



## Toksik Maddelerin Genotoksik Analiz Yöntemleri

Hazal SEZGİNER<sup>1\*</sup>

Feruzan DANE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Edirne 22030, Türkiye

\*Sorumlu Yazar:

E-posta: hazalsezginer@hotmail.com

Geliş Tarihi: 28 Ocak 2016

Kabul Tarihi: 04 Mart 2016

### Özet

Kimyasal maddelerin yaygın bir biçimde kullanılması çevre kirlenmesine sebep olur. Bu kimyasallar DNA molekülünde mutasyonlara yol açan mutajenlerdir. DNA veya genomun replikasyonunu sağlayan enzimlerle etkileşime girerek mutasyona neden olan kimyasalların DNA'da hasar oluşturması ve mutasyona yol açması genotoksik etki olarak tanımlanır. Genetik toksikoloji çalışmalarında DNA moleküllerinde meydana gelen değişiklikler incelenir ve çeşitli ajanların ortaya çıkardığı genetik hasar değerlendirilir. Genetik toksite; çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen DNA eklentileri, DNA kırıkları, gen mutasyonları, kromozom anormallikleri, klastojenite ve anöploidi gibi hasarları kapsar. DNA hasarında rol alan kilit moleküllerdeki bozukluklar ise doku hasarı, yaşlanma, kanser, infertilite ve bazı genetik hastalıklara yol açmaktadır. Bu nedenle genotoksite çalışmaları canlı hayatı için büyük önem taşır. Genotoksite testleri 1970' ler den beri kullanılmakta olup günümüze kadar mutajenik ve genotoksik maddelerin karsinojenik potansiyellerini ölçmek için birçok yöntem geliştirilmiştir. Her ne kadar genotoksite testleri ile ilgili derleme çalışmaları yapılmışsa da bütün testleri içine alan güncel bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu konuda çalışma yapacak araştırmacılara yol gösterecek detaylı bir derleme çalışmasına ihtiyaç vardır. Bu nedenle bu çalışmada çeşitli kimyasalların genetik materyalde oluşturduğu hasarları saptamak için geliştirilmiş in vivo ve in vitro testler ayrıntılı olarak verilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Toksik maddeler, Toksikite, Genotoksite, In vivo, In vitro testleri

## Genotoxic Analysis Methods of Toxic Substances

### Abstract

The widespread usage of chemicals causes environmental pollution. These chemicals, which cause mutations in the DNA molecule are mutagens. Chemicals which cause mutation by interacting with DNA or genome's replication enzymes lead DNA damage and mutations are defined as genotoxic effect. The changes occurred in the DNA molecule is examined in genetic toxicology studies and genetic damages caused by various agents are evaluated. Genetic toxicity includes damages; such as DNA adducts occurred in the structure of nucleus, chromosomes and DNA, DNA breaks, gene mutations, chromosomal abnormalities, clastogenic and aneuploidy. Defects in the key molecules involved in DNA damage lead tissue damage, aging, cancer, infertility and some genetic disease. Therefore genotoxicity studies are of great importance for life. Genotoxicity tests are being used since in 1970's. Many methods have been developed to measure the mutagenic and carcinogenic potential of genotoxic agents until today. Although review studies were done with genotoxicity tests, actual study including all tests has not been encountered. A detailed review study is needed to guide researchers who wanted to study on this subject. Therefore, in vivo and in vitro tests which were developed to determine damages in genetic material caused by various chemicals were given detailed in this study.

**Keywords:** Toxicity, Toxic substances, Genotoxicity, In vivo, In vitro, Tests

## GİRİŞ

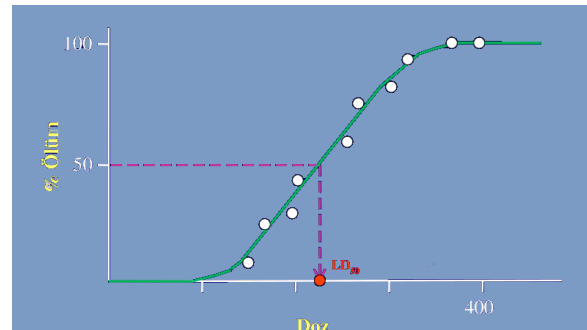
Genotoksitesi araştırılacak bir maddenin fiziksel ve kimyasal özelliklerinin incelenmesi, doğrudan toksisite testi olmadığı halde ön değerlendirme olarak yapılmalıdır. Kimyasal maddenin fiziksel ve kimyasal etkenler karşısındaki dayanıklılıklarının incelenmesi çevredeki stabiliteleri hakkında bilgi verir. Uçuculukları, lipofil özelliklerinin incelenmesi canlı organizmaya giriş yolu ve absorpsiyonları hakkında değerlendirmede yararlı olur [1] Toksikolojinin bir alt dalı olan genetik toksikoloji, organizmanın normal biyolojik işleyişi sırasında veya kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkenlere bağlı olarak hücrelerin DNA moleküllerinde meydana gelen değişiklikleri inceleyen bir bilimdir ve çeşitli ajanların ortaya çıkardığı genetik hasarın değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir [2-4] DNA hasarında rol alan kilit moleküllerde ve yollardaki bozukluklar ise doku hasarı, yaşlanma, kanser, infertilite ve bazı genetik ve multifaktoryal hastalıklara yol açmaktadır [5, 6]

