iki kimyasal için belirlenen üç dozda da genotoksik etki gözlenmiştir. Ayrıca normal ve serrat fenotipli bireylerin karşılaştırılması ile genotoksik etkinin mitotik rekombinasyon sonucu ortaya çıktığı görülmüştür. Diğer taraftan aynı dozlar yüksek metabolik aktiviteye sahip bireylerde incelendiğinde IQ'nun genotoksik etkisinin olmadığı görülmüştür. MeIQx ise düşük dozlarda genotoksik etki göstermezken yüksek dozda istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar vermiştir. Normal ve yüksek metabolik aktiviteli bireylerde gözlenen bu sonuçların karşılaştırılması bu heterosiklik aminlerin genel olarak doğrudan genotoksik etkiye neden olduğunu göstermektedir. Bir başka deyişle kimyasalın kendisi genotoksik etki gösterirken metabolizma sonucunda ortaya çıkan metabolitlerinin genotoksik olmadığı görülmektedir. Ancak yüksek dozda MeIQx metabolitleri ana bileşik kadar olmasa da genotoksik etkiye sahiptir.

Antigenotoksik etkiyi belirlemek için aynı şekilde normal ve yüksek metabolik aktiviteye sahip bireyler kullanılarak klorofil a ve klorofil b'nin etkileri araştırılmıştır. Bunun için klorofil a ve b maddeleri eş zamanlı ve ön uygulama şeklinde larvalara ağız yoluyla verilmiştir. Normal metabolik aktiviteli bireylerde iki kimyasal içinde her iki uygulama yöntemi genotoksik etkinin azaltılmasında etkili olmuştur. Bununla birlikte klorofil ön uygulamasının eş zamanlı uygulamalara göre biraz daha etkili olduğu belirlenmiştir. Yüksek metabolik aktiviteli bireylerde IQ'nun genotoksitelerinde çözücü kontrol olarak kullanılan DMSO'ya göre istatistiksel düzeyde önemli bir fark gözlenmediği için klorofil a ve b ile yapılan antimitojenite çalışmaları değerlendirmeye alınmamıştır. MeIQx'in düşük dozlarında aynı şekilde genotoksik etki tespit edilmemiştir. Sadece 5 ppm yüksek dozunda ortaya çıkan genotoksik etki klorofil a ve b açısından değerlendirilmiştir. Ön uygulama gruplarının eş zamanlı uygulamalara göre daha etkili olduğu görülmektedir.

Ayrıca bu kimyasalların epidemiyolojik ve deneysel çalışmalarda kanserojenik etkiye neden olması nedeniyle muhtemel zararlarının ortadan kaldırılması için daha fazla bilimsel veriye gerek duyulmaktadır. Kimyasal maddelerin metabolizmaları ve dağılımları göz önünde bulundurulduğunda alt organizasyonlu olan *D. melanogaster* hem genotoksik hem de antigenotoksik araştırmalarda önemli ve hassas bir model organizmadır. Çeşitli çevresel etkenlerin genetik materyalde oluşturabileceği hasarlara karşı genomik stabiliteyi sağlayacak çeşitli koruyucu ajanların belirlenmesi hem bireysel hem de gelecek nesillerin sağlığıyla yakından ilgilidir. Bu çalışmadan elde edilen bulguların daha sonra yapılacak olan çalışmalara kaynak teşkil edeceği düşünülmektedir. Ayrıca yapılan çalışma ökaryotik sistemde *in vivo* bir çalışma olması ve kullanılan organizmanın ve memeli sisteminin genetik yapısının büyük homoloji göstermesi elde edilen sonuçların önemini daha da arttırmaktadır.

6. KAYNAKLAR

- AESCHBACHER, H.U. and RUCH, E. 1989. Effect of heterocyclic amines and beef extract on chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Carcinogenesis*, 10 (3): 429-431.
- ALARCO'N DE LA LASTRA, C. and VILLEGAS, I. 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc T*, 35(5):1156-1160.
- BALOGH, Z., GRAY, J. I., GOMAA, E. A. and BOOREN, A. M. 2000. Formation and Inhibition of Heterocyclic Aromatic Amines in Fried Ground Beef Patties. *Food Chem Toxicol*, 38: 395-401.
- BERNARDS, A. and HARIHARAN, I. K. 2001. Of flies and men- studying human disease in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev*, 11:274-278.
- BLOCK, G. 1991. Vitamin C and cancer prevention: the epidemiological evidence. *Am. J. Clin. Nutr.* 53:270-280.
- BOLOOR, K.K., KAMAT, J.P. and DEVASAGAYAM, T.P. 2000. Chlorophyllin as a protector of mitochondrial membranes against gamma radiation and photosensitization. *Toxicology*, 155: 63-71.
- BOOBIS, A.R., LYNCH, A.M., MURRAY, S., DE LA TORRE, R., SOLANS, A., FARR, M., SEGURA, J., GOODERHAM, N. J., and DAVIES, D.S. 1994. CYP1A2-catalyzed conversion of dietary heterocyclic amines to their Proximate carcinogens is their major route of metabolism in humans. *Cancer Res*, 54: 89-94.
- BREINHOLT, V., HENDRICKS, J., PEREIRA, C., ARBOGAST, D., and BAILEY, G. 1995 Dietary chlorophyllin is a potent inhibitor of aflatoxin B, hepatocarcinogenesis in rainbow trout. *Cancer Res*, 55: 57-62.
- BUTLER, M.A., GUENGERICH, F.P., and KADLABUR F.F. 1989. Metabolic oxidation of the carcinogens 4-aminobiphenyl and 4,4-methylenebis(2-chloroaniline) by human hepatic microsomes and by purified rat hepatic cytochrome P-450 monooxygenases, *Cancer Res*. 49: 25-31.
- BYERS, T., and PERRY, G. 1992. Dietary carotenes, vitamin C and vitamin E as protective antioxidant in human cancer. *Ann Rev Nutr*, 12:139-159.
- CHENG, K.W., WU, Q., ZHENG, Z.P., PENG, X., SIMON, J.E, CHEN, F. and WANG, M. 2007. Inhibitory Effect of Fruit Extracts on the Formation of Heterocyclic Amines. *J Agric Food Chem*. 55(25):10359-61035.

