



GİRESUN
ÜNİVERSİTESİ



FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ALLIUM CEPA* L. (AMARYLLIDACEAE)'DA POTASYUM
BROMAT'IN POTANSİYEL TOKSİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi
Gökçe YILDIRIM
172102023**

2020

GİRESUN

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ALLIUM CEPA* L. (AMARYLLIDACEAE)’DA
POTASYUM BROMAT’IN POTANSİYEL TOKSİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Öğrencinin Adı SOYADI : Gökçe YILDIRIM
ORCID : 0000-0003-0510-1604
Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : .../08/2020

Enstitü Anabilim Dalı : Biyoloji

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Kültiğın ÇAVUŞOĞLU
ORCID : 0000-0002-4767-9137

Temmuz 2020
GİRESUN

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**INVESTIGATION OF THE POTENTIAL TOXIC
EFFECTS OF POTASSIUM BROMATE IN *ALLIUM
CEPA* L. (AMARYLLIDACEAE)**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gökçe YILDIRIM

Enstitü Anabilim Dalı

:

Biyoloji

Bu tez 24/07/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

**Prof. Dr.
Emine YALÇIN
Jüri Başkanı**

**Prof. Dr.
Kültiğın ÇAVUŞOĞLU
Üye**

**Dr. Öğretim Üyesi
Dilek ÇAVUŞOĞLU
Üye**

**Doç. Dr.
Bahadır KOZ
Enstitü Müdürü**

BEYAN

Tez içindeki tüm verilerin akademik kurallar çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun şekilde sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

Gökçe YILDIRIM

24/07/2020

TEŞEKKÜR

Tez konusunun önerilmesinden, planlanması, yürütülmesi ve yazım aşamalarının her safhasında aktif katkılarını esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Kültiğın ÇAVUŞOĞLU ve Genetik ve Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Emine YALÇIN’a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca tez çalışmam sırasında maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen eşim ve aileme de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
TABLolar LİSTESİ	VI
ÖZET	VII
SUMMARY	VIII
BÖLÜM 1. GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Gıda Katkı Maddeleri	3
2.2. Potasyum Bromat (KBrO ₃)	3
BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	6
3.1. Deney Materyalleri ve Grupları.....	6
3.2. Fizyolojik Parametre Ölçümleri.....	6
3.2.1. MI Yüzdesi, Kromozomal Hasar ve MN Sayılarının Belirlenmesi.....	6
3.4. Anatomik İncelemeler.....	7
3.5. Biyokimyasal Ölçümler.....	7
3.5.1. Lipid peroksidasyonu.....	7
3.5.2. Enzim tayini.....	7
3.5.2.1. SOD aktivite tayini.....	8
3.5.2.2. KAT aktivite tayini.....	8
3.6. İstatistiksel Analiz.....	8

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	9
BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	17
KAYNAKLAR	18
ÖZGEÇMİŞ	22



SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

KBrO ₃	: Potasyum bromat
KAT	: Katalaz
MDA	: Malondialdehit
MI	: Mitotik indeks
MN	: Mikronukleus
SOD	: Süperoksit dismutaz
WHO	: Dünya sağlık örgütü

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1. KBrO ₃ tarafından teşvik edilen kromozomal hasarlar	12
Şekil 4.2. KBrO ₃ 'ün MDA düzeleri ile SOD ve KAT enzim aktivitelerine etkisi...	14
Şekil 4.3. KBrO ₃ tarafından teşvik edilen anatomik değişimler.....	16



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. KBrO_3 'ün kimyasal özellikleri.....	4
Tablo 4.1. <i>Allium cepa</i> 'da KBrO_3 'ün seçilen Fizyolojik parametrelere etkisi.....	10
Tablo 4.2. KBrO_3 tarafından teşvik edilen sitogenetik hasarlar.....	12