### In vivo Genotoksite Testleri:

Genel olarak genotoksitesi araştırılacak bir kimyasal maddenin etkileri birden fazla türde, in vivo olarak incelenir.

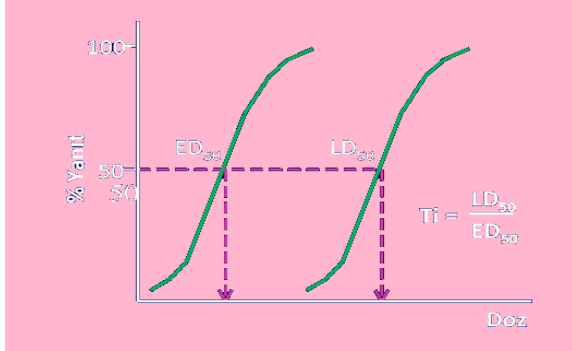
### Akut Genotoksite Analizi:

Deney canlılarında tek dozla alınan cevap (etki) ilişkisi değerlendirilir. Bu amaçla yeni bir kimyasal maddenin, akut toksisitesi öncelikle medyan letal doz (LT<sub>50</sub> veya LC<sub>50</sub>) tayini ile yapılır [1, 7]



Şekil 1: Medyan letal doz-LD<sub>50</sub>[8].

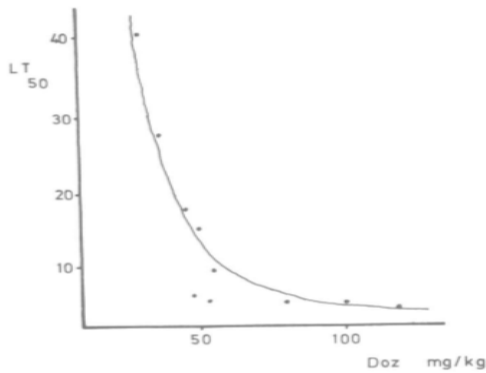
LD<sub>50</sub> (medyan letal doz): “deney canlılarına belirli koşullarda ve doğrudan uygulanan toksik maddenin, bu canlı popülasyonunun %50’sini öldüren dozu” olarak tanımlanır. Terapotik indeks (Tedavi indeksi-TI); genel olarak bir ilacın toksik dozu (LD<sub>50</sub>) ile tedavi dozunu (ED<sub>50</sub>) karşılaştırmak için kullanılır. TI ne kadar büyükse o ilaç o kadar güvenilir olarak kabul edilir [7-1].



Şekil 2. Zararsızlık sınırlarını belirleme [8].

#### Kronik Genotoksisite Analizi:

Kimyasal maddelerin kümülatif (birikme) etkilerini araştırmak amacı ile yapılır. Ayrıca maddenin karsinojenik potansiyeli olup olmadığı araştırılır. 3 aydan fazla süreli olarak uygulanır. Uygulama süresi, insanların incelenen maddeye maruz kalma süresi göz önüne alınarak seçilir. Letal süre (LT<sub>50</sub>): “Bir kimyasal maddenin belirli bir dozunun deney canlılarının yarısını öldürmesi için geçen süre” olarak tanımlanır. LT<sub>50</sub>'nin doza göre değişimi, kronik toksisitenin kantitatif değerlendirilmesinde kullanılabilir.



Şekil 3. Ortalama ölüm zamanı ile doz arasındaki ilişki [9].

#### İn vitro Genotoksisite Testleri:

In vitro testler izole hücre sistemlerinde uygulanan testlerdir. Bir kısmı kısa süreli testler olup, in vivo veya in vivo ve in vitro sistemlerde kombine olarak yürütülür. Genel olarak bu testler kimyasal maddelerin genom veya hücre transformasyonu üstündeki etkisini ölçer. Böylece bu etkilerle kimyasal karsinogenezis arasındaki ilişkiyi göstermede yardımcı olurlar. Mutajenezis ile kimyasal karsinogenezis arasındaki ilişkinin gözlenmesini sağlar [10].