- CHIU, L.C.M., KONG, C.K.L. and OOI, V.E.C. 2003. Antiproliferative effect of chlorophyllin derived from a traditional Chinese medicine *Bombyx mori* excreta on human breast cancer MCF-7 cells. *Int J Oncol*, 23:729-335.
- CHO, S., LEE, D.H., WON, C.H., KIM, S.M. LEE, S. LEE, M.J. and CHUNG, J.H. 2006. Drink Containing Chlorophyll Extracts Improves Signs of Photoaging and Increases Type I Procollagen in Human Skin in vivo. *Korean Journal of Investigative Dermatology*. 13(4):111-119.
- CHUNG, W.Y., LEE, J.M., PARK, M.Y., YOOK, J.I., KIM, J., CHUNG, A.S., SURH, Y.J., and PARK, K.K. 1999. Inhibitory effects of chlorophyllin on 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-induced bacterial mutagenesis and mouse skin carcinogenesis. *Cancer Lett*, 145(1): 57-64.
- COLVIN, M.E., HATCH, F.T. and FELTON, J.S. 1998. Chemical and biological factors affecting mutagen potency. *Mutat Res-Fund Mol M*, 400 (1-2): 479-492.
- DASHWOOD, R.H., BREINHOLT, V. and BAILEY, G. S. 1991. Chemopreventive properties of chlorophyllin: inhibition of aflatoxin B₁ (AFB₁)-DNA binding in vivo and anti-mutagenic activity against AFB₁ and two heterocyclic amines in the salmonella mutagenicity assay. *Carcinogenesis*, 12(5): 939-942.
- DASHWOOD, R.H. 1992. Protection by chlorophyllin against the covalent binding of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ) to rat liver DNA. *Carcinogenesis*, 13(1): 113-118.
- DASHWOOD, R.H. 2002. Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an 'A-to-Z' guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models. *Mutat Res*, 511(2):89-112.
- DAVIS, C.D., SCHUT, H.A. and SNYDERWINE, E.G. 1993a. Enzymatic phase II activation of the N-hydroxylamines of IQ, MeIQx and PhIP by various organs of monkeys and rats. *Carcinogenesis*, 14(10):2091-2096.
- DAVIS C.D, SCHUT H.A, ADAMSON R.H, THORGEIRSSON U.P, THORGEIRSSON S.S, and SNYDERWINE E.G. 1993b. Mutagenic activation of IQ, PhIP and MeIQx by hepatic microsomes from rat, monkey and man: low mutagenic activation of MeIQx in cynomolgus monkeys in vitro reflects low DNA adduct levels in vivo. *Carcinogenesis*, 14(1):61-65.
- DE FLORA, S., IZZOTTI, A.D., D'AGOSTINI, F., BALANSKY, R.M., NOONAN, D. and ALBINI, A. 2001. Multiple point of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. *Mutat Res*, 480: 9-22.
- DE VOGEL, J., JONKER-TERMONT, D.S, KATAN, M.B. and VAN DER MEER, R. 2005. Natural chlorophyll but not chlorophyllin prevents heme-induced cytotoxic and hyperproliferative effects in rat colon. *J Nutr*, 135(8):1995-2000.