***ALLIUM CEPA* L. (AMARYLLIDACEAE)'DA POTASYUM BROMAT'IN POTANSİYEL TOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Çeşitli endüstrilerde farklı amaçlarla kullanılan katkı maddeleri pek çok sağlık ve çevre sorunlarını da beraberinde getirmektedir. Bu sorunların çözümü oldukça zaman alıcı ve maliyetlidir. Bununla birlikte ikincil sorunları da beraberinde getirmektedir. Bu nedenle katkı maddelerini kullanmadan önce yapılacak toksisite testleri ön plana çıkmakta ve bu testlerle oluşabilecek sorunlar ön görülebilmektedir. Bu noktadan hareketle, bu çalışmada gıda sektöründe özellikle ekmek üretiminde kullanılan ve insanlara beslenme yoluyla kontamine olan Potasyum bromat'ın (KBrO_3) toksik etkileri *Allium cepa* L. model sistemi üzerine test edilmiştir. Doza bağlı toksik etkiyi araştırabilmek için 25, 50 ve 100 mg/L dozlarında KBrO_3 kullanılmıştır. Toksik etki fizyolojik, sitogenetik, biyokimyasal ve anatomik parametreler kullanılarak değerlendirilmiş ve doza bağlı olarak ciddi hasarlar tespit edilmiştir. Sitogenetik parametre olarak test edilen mikronukleus (MN) ve kromozomal anormallik sıklığının 100 mg/L KBrO_3 uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu grupta mitotik indeks (MI) yüzdesinin oldukça azaldığı da tespit edilmiştir. KBrO_3 uygulama gruplarında fragment ve yapışkan kromozom oluşumları en sık rastlanan kromozomal anormallik türleridir. Lipid peroksidasyonu göstergesi olan malondialdehit (MDA) düzeylerinin KBrO_3 uygulama dozu arttıkça arttığı ve 10 $\mu\text{mol/g}$ FW oranı ile maksimum düzeye ulaştığı tespit edilmiştir. KBrO_3 tarafından indüklenen lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan enzimlerden katalaz (KAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitelerinin de değiştiği saptanmıştır. Fizyolojik, sitogenetik ve biyokimyasal değişimlerle birlikte *A. cepa* kök hücrelerinde anatomik değişimlerde saptanmıştır. KBrO_3 uygulamasına karşı özellikle nekroz, hücre deformasyonu, yassılaşmış hücre çekirdeği, korteks hücrelerinde madde birikimi ve hücre duvarı kalınlaşması gibi anatomik değişimler saptanmıştır ve bu değişimlerin 100 mg/L KBrO_3 dozunda maksimum düzeye ulaştığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak, KBrO_3 uygulamasının ökaryotik model bir canlı olan *A. cepa* hücrelerinde çeşitli toksik etkilere ve anatomik değişimlere neden olduğu ve bu etkilerin doza bağımlı olarak değiştiği tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Allium cepa*, antioksidan enzim, kromozomal anormallik, malondialdehit, mikronukleus, potasyum bromat

INVESTIGATION OF THE POTENTIAL TOXIC EFFECTS OF POTASSIUM BROMATE IN *ALLIUM CEPA* L. (AMARYLLIDACEAE)