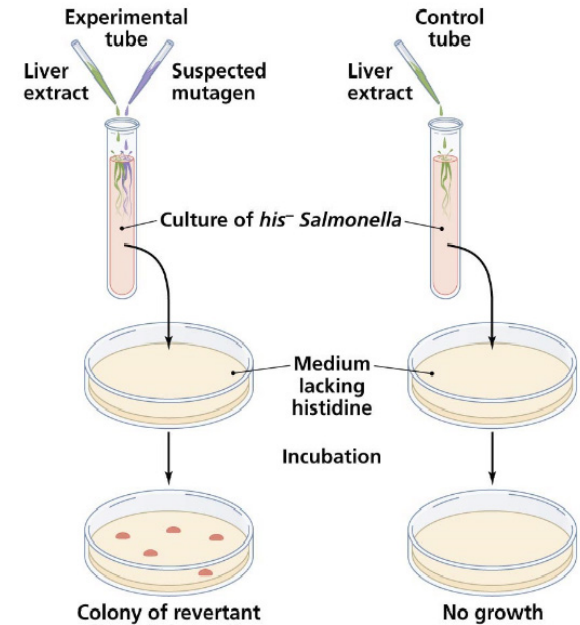
Kimyasal maddelerin yaygın bir biçimde kullanılması sonucunda bu maddeler ya direkt veya metabolik ürünler nedeniyle etki ederler. Bu etkiler insan ve hayvanlarda zehirlenmelere sebep olurlar. Yaban hayatı ve yararlı canlı gruplarının ölmesiyle doğal denge bozulur. Hava, su, toprak ve gıda maddelerindeki ilaç kalıntıları, bazı canlıların

zararlı hale gelmesi ve bu zararlıların bağışıklık kazanması ile çevre kirlenmesi adı altında birçok olumsuz etkiler ortaya çıkar [11].

#### Salmonella / Mikrozoom Mutajenite (AMES) Testi:

Canlıların, tümör oluşumunda somatik hücrelerin tümör baskılayıcı genlerinde meydana gelen nokta mutasyonların saptanmasında ve kimyasalların DNA ile etkileşimlerini önleyerek mutajenik ve karsinojenik etkilerini ortadan kaldıran antimutajenik ve antikarsinojenik maddelerin tespitinde sıklıkla kullanılmaktadır [12, 13].

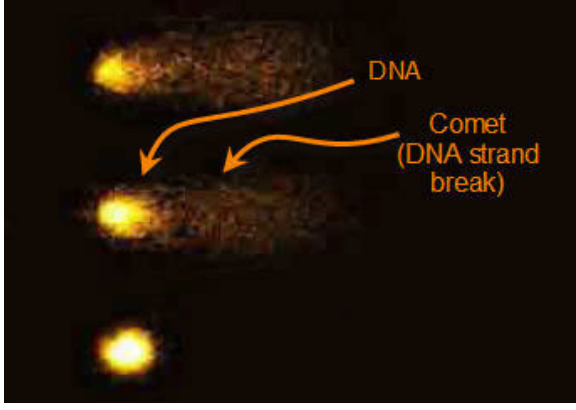
Salmonella typhimurium'un yapay mutasyonla oluşturulmuş olan histidin sentezleme yeteneklerini kaybetmiş suşlarının, test bileşeni ile muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyon geçirip histidini sentezleyebilen ve histidinden bağımsız ortamda çoğalması esasına dayanır. Histidinsiz ortamda üreyebilmelerine yol açan kendiliğinden geri mutasyona uğrayan koloniler sayılarak mutajenite belirlenmektedir. Ortamda pozitif mutajen bir kimyasal madde varsa, geri mutasyonla çoğalan bakteri koloni sayısı istatistiksel olarak anlamlı artmaktadır [14].



Şekil 4. Ames testi [15].

#### Comet Testi:

DNA kırıklarının tayini prensibine dayanan bu yöntem, pek çok fiziksel ve kimyasal mutajenin özellikle insanlarda yol açtığı DNA hasarının tayininde, kanser hastalarında DNA hasarının derecesini ve tamerini tespit etmede, bazı kalıtsal hastalıkların prenatal tanısında, bazı hastalıklarda artmış DNA hasarını belirlemede kullanılan bir biyoizlem testidir. Son yıllarda gelişen Comet tekniği, çeşitli ajanların yol açtığı DNA tek ve çift zincir kırıklarının tespiti için kullanılan hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir [16, 17].