- DEMIR, E, KOCAOGLU, S, and KAYA, B. 2008a. Protective Effects Of Chlorophyll Against The Genotoxicity Of Uvb In *Drosophila* Smart Assay. *Fresen Environ Bull*, 17 (12B): 2180-2186.
- DEMIR, E, KOCAOGLU, S, and KAYA, B. 2008b. Protection Against Ultraviolet B-Induced Genotoxicity by the Chlorophyllin in *Drosophila melanogaster*. *Fresen Environ Bull*, 17(12B): 2187-2192.
- DURLING, L.J.K., and ABRAMSSON-ZETTERBERG, L. 2005. A comparison of genotoxicity between three common heterocyclic amines and acrylamide *Mutat Res* 580 103–110.
- EGNER, P. A., WANG, J.B., ZHU, Y.R., ZHANG, B.C., WU, Y., ZHANG, Q.N., QIAN, G.S., KUANG, S.Y., GANGE, S. J., JACOBSON, L.P. , HELZLSOUER, K.J. , BAILEY, G. S., GROOPMAN, J. D., and KENSLER, T.W. 2001. Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin–DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. *Medical Sciences*, 98(25): 14601–14606
- EGNER, P.A., MUÑOZ, A., and KENSLER, T.W. 2003. Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin. *Mutat Res*, 523–524: 209–216.
- FABIANI, R., BARTELOMEO, A., ROSIGNOLI, P., and MOROZZI, G. 2001. Antioxidants prevent the lymphocyte DNA damage induced by PMA-stimulated monocytes. *Nutr Cancer*, 39:284-291.
- FELTON, J. S., FULTZ, E., DOLBEARE, F. A. and KNIZE, M. G. 1994. Reduction of heterocyclic aromatic amine mutagens/carcinogens in fried patties by microwave pretreatment. *Food Chem Toxicol*, 30:897-903.
- FERGUSON, L.R., PHILPOTT, M., and KARUNASINGHE, N. 2004. Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology*, 198:147–159.
- FERRUZZI, M.G., BOHM, V., COURTNEY, P.D., and SCHWARTZ, S.J. 2002. Antioxidant and Antimutagenic Activity of Dietary Chlorophyll Derivatives Determined by Radical Scavenging and Bacterial Reverse Mutagenesis Assays. *J Food Sci: Food Chemistry and Toxicology*, 67(7): 2589-2595.
- FREI, H. and WURGLER, F.E. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenic test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results. *Mutat Res*, 203: 297-308.
- FREI, H. and WURGLER, F.E. 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat Res*, 334: 247-258.
- GARCIA-BELLIDO, A. and MERIAM, J.R. 1971. Parameters of the wings imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*, 24: 61-87.

- GARCIA-BELLIDO, A. and DAPENA, J. 1974. Induction, detection and characterization of cell differentiation mutations in *Drosophila*. *Mol Gen Genet*, 128: 117-130.
- GARCÍA-RODRÍGUEZ, M. C., LÓPEZ-SANTIAGO V. and ALTAMIRANO-LOZANO M. 2001. Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutat Res-Gen Tox En*, 496 (1-2):145-151.
- GENTILE, J.M., and GENTILE, G.J. 1991. The metabolic activation of 4-nitro-*o*-phenylenediamine by chlorophyll-containing plant extract: the relationship between mutagenicity and antimutagenicity. *Mutat Res*, 250, 79-86.
- GOODERHAM, N. J., MURRAY, S., LYNCH, A.M., YADOLLAHI-FARSANI, M., ZHAO, K., BOOBIS A.R., and DAVIES, D. S. 2001. Food-Derived Heterocyclic Amine Mutagens: Variable Metabolism and Significance To Humans. *Drug Metab Dispos*, 29(4-2): 529-534.
- GRAF, U., JUON, H., KATZ, A.J., FREI, H.J., and WURGLER, F.E. 1983. A pilot study on a new *Drosophila* spot test. *Mutat Res*, 120(4):233-239.
- GRAF U., WURGLER F.E., KATZ A.J., FREI H., JUAN H., HALL C.B., and KALE P.G. 1984. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*, *Environ. Mutagenesis*, 6: 153-188.
- GRAF, U., FREI, H., KAGI, A., KATZ, A.J. and WURGLER, F.E. 1989. Thirty compounds tested in *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res*, 222: 359-373.
- GRAF, U. and VAN SCHAIK, N. 1992. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 1(1):59-67.
- GRAF, U., VAN SCHAIK, N., and WURGLER, F.E. 1992. *Drosophila* Genetics "a practical course" 239 pp., New York.
- GRAF, U. (1995). Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Cell Mol Life Sci*, 51(2): 168-173.
- GRAF, U., ABRAHAM, S.K, GUZMÁN-RINCÓN, J. and WURGLER, F.E. 1998. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res-Fund Mol M*, 402(1-2): 203-209.
- GUZMÁN-RINCÓN, J and GRAF, U. 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. *Biomonitor and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. New York. Butterworth, F. M. (editor). 169-181.