SUMMARY

Additives used in various industries for different purposes bring many health and environmental problems. The solution of these problems is very time-consuming and costly. However brings with secondary problems. Therefore, the application of toxicity tests before using the additives and chemicals come to the fore and the problems that may arise can be predicted with these tests. In this study, the toxic effects of Potassium bromate (KBrO_3) which is used in food sector especially in bread production and contaminated to humans by nutrition were tested on *Allium cepa* L. model system. KBrO_3 was investigated at doses of 25, 50 and 100 mg/L in order to investigate the toxic effect and dose relationship. The toxic effect was evaluated using physiological, cytogenetic, biochemical and anatomical parameters and serious damages were determined depending on the dose. The frequency of micronucleus (MN) and chromosomal abnormalities tested as cytogenetic parameters was found to be significantly higher in 100 mg/L KBrO_3 treated group compared to the control group. In addition, mitotic index (MI) percentage was significantly decreased in this group. Fragment and sticky chromosome formation are the most common types of chromosomal abnormalities in KBrO_3 application groups. It was found that malondialdehyde (MDA) level, which is an indicator of lipid peroxidation, increased with increasing KBrO_3 application dose and reached maximum level with a rate of 10 $\mu\text{mol/g}$ FW. Catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities as antioxidant enzymes were also found to be altered against KBrO_3 -induced lipid peroxidation. Physiological, cytogenetic and biochemical changes as well as anatomical changes in *A. cepa* root tissue were detected. Anatomical changes such as necrosis, cell deformation, flattened cell nucleus, substance accumulation and cell wall thickening in cortex cells were determined against KBrO_3 application, and it was found that these changes reached maximum levels at 100 mg/L KBrO_3 dose. As a result, it has been found that KBrO_3 application causes various toxic effects and anatomical changes in *A. cepa* cells which is a eukaryotic model organism and these effects are dose dependent.

Keywords: *Allium cepa*, antioxidant enzyme, chromosome abnormality, malondialdehyde, micronucleus, potassium bromate

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Dünya nüfusundaki artış, teknolojiadaki son gelişmeler ve endüstrilerdeki hızlanma sonucu çevre hızla kirlenmekte ve bu ortamda yaşayan organizmalar pek çok kirlenmeye maruz kalmaktadır. Çevre kirliliğine neden olan kimyasalın türü ve yapısı ne olursa olsun organizmalarda toksik etkilere neden olabilmektedir. Kirlenmeler besin zinciri yolu ile kontaminasyon bölgesinden çok uzaklara taşınabilmekte ve hatta akümülyasyon sonucu nesilde nesile de aktarılabilmektedir. Bu denli tehlikeli sonuçlar oluşturan kimyasallar kullanılmadan önce mutlaka toksisite testleri ile araştırılmalıdır. Toksisite testleri kimyasalların sadece organizmalar üzerindeki etkilerini belirlemek için değil, aynı zamanda toksik etki-doza ilişkisini, toksik etkinin gözlenmediği doz aralıklarını ve uzun süreli toksik etkiyi belirlemek için de kullanılmaktadır. Toksik etkiyi asıl belirleyen dozdur. Ayrıca ilaçların da tedavi edici yâda zehirleyici etkilerini belirleyen yine dozdur. Bu nedenle toksisite çalışmalarının doza bağlı olarak gerçekleştirilmesi büyük önem arz etmektedir [1].

Günümüzde pek çok sektörde katkı maddeleri kullanılmaktadır. Gıda sektöründe kullanılan katkı maddeleri doğrudan beslenme yoluyla kontaminasyona neden olduğundan büyük önem arz etmektedir. Tek başına gıda olarak tüketilemeyen, hammadde yâda yardımcı bileşen olarak sınıflandırılmayan gıdaya dayanıklılık, renk, tat ve koku gibi nitelik kazandıran bileşenler katkı maddeleri olarak adlandırılmaktadır. Ticari olarak satılan pek çok gıdada katkı maddelerinin kullanılması kaçınılmazdır. Et ve et ürünlerinde mikrobiyolojik bozulmanın önlenmesinde nitrat ve nitritin kullanımı, yağ içeren gıdalarda oksitlenmeyi önlemek için antioksidanların kullanımı bu zorunlu katkı maddesi kullanımı örneklerindendir [2]. Bozulmuş gıda tüketerek sağlık problemlerine yol açmamak için kullanılan gıda katkı maddelerinin dozu da oldukça önemlidir. Katkı maddeleri; besin yoluyla tüketildiğinde canlılarda birikime, özellikle karaciğerde ekstra yüke ve çeşitli

hastalıklara neden olabilmektedir. Örneğin; yüksek miktarda nitrit maruziyetin toksik etki oluşturduğu, kandaki hemoglobinin ile birleşerek met-hemoglobin oluşturduğu rapor edilmektedir [3]. Katı ve sıvı yağların bozulmasını engellemek amacıyla da kullanılan, kömür katranı ve petrolden elde edilen antioksidan özellikteki BHA ve BHT katkı maddeleri Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından potansiyel kanserojenler olarak belirlemiştir [4]. Bu bakımdan her katkı maddesinin bir toksik etkisi ve canlılarda doza bağlı oluşturduğu bir cevap vardır. Bu nedenle kullanılan tüm katkı maddelerin doza bağlı toksisite testleri ile incelenmesi hayati önemdedir [5].