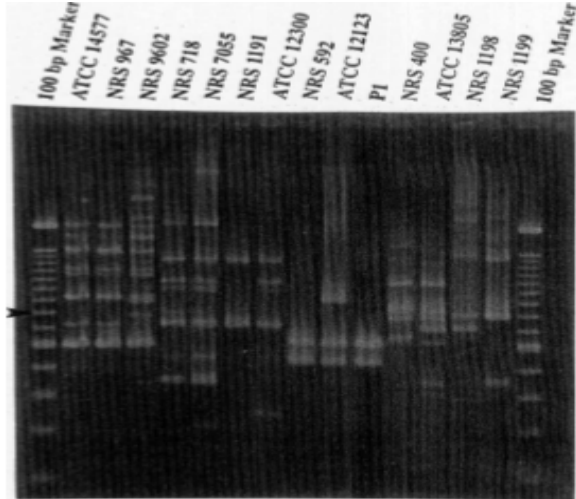


Şekil 5. Hasarlı ve normal DNA-Comet testi [18].

#### RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) Testi:

RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA, Randomly Amplified Polymorphic DNAs) ilk defa 1990' da rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve Polimeraz Zincir Reksiyonu' nu (PCR) temel alan bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. Tekniğin en büyük avantajları genom dizisi hakkında ön bilgiye, yüksek saflıktaki DNA'dan çok miktarlara, Southern blot veya radyoaktif kimyasallara ihtiyaç duymamasıdır. Ayrıca hızlı ve düşük maliyetlidir. RAPD tekniği pek çok alanda olduğu gibi değişik bitki türlerinin genetik değişkenliğinin belirlenmesinde yaygın bir şekilde başarıyla uygulanmaktadır [19].

1991 tarihinde ise bu metotla aynı temele dayanan fakat farklı olarak 10 nükleotitten daha kısa primerlerle daha kompleks DNA parmakizi profili elde edilen DAF (DNA Amplification Fingerprinting) olarak isimlendirilen diğer benzer bir metot yayınlanmıştır [20].



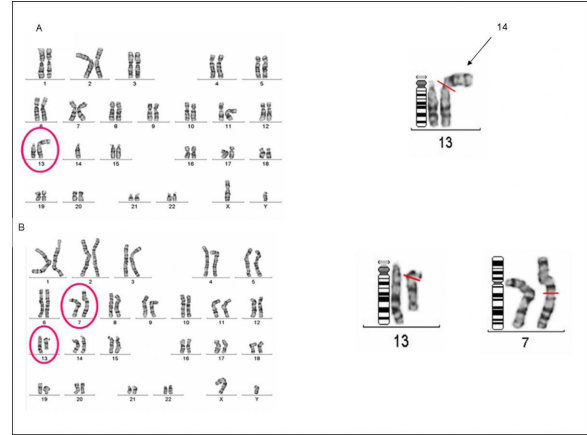
Şekil 6. RAPD Testi-Analiz sonucu oluşan bant desenleri [21].

#### Kromozom Anormallikleri (KA) Testi:

Kromozom kırıkları DNA'daki onarılmamış çift zincir kırıklarından, yeni yapıya sahip kromozomlar ise DNA'daki zincir kırıklarının yanlış onarılmasından kaynaklanmaktadır. Genetik materyalde oluşan bu tip hasarlar tamir edilemediğinde ortaya çıkan yüksek KA frekansı ise, artmış kanser riskini göstermektedir [22-25].

KA testi, mutajenler tarafından indüklenen çeşitli yapısal ve sayısal kromozomal anormalliklerin saptanması amacıyla sıklıkla kullanılan standart bir yöntemdir. Özellikle mutajenik hasarın belirlenmesinde türe ve dokuya göre

değişebilen metabolizma, farmakokinetik ve DNA onarım mekanizmaları gibi faktörlerin değerlendirilmesine de olanak sağlamaktadır [26, 28].

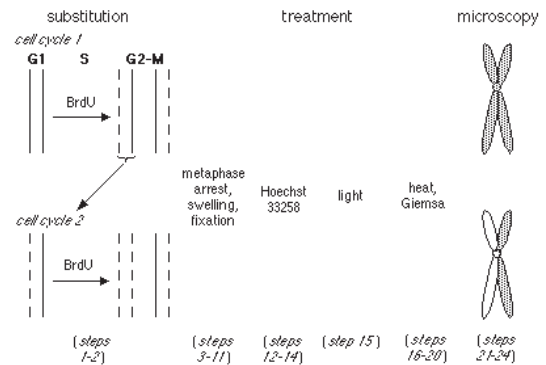


Şekil 7. KA Testi- Preimplantasyon Genetik Tanı [29].