- HARTMAN, P.E., and SHANKEL, D.M. 1990. Antimutagens and anticarcinogens: A survey of putative interceptor Molecules. *Environ Mol Mutagen*, 15: 145-182
- HEDDLE, J.A., KNIZE, M.G., DAWOD, D. and ZHANG, X.B. 2001. A test of the mutagenicity of cooked meats *in vivo*. *Mutagenesis*, 16(2):103-107.
- HOSHI, M., MORIMURA, K., WANIBUCHI, H., WEI, M., OKOCHI, E., USHIJIMA, T., TAKAOKA K. and FUKUSHIMA S. 2004. No-Observed Effect Levels for Carcinogenicity and for *in vivo* Mutagenicity of a Genotoxic Carcinogen. *Toxicol Sci*, 81(2): 273-279.
- HSU, C.Y., YANG, C.M., CHEN, C.M., CHAO, P.Y. and HU, S.P. 2005. Effects of Chlorophyll-Related Compounds on Hydrogen Peroxide Induced DNA Damage within Human Lymphocytes. *J Agric Food Chem*, 53, 2746-2750.
- [Http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/picrender.fegi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/picrender.fegi)
- ICIEK, M., KWIECIEN, I., and WŁODEK, L. 2009. Biological Properties of Garlic and Garlic-Derived Organosulfur Compounds. *Environ Mol Mutagen*, 50:247-265.
- IDAOMAR, M., EL HAMSSA, R., BAKKALI, F., MEZZOUGA, N., ZHIRI, A., BAUDOUX, D. , MUÑOZ-SERRANO , A., LIEMANS, V., and ALONSO-MORAGA, A. 2002. Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 513: 61–68.
- ITOH, T., SUZUKI, T., NISHIKAWA A., FURUKAWA, F. TAKAHASHI, M. XUE, W., SOFUNI, T., HAYASHI, M., 2000. *In vivo* genotoxicity of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in *lacI* transgenic Big Blue w/miceq. *Mutat Res*, 468:19–25.
- ITOH, T., KUWAHARA, T., SUZUKI, T., HAYASHI, M. and OHNISHI, Y. 2003. Regional mutagenicity of heterocyclic amines in the intestine: mutation analysis of the *cII* gene in lambda/*lacZ* transgenic mice. *Mutat Res-Gen Tox En*, 539 (1-2): 99-108.
- JACKSON, L. S. and HARGRAVES, W.A. 1995. Effects of Time and Temperature on the Formation of MeIQ, and DiMeIQ, in a Model System Containing Threonine, Glucose, and Creatine. *J Agric. Food Chem*. 43: 1678–1 684.
- JÄGERSTAD, M. SKOG, K. ARVIDSSON, P. and SOLYAKOV, A. 1998. Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic amines identified in model systems and cooked foods. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 207:419–427.
- JÄGERSTAD M, and SKOG K. 2005. Genotoxicity of heat-processed foods. *Mutat Res*, 574(1-2):156-72.

- KAMAT, J.P. and BOLOOR, K.K., DEVASAGAYAM, T.P. 2000. Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage in vitro and ex vivo. *Biochim Biophys Acta*, 1487, 113-127.
- KASSIE, F., SUNDERMANN, V.M., EDENHARDER, R., PLATT, K.L., DARROUDI, F., LHOSTE, E., HUMBOLT, C., MUCKEL, E., UHL, M., KUNDI, M., KNASMÜLLER, S. 2003. Development and application of test methods for the detection of dietary constituents which protect against heterocyclic aromatic amines. *Mutat Res-Fund Mol M*, 523–524: 183–192.
- KASTENBAUM, M.A. and BOWMAN, K. O. 1970. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutat Res*, 9: 527-549.
- KAYA, B., YANIKOĞLU, A. and MARCOS, R. 1999. Genotoxicity studies on the phenoxyacetates 2,4-D and 4-CPA in the *Drosophila* wing spot test. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis*, 19: 305-312.
- KAYA, B. 2000. Bazı pestisitlerin *Drosophila melanogaster* hatlarında mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, 134 ss.
- KAYA, B., CREUS, A., YANIKOĞLU, A., CABRE, O., and MARCOS, R. 2000. Use of the *Drosophila* Wing Spot Test in the Genotoxicity Testing of Different Herbicides. *Environ Mol Mutagen*, 36:40 -46.
- KIKUGAWA, K. 1999. Involvement of free radicals in the formation of heterocyclic amines and prevention by antioxidants. *Cancer Lett*, 143(2): 123-126.
- KIM, S.G., SURH, Y.J., and MILLER, J.A. 1999. Inhibitory effects of chlorophyllin on micronucleus formation induced by ethyl carbamate and its proximate and ultimate carcinogenic forms in Mouse peripheral reticulocytes. *Environ Mol Mutagen*, 34:57-60.
- KNASMULLER, S., SCHWAB, C.E., LAND, S.J., WANG, C.Y., SANYAL, R., KUNDI, M., PARZEFALL, W. and DARROUDI, F. 1999. Genotoxic effects of heterocyclic aromatic amines in human derived hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis*, 14(6):533-540.
- KNIZE, M.G., SALMON, C.P., and FELTON, J.S. 2003. Mutagenic activity and heterocyclic amine carcinogens in commercial pet foods. *Mutat Res* 539: 195–201.
- KUDO M, OGURA T, ESUMI H, SUGIMURA T. 1991. Mutational activation of c-Ha-ras gene in squamous cell carcinomas of rat Zymbal gland induced by carcinogenic heterocyclic amines. *Mol Carcinog*, 4(1):36-42.