BÖLÜM 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Gıda Katkı Maddeleri

Gıda katkı maddeleri, gıdalara özellikle dayanıklılık başta olmak üzere renk, kıvam ve tat vermek amacıyla kullanılmaktadır. Gıdanın üretimi, hazırlanması ve ambalajlanması gibi çeşitli aşamalarda gıdaya eklenmektedir. Gıda katkı maddeleri yapılarına göre doğal, yapay ve doğala özdeş katkı maddeleri olmak üzere farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır. Diğer bir sınıflandırma ise kullanım amaçlarına göre yapılmaktadır. Buna göre raf ömrünü uzatan antioksidanlar, duyu kaliteyi etkileyen emülgatörler, işlem yardımcı maddesi olarak kullanılan enzimler, besleyici değeri düzenleyen yapay tatlandırıcılar bu gruplardandır. Gıda sektöründe ürün çeşitliliğinin çok olması, kullanılan katkı maddelerinin türlerini de arttırmaktadır. Gıda katkı maddelerinin en sık kullanım amacı raf ömrünü uzatmak, lezzeti arttırmak ve renk sağlamaktır. Bunun dışında ürünlerde görselliği arttırıcı ve şekil kararlılığını sağlayıcı katkı maddeleri de sıkça tercih edilmektedir. Fırıncılık sektöründe ekmeğin büyük hacimli olmasını ve bu hacimde kalmasını sağlamak için kullanılan Potasyum bromat ($KBrO_3$)'da sık kullanılan gıda katkı maddelerinden biridir [5-7].

2.2. Potasyum Bromat ($KBrO_3$)

$KBrO_3$, suda çözünebilen beyaz kristal toz yapıda bir bileşiktir. 166.999 g/mol moleküler ağırlığa sahip, 3,27 g cm⁻³ yoğunlukta ve 70 g/L (20 °C'de) suda çözünürlüğe sahiptir (Tablo 1.1). Potasyum ve bromat tuzundan oluşan bu iyonik bileşik güçlü bir oksitleyici ajandır. Doğal oluşumu olmayan $KBrO_3$ laboratuvar ortamında bromun sıcak potasyum hidroksit çözeltisinden geçirilmesi ile üretilmektedir. Üretiminin yüksek yoğunlukla Arjantin, Brezilya, Çin, Almanya,

Hindistan, İsrail, İtalya, Japonya ve İspanya’da gerçekleştiği bilinmektedir [8,9]. KBrO_3 laboratuvar reaktifi, oksitleyici ajan ve patlayıcılarda kullanılmaktadır. KBrO_3 pek çok ülkede özellikle Japonya’da balık ezmesinde ve fermente içeceklerin üretiminde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Ayrıca soğuk-dalga saç losyonlarında ve kozmetiklerde nötrale edici ajan olarak da kullanımı bilinmektedir [9,10]. KBrO_3 sıklıkla gıda katkı maddesi olarak gıda sektöründe özellikle ekmek üretiminde kullanılmaktadır. 1980’li yılların ortalarına kadar, en etkili yükseltgen özelliği ile bir hamur geliştirici ajan, un için olgunlaştırıcı bir madde ve hamur düzenleyici olarak kullanılmıştır.