#### Kardeş Kromatit Değişim (KKD) Testi:

Çeşitli ajanların özellikle kromozomlarda oluşan yapısal değişimlerin araştırılmasında kullanılır. Mutajen ve karsinojenik olduğu bilinen maddelere maruz kalan hücrelerde ve kromozom kırılabilirliği ve yatkınlığı ile karakterize edilen çeşitli kalıtsal hastalıklarda kardeş kromatit değişim frekansının arttığı ve artmış kardeş kromatit frekansı ile tümör oluşumu arasında bir ilişkinin olduğu saptanmıştır [30, 31]. Kardeş kromatit değişimleri nokta mutasyonların indüksiyonu, gen amplifikasyonu ile yakından ilişkilidir ve DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon yoluyla onarılmasını göstermektedir [32, 33].

Testte, DNA kırıklarını görünür hale getirmek için hücre kültürlerine DNA'da timin analogu gibi davranan Bromodeoksiüridin (BrdU) maddesinin eklenmektedir. Bu maddenin hücre döngüsü sırasında kardeş kromatitlerin arasına girmesi sağlanarak homolog kromozomlardaki DNA parçalarının karşılıklı değişimi gösterilmektedir. Kromatitlerin farklı boyanmasına neden olan bu boyanma farkı ile DNA'da kardeş kromatitler arasında oluşan değişimler gözlemlenmektedir [34, 35].



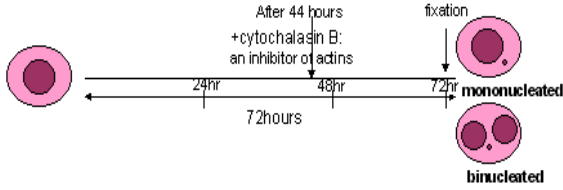
Şekil 8. KKD Testi-BrdU ile kardeş kromatit değişiminin belirlenmesi [36].

#### Mikronukleus (MN) Testi:

Mitoz bölünme ile oluşan tüm hücre tipleri üzerinde uygulanabilmesi nedeniyle genetik toksikoloji araştırmalarında kullanılan yaygın bir test haline gelmiştir [37, 38]. Çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanlara maruz kalan

insanlarda, kanser ve genomik düzensizlik ile karakterize edilen çeşitli hastalıklarda MN frekansının önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur [39].

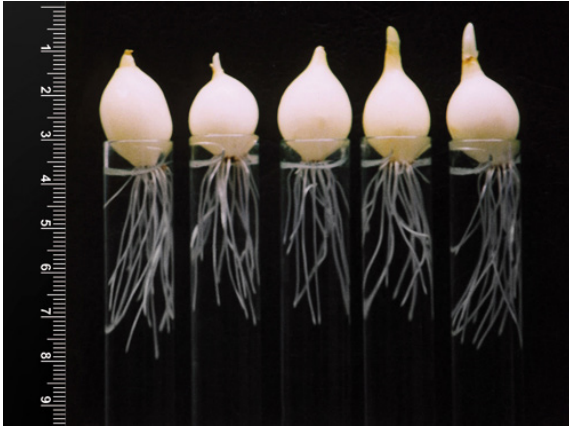
Uygun ortamlarda inkübasyona bırakılan hücre kültürlerine, ilk mitoz bölünmeden önce kültürün yaklaşık 44. saatinde sitokalasin-B maddesi ilave edilmektedir. Bu madde sitokinezi inhibe etmekte ve bir hücre siklusunu tamamlayan binükleat (çift nükleuslu) hücrelerin oluşumunu sağlamaktadır [40]. İnkübasyon süresi sonunda kültürler protokollere uygun şekilde preperasyonu yapılır ve preparatlarda mikronükleus bulunduran binükleat hücrelerin oranı tespit edilmektedir [41].



Şekil 9. MN testi [42].

#### ALLIUM Testi:

Kimyasalların canlılar üzerinde neden olduğu genetik hasarların tespitinde bitki biyotestleri yüksek duyarlılıkları sebebiyle uzun bir süredir kullanılmaktadırlar [43, 44]. Özellikle kolay elde edilmesi, uygulamanın basitliği sebebiyle *Allium* testi araştırmacılar tarafından sıklıkla tercih edilmektedir [45]. *Allium* testi tüm mitotik evrelerdeki anormalliklerin belirlenmesini sağlamaktadır ve memeli test sistemleriyle iyi korelasyon göstermektedir [43-46].