- KUMAR, S.S., CHAUBEY, R.C., DEVASAGAYAM, T.P.A., PRIYADARSINI, K.I., CHAUHAN, P.S. 1999. Inhibition of radiation-induced DNA damage in plasmid pBR322 by chlorophyllin and possible mechanism(s) of action. *Mutat Res*, 425(1): 71-79.
- KUMAR, S.S., SHANKAR, B., and SAINIS, K.B. 2004. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in splenic lymphocytes in vitro and in vivo. *Bioch Bioph Acta*, 1672 : 100–111.
- LARSEN, C.S. 2003. Supplement: Animal Source Foods to Improve Micronutrient Nutrition in Developing Countries Animal Source Foods and Human Health during Evolution. *J Nutr*, 133:3893-3897.
- LEWIS, E.B. and BACHER, F. 1968. Methods of feeding ethylmethanesulfonate (EMS) to *Drosophila* males. *Drosophila. Inf Serv*, 43: 193.
- LINDSLEY, D.L. and GRELL, E.H. 1968. Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution of Washington Publ. 627., 472 pp., Washington DC.
- LINDSLEY, D.L., and ZIMM, G.G. 1992. "The Genome of *Drosophila melanogaster*", Academic Press, 1133 pp. San Diego, CA.
- LYNCH, A.M., GOODERHAM, N.J. and BOOBIS, A.R. 1996. Organ distinctive mutagenicity in MutaTMMouse after short-term exposure to PhIP. *Mutagenesis*, 11 (5):505-509.
- LYNCH, A.M., GOODERHAM, N.J., DAVIES, D. and BOOBIS, A.R. 1998. Genetic analysis of PHIP intestinal mutations in MutaTMMouse. *Mutagenesis*, 13(6): 601-605.
- MALFATTI, M.A., CONNORS, M.S., MAUTHE, R.J., and FELTON, J.S. 1996. The Capability of Rat Colon Tissue Slices to Metabolize the Cooked-Food Carcinogen 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Res*, 56: 2550-2555.
- MASUMURA, K.I., HORIGUCHI, M. NISHIKAWA, A. UMEMURAB, T., KANKI K., KANKE, Y., NOHMIA, T. 2003. Low dose genotoxicity of 2-amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f] quinoxaline (MeIQx) in *gpt* delta transgenic mice. *Mutat Res*, 10;541(1-2):91-102.
- MONTI, S.M., RITIENI, A., SACCHI, R., SKOG, K., BORGAN, E., and FOGLIANO, V. 2001. Characterization of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil and Their Effect on the Formation of Carcinogenic/Mutagenic Heterocyclic Amines in a Model System. *J Agric Food Chem*, 49: 3969-3975.

- MORALES-RAMIREZ, P. and MENDIOLA-CRUZ, M.T. 1995. In vivo radioprotective effect of chlorophyllin on sister chromatid exchange induction in murine spermatogonial cells. *Mutat Res-Gen Tox*, 344(1-2): 73-78.
- MORTELMANS, K. and ZEIGER, E. 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mut Res*, 455: 29–60.
- MURKOVIC, M, STEINBERGER, D, and PFANNHAUSER, W. 1998. Antioxidant spices reduce the formation of heterocyclic amines in fried meat. *Z Lebensm Unters Forsch A*. 207(6):477–80.
- MURKOVIC, M. 2004. Formation of heterocyclic aromatic amines in model systems. *J Chromatogr B*, 802:3–10.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1983. Quantitative relationship between mutagenic and carcinogenic potencies: A feasibility study. Committee on Chemical Environmental Mutagens Board on Toxicology and Environmental Health Hazards Commission on Life Sciences National Research Council. National Academy Press. Washington, D.C. Pp 37).
- NEAULT, J. F. and TAJMIR-RIahi, H. A. 1999. Structural Analysis of DNA-Chlorophyll Complexes by Fourier Transform Infrared Difference Spectroscopy. *Biophys J*, 76:2177–2182
- NEGISHI, T., ARIMOTO, S., NISHIZAKI, C. and HAYATSU, H. 1989. Inhibitory effect of chlorophyll on the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2). *Carcinogenesis*, 10 (1): 145-149.
- NEGISHI, T., ARIMOTO, S., NISHIZAKI, C., HAYATSU, H. 1990. Inhibition of the genotoxicity of 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2) in *Drosophila* by chlorophyll. *Basic Life Sci*, 52, 341-344.
- NEGISHI, T., RAI, H. and HAYATSU, H. 1997. Antigenotoxic activity of natural chlorophylls. *Mutat Res*, 376: 97-100.
- NEGISHI, T, SHINODA, A, ISHIZAKI, N, HAYATSU, H, SUGIYAMA, C. 2004. No effects of chlorophyllin on IQ (2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinoline)-genotoxicity and -DNA adduct formation in *Drosophila*. *Biol Pharm Bull*, 27(2):242-243.
- NISHIKAWA, A., IMAZAWA, T., KUROIWA, Y., KITAMURA, Y., KANKI, K., ISHII, Y., UMEMURA, T. and HIROSE, M. 2005. Induction of Colon Tumors in C57BL/6J Mice Fed MeIQx, IQ, or PhIP Followed by Dextran Sulfate Sodium Treatment. *Toxicol Sci*, 84:243–248.
- ODIN, A.P. 1997. Vitamins as antimutagens: Advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. *Mutat Res-Rev Mutat*, 386(1): 39-67.