Tablo 2.1. KBrO_3 ’ün kimyasal özellikleri

Kimyasal formül	KBrO_3
Moleküler ağırlık	166,999 g/mol
Renk/Görünüm	Beyaz/kristal yada granül
Erime noktası	350 °C
Kaynama noktası	370 °C
Yoğunluk	3,27 g cm ³
Suda çözünürlük	70 g/L (20 °C’de)

KBrO_3 yüksek sıcaklıkta ve düşük pH’da aktivite sergilemektedir ve bu özellik fermantasyonun ileri aşamalarında ve pişirme işleminin başında etki göstermesini sağlamaktadır. KBrO_3 yapısında bulunan bromat, sistenin sülfidril grupları arasında disülfid bağları oluşturarak, protein moleküllerinin yapısını stabilize etmekte ve yakın protein molekülleri arasında bağ oluşumunu sağlamaktadır. Bu yapısal değişim hamur stabilitesini arttırmakta ve hamurdaki serbest sülfidril gruplarının miktarını da azaltmaktadır. Ayrıca bromat un’daki glütene okside ederek, gluten molekülleri ile lipidlerin etkileşimlerini azaltmaktadır. Glütendeki sülfidril gruplarının okside edilmesi karbondioksiti hamura hapsedmekte ve ekmeğin büyük hacimli olmasını sağlamaktadır [10-12]. Gıda sektöründe özellikle en yaygın tüketilen besin olan ekmekte kullanımı ile de KBrO_3 ’ın insanlara kontaminasyonu gerçekleşmektedir. Oksitleyici özelliği ve sülfidril grupları üzerine etkileri düşünüldüğünde, KBrO_3 ’ün

canlı organizmalar üzerinde de potansiyel etkileri kaçınılmazdır. Pek çok canlıda bulunan SOD ve KAT gibi enzimler, glutatyon ve lipoik asit gibi antioksidan moleküller ve metalotiyoninler içerdikleri sülfidril grubu nedeni ile KBrO₃ tarafından okside edilmektedir [13]. Bu inhibisyon organizmada ve hücrelerde çeşitli toksik etkilere neden olabilmektedir. Poul ve arkadaşları [14] 10 mM KBrO₃ uygulamasının Comet testinde DNA hasarı frekansını arttırdığını rapor etmişlerdir. Sai ve arkadaşları [15] 70 mg/kg KBrO₃ uygulamasının farelerde lipid peroksidasyonu düzeyini arttırdığını saptamışlardır.

Literatürde bitkilerde KBrO₃ etkileri üzerine gerçekleştirilmiş kapsamlı bir çalışma bulunmamaktadır. Gerçekleştirilen çalışmalarda ise toksik etki genellikle tek bir parametre ile araştırılmış, multi parametrelili bir çalışma henüz gerçekleştirilmemiştir. Bu çalışmada, KBrO₃'ün toksik etkileri *A. cepa* test materyalinde fizyolojik, sitogenetik, biyokimyasal ve anatomik parametreler yardımı ile araştırılmış ve literatüre bu konuda yeni bir katkı sağlanmaya çalışılmıştır.

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Deney Materyalleri ve Grupları

Deney materyalleri olarak *A. cepa* (2n=16) bulbları ve Sigma Aldrich ürünü olan KBrO₃ (ürün numarası: 309087-100 G, CAS numarası: 0007758012) kimyasalı kullanılmıştır. Kullanılan KBrO₃ dozları canlılarda toksik etki oluşturan doz aralıkları dikkate alınarak belirlenmiştir.

Bulblar her grupta 10 adet olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır.

- Grup I: Kontrol,
Grup II: 25 mg/L KBrO₃,
Grup III: 50 mg/L KBrO₃,
Grup IV: 100 mg/L KBrO₃.

Grup I çeşme suyu, Grup II-IV ise KBrO₃'ün üç farklı dozu ile oda sıcaklığında 72 saat süresince çimlendirilmiştir.