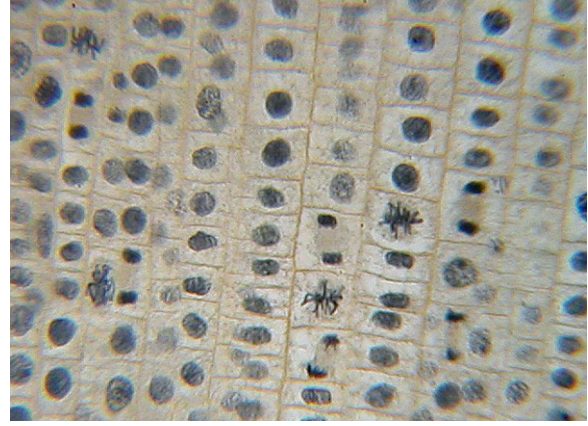
Şekil 10. *Allium* kromozom aberasyon testi [47].

#### Mitotik Aktivite (İndeks) Hesaplama Yöntemi:

Meristematik hücrelerdeki mitoz bölünme safhalarının gözlenmesi ile mitotik aktivite (indeks) hesaplanabilmektedir. Mitotik aktivite, bölünen hücrelerin bölünmeyen meristematik hücrelere göre oranıdır. Genellikle kromozom sayımı çalışmalarında ve toksikolojik çalışmalarda kullanılmaktadır. Eğer, bir kimyasal madde ile uygulama varsa, maddenin bölünme oranı üzerinde ne şekilde etkili olduğu konusunda bilgi vermektedir. Mitotik indeks dışında ayrıca, M/T+A oranı da hesaplanmaktadır. Bu katsayının yüksek değerde olması (yani 1' den büyük olması) ve anafaz + telofaz frekansının azalması, karyokinetik iş ipliklerinin inaktive olduğunu göstermektedir.

$$\text{Mitotik indeks (\%)} = \frac{\text{Bölünen Hücre Sayısı}}{\text{Toplam Hücre Sayısı}} \times 100$$

Şekil 11. Mitotik Aktivite (İndeks) Testi [48].



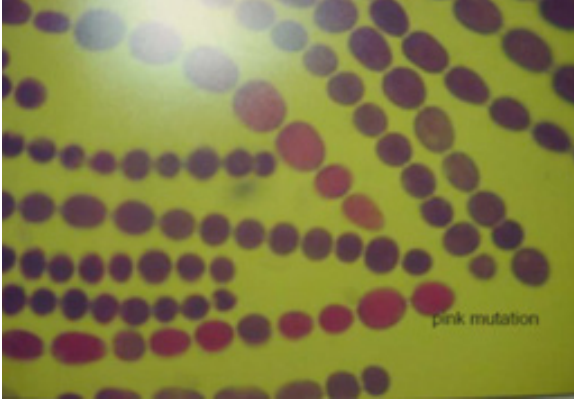
Şekil 12. Mitoz Bölünme [49].

#### Stamen Tüy Analizi:

Kimyasalların genotoksitesini test etmede kullanılan, bitkilerde özel lokus mutasyon analizleri bulunmaktadır. Bunlar bir ya da iki lokusta heterozigot olan özel oluşturulmuş test strainleri veya klonlar üzerine temellenir. Bu durum, test bileşiklerinin uygulanmasından kısa bir süre sonra somatik mutasyonların ortaya çıkmasına neden olur. Somatik mutasyonlar; yapraklar (soya fasulyesi, tütün, yonca, mısır), çiçek petalleri, stamen tüyleri (*Tradescantia pallida* H) üzerindeki farklı renklerdeki doku bölgeleri olarak ifade edilir [50]. Stamen tüyü analizinde 'somatik resesif mutasyonların' varlığı, pembe renkli mitotik hücrelerin oluşumu ile ortaya çıkmaktadır [51].



Şekil 13. *Tradescantia pallida* H bitkisi [52].



Şekil 14. *Tridascantia pallida* H-stamen tüyü hücrelerinde mutasyon [51].