- OKAI, Y., HIGASHI-OKAI, K., YANO, Y. and OTANI, S. 1996. Suppressive effects of chlorophyllin on mutagen-induced *umu C* gene expression in *Salmonella typhimurium* (TA 1535 / pSK 1002) and tumor promoter-dependent ornithine decarboxylase induction in BALB/c 3T3 fibroblast cells. *Mutat Res-Gen Tox*, 370(1): 11-17.
- OLVERA, O., ARCEO, C., and ZIMMERING, S., 2000, Chlorophyllin [CHLN] and the mutagenicity of monofunctional alkylating agents in *Drosophila*: the action of CHLN need not include an influence on metabolic activation. *Mutat Res* 467:113–117.
- ONG, T., WHONG, W.Z., STEWART, J., and BROCKMAN, H.E. 1989. Comparative antimutagenicity of 5 compounds against 5 mutagenic complex mixtures in *Salmonella typhimurium* strain TA98. *Mutat Res*, 222, 19-25.
- OSABA, L, AGUIRRE, A, ALONSO, A, and GRAF, U. 1999, Genotoxicity testing of six insecticides in two crosses of the *Drosophila* wing spot test. *Mutat Res*, 439(1):49-61.
- PALADINO, G., WEIBEL, B. and SENGSTAG, C. 1999. Heterocyclic aromatic amines efficiently induce mitotic recombination in metabolically competent *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Carcinogenesis*, 20 (11): 2143-2152.
- PEARSON, A.M, CHEN, C, and GRAY, J.I, AUST, S.D. 1992. Mechanism(s) involved in meat mutagen formation and inhibition. *Free Radic Biol Med*, 13(2):161-167.
- PERSSON, E., SJÖHOLM, I., and SKOG, K., 2003. Effect of high water-holding capacity on the formation of heterocyclic amines in fried beefburgers, *J Agric Food Chem*, 51: 4472–4477.
- PFAU, W., MARTIN, F.L., COLE, K.J., VENITT, S., PHILLIPS, D. H., GROVER, P. L. and MARQUARDT, H. 1999. Heterocyclic aromatic amines induce DNA strand breaks and cell transformation. *Carcinogenesis*, 20(4):545–551.
- PIMENTEL, E., CRUCES, M.P. and ZIMMERING, S. 1999. On the persistence of the radioprotective effect of chlorophyllin (CHLN) in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat Res-Gen Tox En*, 446(2):189-192.
- POTTER, C.J., TURENCHALK, G.S. and XU, T. 2000. *Drosophila* in cancer research. *TIG.*, 16(1): 33-39.
- PUANGSOMBAT, K. and SMITH, J.S. 2010. Inhibition of Heterocyclic Amine Formation in Beef Patties by Ethanolic Extracts of Rosemary. *J Food Sci*, 75(2):40-47.

- RAMIREZ-VICTORIA, P., GUZMAN-RINCON, J., ESPINOSA-AGUIRRE, J.J. and MURILLO-ROMERO, S. 2001. Antimutagenic effect of one variety of green pepper (*Capsicum* spp.) and its possible interference with the nitrosation process. *Mutat Res-Gen Tox En*, 496(1-2): 39-45.
- RENNER, H.W. 1990. In vivo effects of single or combined dietary antimutagens on mutagen-induced chromosomal aberrations. *Mutat Res*, 244, 185-188.
- ROBBANA-BARNAT, S. RABACHE, M. RIALLAND, E. and FRADIN', J. 1996. Heterocyclic Amines: Occurrence and Prevention in Cooked Food. *Environ Health Perspect*, 104(3): 280-288.
- ROJAS-MOLINA, M., CAMPOS-SÁNCHEZ, J., ANALLA, M., MUÑOZ-SERRANO, A., and ALONSO-MORAGA, Á. 2005. Genotoxicity of vegetable cooking oils in the *Drosophila* wing spot test. *Environ Mol Mutagen*, 45(1):90-95.
- ROTHWEL V.N. 1993. Understanding Genetics, A Molecular Approach. A John Wiley & Sons Inc. Publ. New York. 556 pp.
- SADRIEH, N., DAVIS, C.D., and SNYDERWINE, E.G. 1996. N-acetyltransferase expression and metabolic activation of the food-derived heterocyclic amines in the human mammary gland. *Cancer Res*, 56(12):2683-2687.
- SALMON, C.P., KNIZE, M.G. and FELTON, J.S. 1997. Effects of marinating on heterocyclic amine carcinogen formation in grilled chicken. *Food Chem Toxicol*, 35(5):433-441.
- SANTANA-RIOS, G., ORNER, G.A., AMANTANA, A. PROVOST C., WU, S.Y., and DASHWOOD, R.H. 2001. Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the *Salmonella* assay. *Mutat Res*, 495: 61-74.
- SASAKI, Y.F., SAGA, A., AKASAKA, M., NISHIDATE, E., WATANABE-AKANUMA, M. OHTA, T., MATSUSAKA, N. and TSUDA, S. 1997. In vivo genotoxicity of heterocyclic amines detected by a modified alkaline single cell gel electrophoresis assay in a multiple organ study in the Mouse. *Mutat Res-Gen Tox En*, 395(1):57-73.
- SASAKI, Y.F., SAGA, A., YOSHIDA, K., SU, Y.Q., OHTA, T., MATSUSAKA, N. and TSUDA S. 1998. Colon-specific genotoxicity of heterocyclic amines detected by the modified alkaline single cell gel electrophoresis assay of multiple mouse organs. *Mutat Res-Gen Tox En*, 414(1-3): 9-14.
- SATO, M., IGUCHI, N. and MURATA, T. 1977. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation: I. Effect on lipid peroxidation in rat homogenates in the presence of both Fe²⁺ and L-ascorbic acid. *Yakugaku Zasshi*, 97:268-273.