3.2. Fizyolojik Parametre Ölçümleri

Çimlenen bulbların kök uzunlukları radikula oluşumu temel alınarak milimetrik cetvel, ağırlıkları deneysel periyot öncesi ve sonrası hassas terazi ile ölçülmüştür. Çimlenme yüzdeleri ise Eşitlik 1 yardımıyla tespit edilmiştir [16].

$$\text{Çimlenme (\%)} = \frac{\text{çimlenen bulb sayısı}}{\text{toplam bulb sayısı}} \times 100 \quad (1)$$

3.3. MI Yüzdesi, Kromozomal Hasar ve MN Sayılarının Belirlenmesi

1 cm uzunluğunda kesilen kök uçları, 4 °C'de 2 saat fiksasyona tabii tutulmuş (3 hacim C₂H₅OH: 1 hacim CH₃COOH), 15 dk %96'lık C₂H₅OH'da yıkanmış, 60 °C'de 17 dk 1N HCl'de hidrolize edilmiş, 30 dk %45'lik CH₃COOH'da bekletilmiş, 24 saat aseto-karmin ile boyanmış, %45'lik CH₃COOH'da ezilmiş ve sitogenetik

analizler için IRMECO IM-450 TI araştırma mikroskopunda incelenerek, x500 büyütmede fotoğraflandırılmıştır [17].

MN tespitinde, Fenech ve arkadaşları [18] tarafından belirlenen kriterler temel alınmıştır:

- MN çapı, nukleus çapının 1/3'ü kadar olmalıdır,
- MN şekil bakımından oval veya yuvarlak olmalıdır,
- MN zarı, nukleus zarından net bir şekilde ayırt edilebilmelidir.

MI ise Eşitlik 2 yardımıyla hesaplanmıştır.

$$MI = \text{mitoza giren hücre sayısı} / \text{toplam hücre sayısı} \times 100 \quad (2)$$

3.4. Anatmik İncelemeler

Distile suda yıkanan kök uçlarından enine kesitleri alınmış, metilen mavisi ile boyanmış, IRMECO IM-450 TI araştırma mikroskopunda incelenerek, x500 büyütmede fotoğraflandırılmıştır.

3.5. Biyokimyasal Ölçümler

3.5.1. Lipid peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu, Ünyayar ve arkadaşlarının [19] önerdiği metodun revize edilmesiyle, MDA düzeyi ölçülerek tespit edilmiştir. Tüm gruplardan 0,5 g olacak şekilde kök uçları kesilmiş ve %5'lik trikloroasetik asit (TCA) çözeltisinden 1 ml eklenerek, homojenize edilmiştir. Homojenatlar yeni tüplere aktarılmış, 24 °C'de 12,000 g'de 10 dk santrifüj işlemine tabii tutulmuştur. %20'lik TCA çözeltisinde, eşit hacimlerde %0,5'lik tiyobarbitürik asit (TBA) ve süpernatant yeni bir tüpe aktararak, 96 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda, tüpler buz banyosuna yerleştirilmiş ve 10,000 g'de 5 dk santrifüj edilmişlerdir. Süpernatantın absorban değeri 532 nm'de ölçülerek, MDA düzeyi $\mu\text{M g}^{-1}$ FW olarak gösterilmiştir.

3.5.2. Enzim tayini

Enzim ekstraksiyonu 4 °C'de gerçekleştirilmiştir. 0,5 g taze kök ucu toplanmış, distile H₂O ile yıkanmış, 5 mL soğuk NaH₂PO₄ tamponunda (50 mM, pH 7.8)

homojenize edilmiş, 20 dk süresince 10,500 g'de santrifüj edilmiş ve süpernatant enzim analiz işlemlerine kadar 4 °C'de muhafaza edilmiştir [20].