## SONUÇ

Teknoloji geliştikçe kullanılan birçok kimyasal madde, tarımda ve endüstriyel alanlarda sıkça kullanılmaktadır. Bu kimyasal maddeler ister istemez yaşıntının vazgeçilmez parçası olmuştur. Ve zaman zaman canlı hayatını tehlikeye sokmaktadır. Çevreye ve canlı hayatına giren bu maddeler mutajenik ve karsinojenik etki gösterebilmektedirler. Bu maddeler kullanıma sunulmadan önce ya da piyasaya sürülmeden önce tehlikelilik sınırlarının belirlenmesi gerekmektedir. Ayrıca çevreye verilen atıklarında genotoksisitesilerinin bilinmesi gereklidir. Diğer taraftan maddelerin genotoksisitesilerinin araştırılması risk değerlerinin belirlenmesi, bu maddelerin fayda-zarar ilişkilerini ortaya çıkarmak ve güvenli kullanma koşullarını belirlemek amacıyla taşıyabilmelidir. Bunun için gerekli olan analiz yöntemi etkili sonuçlar verebilmesi için doğru bir şekilde seçilmelidir.

## KAYNAKLAR

- [1] Hayes, A.W., Principles and methods of toxicology, 2nd, ed., Raven press, 1185 Avenue of the Americans, 1989, New York.
- [2] Choy, W.N., "Genetic toxicology and cancer risk assessment", Marcel Dekker, 2001, New York.
- [3] Young, R.R., "Genetic toxicology", Toxicology, 2002.
- [4] Mortelmans, K., Rupa, S.D., "Current issues in genetic toxicology testing for microbiologists", Adv Appl Microbiol, 2004.
- [5] Kirsch-Volders, Elhajouji, A., Cundari, E., Van Hummelen, P., "The in vitro micronucleus test: A multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and nondisjunction", Mutat Res, 1997.
- [6] Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., M, Kirsch-Volder, "Chromosomal changes: induction, detection, methods, and applicability in human biomonitoring", Biochimie, 2006.
- [7] Hodgson, E., Guthrie, F.E., Introduction to biochemical toxicology, Blackwell Scientific Publications, 1984, Oxford.
- [8] [http://www.tfd.org.tr/eski/KTCG\\_Kurs\\_042010/01\\_HO.pdf](http://www.tfd.org.tr/eski/KTCG_Kurs_042010/01_HO.pdf) (18.04.2015-18.23).
- [9] Vural, N., Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:33, 2005, Ankara.
- [10] Blank, T.L., Flaherty, D.K., Ribelin, W.E., Wilson, A.G.E., Toxicity testing new approaches and applications in

human risk assessment, Raven press, 1140 Avenue of the Americans, 1985, New York.

- [11] Bora, T. ve Delen, N., "Türkiye'de Bitkisel Üretimde Tarımsal İlaç Sorunu ve Öneriler", II. Türkiye İktisat Kongresi Tarım Komisyonu Tebliğleri, 1981, İzmir.
- [12] McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B.N., "Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals", Proc Nat Acad Sci, 1975.
- [13] Mortelmans, K., Zeiger, E., "The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay", Mutat Res, 2000.
- [14] Maron, D.R., Ames, B.N., "Revised methods for the Salmonella mutagenicity test", Mutat Res, 1983.
- [15] <http://thebiology.org/concepts/ames-test-mutagenicity/> (01.05.2015-19.32).
- [16] Östling, O., Johanson, K.J., "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells", Biochem Biophys Res Commun, 1984.
- [17] Şekeroğlu, Z.A., Şekeroğlu, V., Kolören, Z., "The in vitro alkaline comet assay in genetic toxicology", 2011.
- [18] <http://www.bbemg.be/en/elf-emf-and-health/study-methods/info-invitro-studies.html> (07.05.2015-18.02).
- [19] Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., "DNA Polymorphism Amplified By Arbitrary Primers Are Useful As Genetic Markers", Nucleic Acids Research, 1990.
- [20] Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J., Gresshoff, P.M., "High Resolution DNA Amplification Fingerprinting using Very Short Arbitrary Oligonucleotide Primers", Biotechnology, 1991.
- [21] <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-45-2-212?crawler=true&mime-type=application/pdf> (15.10.2015-14.02).
- [22] Anderson, D., "Human Biomonitoring", Mutat Res, 1988.
- [23] Carrano, A.V., Natarajan, A.T., "Consideration for population monitoring using cytogenetic techniques", Mutat Res, 1988.
- [24] Savage, J.R.K., "Update on target theory as applied to chromosomal aberrations", Env Mol Mutagen, 1993.
- [25] Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I.L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, A., Cebulka-Wasilewska, Fabianova, E., Sram, R.J., Kunudsen, L.E., Barale, R., Fucic, A., "Chromosomal aberrations and SCE as biomarkers of cancer risk", Mutat Res, 2006.
- [26] Preston, R.J., Au, W., Bender, M.A., Brewen, J.G., Carrano, A.V., Heddle, J.A., McFee, A.F., Wolff, S., Wassom, J.S., "Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays: A report of the U.S. EPA's Gene-Tox Program", Mutat Res, 1981.
- [27] Evans, H.J., "Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests", In: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., eds., Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Science, Amsterdam, 1984.
- [28] Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F., Shelby, M., "Mammalian in vivo cytogenetic assays: Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells", Mutat Res, 1987.
- [29] <http://www.tupbebek-genetik.com/genetik/pre-implantasyon-genetik-tani> (16.05.2015-17.22).
- [30] Sonoda, E., Sasaki, M.S., Morrison, C., Y. Yamaguchi-Iwai, Takata, M., Takeda, S., "Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate

cells”, Mol Cell Biol, 1999.

[31] Cheng, M., Conner, M.K., Alaria, Y., “Potency of some carbamates as multiple tissue sister chromatid exchanges in bloom’s syndrome lymphocytes”, Cancer Res, 1981.

[32] Latt, S.A., Sehrek, R.R., Loveday, K.S., Dougherty, C.P., Schuler, C.F., “Sister chromatid exchange”, Adv Hum Genet, 1980.

[33] Wilson, D.M., Thompson, L.H., “Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange”, Mutat Res, 2007.

[34] Topaktaş, M., Speit, G., “Induction of SCE and CA in human lymphocytes with prometryn”, Tr J Biol, 1990.

[35] Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E., “Sitogenetik”, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 2010.

[36] <http://www.geguchadze.com/PDF/protocols/CPonline/Doc/9099-9099.html> (15.10.2015-14.32).

[37] Kirsch-Volders, Elhajouji, A., Cundari, E., Van Hummelen, P., “The in vitro micronucleus test: A multiend-point assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and nondisjunction”, Mutat Res, 1997.

[38] Stoper, H., Müller, O.S., “Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview”, Toxicology in Vitro, 1997.

[39] Demirel, S., Zamani, A., “Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları”, Genel Tıp Dergisi, 2002.

[40] Krishna, G., Hayashi, M., “In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation”, Mutat Res, 2000.

[41] Fenech, M., Morley, A.A., “Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and dose X-irradiation”, Mutat Res, 1986.

[42] [http://www.crios.be/genotoxicitytests/micronucleus\\_test.htm](http://www.crios.be/genotoxicitytests/micronucleus_test.htm) (15.10.2015-15.03).

[43] Rank, J., Nielsen, M. H., *Allium* cepa anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate, Mutat. Res., 1997.

[44] Pereira, F. C., Lima, A. P., Ribeiro, A. S. B. B., Silva, H. D., Silveira-Lacerda, E. P., Pavanin, L. A., Cytotoxic and genotoxic effects of cis-Tetraammine (oxalato) Ruthenium(III) Dithionate on the root meristem cells of *Allium* cepa, Biol. Trace Elem. Res., 2009, 128, 258–268.

[45] Fındıklı, Z., Türkoğlu, Ş., Glyphos ve DDVP’ nin *Allium* cepa L.’ da mitoz bölünme ve kromozomlar üzerine etkisi, C.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi, 2010.

[46] Yıldız, M., Ciğerci, İ.H., Konuk, M., Fidan, A. F., Terzi, H., Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium* cepa root cells by chromosome aberration and comet assays. Chemosphere, 2009, 75, 934–938.

[47] <http://www.mik-ce.si/okna/energijska-okna/> (18.05.2015-18.22).

[48] [http://maycalistaylari.comu.edu.tr/maycalistaylari/phocadownload/userupload/lise2/Danisman/cuneytaki\\_sunum2.pdf](http://maycalistaylari.comu.edu.tr/maycalistaylari/phocadownload/userupload/lise2/Danisman/cuneytaki_sunum2.pdf) (19.05.2015-14.27).

[49] <https://bowange.wordpress.com/2013/11/08/lab-mitosis-of-onion-cells/> (15.10.2015-13.05).

[50] Akı, C., Karabay, Ü., Genetik Laboratuvarı Uygulama Kitabı. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Yayınları, 2004, Çanakkale.

[51] İlhan, D., Akı, C. Mutagenicity of Sunset Yellow and Brilliant Black in *Vicia faba* L. and *Allium* cepa L. Fresenius Environmental Bulletin, 2009.

[52] <http://bomets.com/?p=572> (15. 10. 2015-16.49).