- SATO, M., IMAI, K., and MURATA, T. 1980. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation: The antioxidative activities of the commercial preparations of sodium copper chlorophyllin. *Yakugaku Zasshi*, 100:580–584.
- SCHUT, H.A.J. and SNYDERWINE, E.G. 1999. DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 20(3):353–368.
- SELBY, P.B. and OLSON, W.H. 1981. Methods and criteria for deciding whether specific-locus mutation-rate data in mice indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat Res*, 203: 297-308.
- SHIN, A., SHRUBSOLE, M.J., NESS, R.M., WU, H., SINHA, R., SMALLEY, W.E., SHYR, Y., and ZHENG, W. 2007. Meat and meat-mutagen intake, doneness preference and the risk of colorectal polyps: The Tennessee Colorectal Polyp Study. *Int J Cancer*, 121:136–142.
- SINHA, R., KULLDORFF, M., CHOW, W.H., DENOBILE, J., and ROTHMAN, N. 2001. Dietary intake of heterocyclic amines, meat-derived mutagenic activity, and risk of colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10(5): 559–562.
- SINHA, R. 2002. An epidemiologic approach to studying heterocyclic amines. *Mutat Res*, 506–507:197–204.
- SKOG, K., KNIZE, M.G., FELTON, J.S. and JÄGERSTAD, M. 1992. Formation of new heterocyclic amine mutagens by heating creatinine, alanine, threonine and glucose. *Mutat Res*, 268:191–197.
- SKOG, K.I., JOHANSSON, M.A., and JÄGERSTAD, M.I. 1998. Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food Chem Toxicol*, 36(9-10):879-96.
- SKOG, K. and SOLYAKOV, A., 2002. Heterocyclic amines in poultry products: A literature review. *Food Chem Toxicol*, 40, 1213-1221
- SNYDERWINE, E.G., NOUSO, K., and SCHUT, H.A. 1993. Effect of 3-methylcholanthrene induction on the distribution and DNA adduction of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) in F344 rats. *Food Chem Toxicol*, 31(6):415-23.
- SUGIYAMA, C., SHINODA, A., HAYATSU, H., and NEGISHI, T. 1996. Inhibition of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline-mediated DNA-adduct formation by chlorophyllin in *Drosophila*. *Jpn. J. Cancer Res*, 87(4):325-8.

- SUZUKI, K., KOIKE, H., MATSUI, H., ONO, Y., HASUMI, M., NAKAZATO, H., OKUGI, H., SEKINE, Y., OKI, K., ITO, K., YAMAMOTO, T., FUKABORI, Y., KUROKAWA, K. and YAMANAKA, H. 2002. Genistein, a soy isoflavone, induces glutathione peroxidase in the human prostate cancer cell lines LNCaP and PC-3. *Int J Cancer*, 99(6):846–852.
- SZABAD, J., SOOS, I., POLGAR, G. and HEJJA G. 1983. Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mozaik and the sex-linked recessive lethal test. *Mutat Res*, 113: 117-133.
- TACHINO, N., GUO, D., DASHWOOD, W. M., YAMANE, S., LARSEN, R. and DASHWOOD, R. 1994. Mechanisms of the in vitro antimutagenic action of chlorophyllin against benzo[a]pyrene: Studies of enzyme inhibition, molecular complex formation and degradation of the ultimate carcinogen. *Mutat Res-Fund Mol M*, 308(2): 191-203.
- TAIRA, K., MIYASHITA, Y., OKAMOTO, K., ARIMOTO, S., TAKAHASHI, E., NEGISHI, T. 2005. Novel antimutagenic factors derived from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Mutat Res*, 586: 115–123.
- TAJMIR-RIAHI, H.A., NEAULT, J.FR. and DIAMANTOGLOU, S. 2004. DNA adducts with chlorophyll and chlorophyllin as antimutagenic agents synthesis, stability, and structural features. from: *Methods in Molecular Biology, Vol. 274: Photosynthesis Research Protocols*. Edited by: R. Carpentier © Humana Press Inc., Totowa, NJ. ISBN:1588292320, 360 pp.
- TERWEL, L., and VAN DERHOEVEN, J.C.M. 1985. Antimutagenic activity of some naturally occurring compounds towards cigarette smoke condensate and benzo[a]pyrene in the *Salmonella*/ microsome assay. *Mutat Res*, 152, 1-4.
- THOMPSON, L.H., CARRANO, A.V, SALAZAR, E., FELTON, J.S., HATCH, F.T. 1983. Comparative genotoxic effects of the cooked-food-related mutagens Trp-P-2 and IQ in bacteria and cultured mammalian cells. *Mutat Res*, 117(3-4):243-57.
- THOMPSON, L.H., TUCKER, J.D., STEWART, S.A., CHRISTENSEN, M.L. SALAZAR, E.P. CARRANO, A.V., and FELTON, J.S. 1987. Genotoxicity of compounds from cooked beef in repair-deficient CHO cells versus *Salmonella* mutagenicity. *Mutagenesis*, 2(6):483–487.
- TOHDA, H., OIKAWA, A., KAWACHI, T. and SUGIMURA T. 1980, Induction of sister-chromatid exchanges by mutagens from amino acid and protein pyrolysates. *Mutat Res-Gen Toxicol*, 77(1): 65-69.
- TURESKY, R.J., SKIPPER, P.L., TANNENBAUM, S.R., COLES, B. and KETTERER, B. 1986. Sulfamate formation is a major route for detoxification of 2-amino-3-methylimidazo[4, 5-f]quinoline in the rat. *Carcinogenesis*, 7(9): 1483-1485.