3.5.2.1. SOD aktivite tayini

SOD enzim aktivitesi Beauchamp ve Fridovich [21] tarafından önerilen metoda göre belirlenmiştir. 1,5 mL 0,05 M NaH_2PO_4 tamponu (pH 7.8), 0,3 mL 130 mM $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{S}$, 0,3 mL 750 μM nitroblue tetrazolium klorür (NBT), 0,3 mL 0,1 mM EDTA- Na_2 , 0,3 mL 20 μM $\text{C}_{17}\text{H}_{2}\text{ON}_4\text{O}_6$, 0,01 mL enzim ekstresi, 0,01 mL %4 (w/v) çözünmez polivinilpirolidon (PVPP) ve 0,28 mL de-iyonize sudan oluşan reaksiyon çözeltisi hazırlanmıştır. Reaksiyon 10 dk süresince iki adet 15 W floresan lamba altına tüplerin yerleştirilmesiyle başlatılmış ve 10 dk süresince tüplerin karanlıkta bekletilmesiyle sonlandırılmıştır. Absorbans 560 nm'de okunmuş ve SOD aktivitesi ise $\text{U mg}^{-1}\text{FW}$ olarak gösterilmiştir [20].

3.5.2.2. KAT aktivite tayini

KAT enzim aktivitesi Beers ve Sizer [22] tarafından önerilen metoda göre belirlenmiştir. KAT aktivitesi, 0,3 mL 0, 1 M H_2O_2 , 1,0 mL distile H_2O ve 1,5 mL 200 mM NaH_2PO_4 tamponu (pH 7.8) içeren 2,8 mL reaksiyon çözeltisinde, oda sıcaklığında UV-VIS spektrofotometre yardımıyla ölçülmüştür. Reaksiyon, 0,2 mL enzim ekstraktı ilavesi ile başlatılmış, KAT aktivitesi H_2O_2 tüketiminin bir sonucu olarak, 240 nm'de absorbanstaki düşüş takip edilerek ölçülmüş ve $\text{OD}_{240\text{ nm min. g}^{-1}}$ olarak ifade edilmiştir [20].

3.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler "IBM SPSS Statistics 22" bilgisayar paket programından yararlanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak gösterilmiş, ortalamalar arasındaki istatistiksel önem One-way ANOVA ve Duncan testi ile belirlenmiş ve elde edilen p değeri 0.05 küçük olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BÖLÜM 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

KBrO₃'ün *A. cepa* test materyali üzerinde fizyolojik, sitogenetik, biyokimyasal ve anatomik olarak çeşitli toksik etkilere neden olduğu saptanmıştır. KBrO₃ etkisi ile *A. cepa*'da gözlenen fizyolojik değişimler Tablo 4.1'de verilmiştir. KBrO₃ uygulanan gruplarda birbiri ile ilişkili olan çimlenme yüzdesi, kök uzaması ve ağırlık artışı parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) azalmalar belirlenmiştir. Kök büyümesi ile başlayan çimlenme olayı sonrasında tohumlarda ağırlık artışı gözlenmektedir. Bu basamaklardan birinde anormallik oluşumu doğal olarak diğer süreçleri de etkilemektedir. *A. cepa*'da kök uzunluğunun KBrO₃ uygulama dozuna bağlı olarak azaldığı gözlenmiştir. Kontrol grubunda 72 saatlik çimlenme sonrasında $8,50\pm1,59$ cm kök uzunluğu belirlenirken Grup IV'de kök uzunluğu $2,30\pm1,16$ cm olarak bulunmuştur. Kısaca 100 mg/L KBrO₃ uygulamasının kök uzunluğunu kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 3,7 kat azalttığı ve bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) olduğu belirlenmiştir. Kök uzamasında görülen bu anormallik çimlenme fizyolojisinde de gözlenmiş, KBrO₃ uygulama dozuna bağlı olarak çimlenme yüzdelерinde azalma belirlenmiştir. Kontrol grubunda %93 oranında bir çimlenme belirlenirken, bu oranın Grup II, Grup III ve Grup IV'de sırasıyla 1,20, 1,75 ve 2,16 kat azaldığı tespit edilmiştir. Çimlenme olayı süresince kök büyümesi ve çeşitli sürgünlerin gelişimi bitkide ağırlık artışına yol açmaktadır. Kontrol grubunda çimlenmede ve kök uzamasında olağan döngü gerçekleşmiş ve bu durum ağırlık artışına yol açmıştır. Ortalama $4,00\pm0,30$ g ağırlığına sahip *A. cepa* bulbları çimlenme sonrasında 6,09 g'lık bir artışla $10,09\pm1,29$ ağırlığına ulaşmıştır. KBrO₃ uygulaması ile kök uzaması ve çimlenme oranında gözlenen azalma ağırlık artışına da yansımıştır. 100 mg/L KBrO₃ uygulanan bulblarda sadece 0,94 g'lık ağırlık artışı saptanmış ve kontrol grubuna kıyasla yaklaşık %85'lik bir azalma belirlenmiştir. Fizyolojik parametrelerde gözlenen bu değişimler KBrO₃'nin hücrelerdeki toksik etkilerine işaret etmektedir. Hücrelerdeki toksik etki özellikle bromat tarafından indüklenen oksidatif hasara bağlıdır. Bromat, doğrudan veya dolaylı olarak hücre içi indirgeyicilerle reaksiyona girerek aktif oksijen türlerinin oluşumuna neden