- TURESKY, R.J., AESCHBACHER, H.U., WURZNER, H.P. SKIPPER, P.L. and Tannenbaum S.R. 1988. Major routes of metabolism of the food-borne carcinogen 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in the rat. *Carcinogenesis*, 9 (6): 1043-1048.
- TURESKY, R.J., LANG, N.P., BUTLER, M.A., TEITEL, C.H. and KADLUBAR, F.F. 1991. Metabolic activation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by human liver and colon. *Carcinogenesis*, 12 (10):1839-1845.
- USHIYAMA, H., WAKABAYASHI, K., HIROSE, M., ITOH, H., SUGIMURA, T. and NAGAO, M. 1991. Presence of carcinogenic heterocyclic amines in urine of healthy volunteers eating normal diet, but not of inpatients receiving parenteral alimentation. *Carcinogenesis*, 12(8):1417-1422.
- WAKABAYASHI, K., NAGAO, M., ESUMI, H., and SUGIMURA, T. 1992. Food-derived mutagens and carcinogens. *Cancer Res*, 52:2092–2098.
- WATANABE-AKANUMA, M., SHIMOI, K., KINAE, N. and OHTA, T. 1997. Food-derived heterocyclic amines potentiate the mutagenicity of a drinking water mutagen 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone (MX). *Mutat Res-Fund Mol M*, 377(2):225-229.
- WILD, D. and KERDAR, R.S. 1998. The inherent genotoxic potency of food mutagens and other heterocyclic and carbocyclic aromatic amines and corresponding azides. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 207:428–433.
- WU, X., KASSIE, F. and MERSCH-SUNDERMANN, V. 2005. Induction of apoptosis in tumor cells by naturally occurring sulfur-containing compounds. *Mutat Res*, 589(2):81-102.
- WURGLER, F.E. and VOGEL, E.W. 1986. In vivo mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster* in Chemical Mutagens, Principles and Methods for their detection. Würzler FE and Vogel EW (editors). Vol. 10. Plenum Press, 1-73. pp., New York.
- VALGIMIGLI, L. and IORI, R. 2009. Antioxidant and pro-oxidant capacities of ITCs. *Environ Mol Mutagen*, 50:222-237.
- VAN SCHAİK, N. and GRAF, U. 1991. Genotoxicity evaluation of five tricyclic antidepressants in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 260: 99-104.
- VITAGLIONE, P, MONTI, S.M, AMBROSINO, P., SKOG, K., FOGLIANO, V. 2002. Carotenoids from tomatoes inhibit heterocyclic amine formation. *Eur Food Res Technol*, 215(2):108–13.

- VOGEL, E.W., GRAF, U., FREI, H.J. and NIVARD, M.M. 1999. The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. *IARC scientific publications*, 146:427-70.
- YANG, H., HOLCROFT, J., GLICKMAN, B.W. and DE BOER, J.G. 2003. Conjugated linoleic acid inhibits mutagenesis by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in the prostate of Big Blue® rats. *Mutagenesis*, 18(2):195-200.
- YOO, MA, RYO, H, TODO, T, and KONDO, S. 1985. Mutagenic potency of heterocyclic amines in the *Drosophila* wing spot test and its correlation to carcinogenic potency. *Jpn J Cancer Res*, 76(6):468-73.
- YUN, C.H., JEONG, H. G., JHOUN, J. W. and GUENGERICH, F.P. 1995. Non-specific inhibition of cytochrome P450 activities by chlorophyllin in human and rat liver microsomes. *Carcinogenesis*, 16(6): 1437-1440.
- ZORDAN, M. OSTI, M. PESCE, M. and COSTA, R. 1994. Chloral hydrate is recombinogenic in the wing spot test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 322: 111-116.

ÖZGEÇMİŞ

Serap KOCAOĞLU CENKÇİ, 1979 yılında Antalya'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Antalya'da tamamladı. 1996 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2000 yılında Biyolog olarak mezun oldu. Ağustos 2002'de Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'na araştırma görevlisi olarak atandı. Eylül 2001 - Haziran 2004 tarihleri arasında aynı Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. 2004 yılında aynı bölümde Doktora eğitimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.