olmaktadır [23]. Bir hücrede oluşan serbest radikaller ve oksidatif stres nükleik asit, protein ve lipitleri içeren bir veya daha fazla biyomoleküle zarar vererek, hücrenin olağan döngüsünü bozmaktadır. Özellikle hücre proliferasyonu ve hücre farklılaşmasında meydana gelen gecikme ve bozulmalar çimlenme gibi pek çok fizyolojik basamakları inhibe etmektedir. Bu çalışmada KBrO₃ uygulanan gruplarda fizyolojik parametrelerde gözlenen azalma bromat'ın toksik etkileri ile açıklanabilir. Literatürde de benzer şekilde KBrO₃ uygulamasının hücrelerde ve organizmalarda çeşitli toksik etkilerinden bahsedilmektedir. KBrO₃ uygulanan hücrelerde çeşitli moleküllerin oksidasyonu, hücre proliferasyonunda değişimler ve buna bağlı toksik etkiler pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir [9, 24]. Benzer bir çalışmada, 38 mg/kg bw KBrO₃ uygulamasının canlılarda ağırlık kazanımında önemli azalmalara neden olduğu belirtilmiştir [25].

Tablo 4.1. *Allium cepa*'da KBrO₃'ün seçilen fizyolojik parametrelere etkisi

Gruplar	Çimlenme (%)	Kök uzunluğu (cm)	Son ağırlık (g)	Ağırlık kazanımı (g)
Grup I	93	8,50±1,59 ^a	10,09±1,29 ^a	+6,09
Grup II	77	7,00±1,10 ^b	8,20±1,52 ^b	+4,15
Grup III	53	4,50±0,92 ^c	6,80±1,05 ^c	+2,80
Grup IV	43	2,30±1,16 ^d	5,00±1,37 ^d	+0,94

*Grup I: Kontrol, Grup II: 25 mg/L KBrO₃, Grup III: 50 mg/L KBrO₃, Grup IV: 100 mg/L KBrO₃. Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterildi (n=10). Aynı sütün içerisinde farklı harfler^(a-d) ile gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan önemlidir (p<0.05).

KBrO₃ uygulamasının *A. cepa* kök ucu hücrelerinde indüklediği sitogenetik değişimler Tablo 4.2'de verilmiştir. Kontrol grubu hücrelerinde birkaç yapışkan kromozom, vagrant kromozom, kromatinin eşit olmayan dağılımı ve c-mitoz dışında herhangi bir kromozomal anormallik gözlenmemiştir. Bu anormallikler oldukça düşük düzeydedir ve istatistiksel olarak anlamlı değildir (p>0.05). KBrO₃ uygulama dozunun artması ile birlikte kromozomal anormallik oluşumlarının sıklığı da artmış en fazla anormallik 100 mg/L KBrO₃ uygulanan grupta elde edilmiştir. Kromozomal anormallik tipleri arasında en sık rastlanan fragment ve yapışkan kromozom oluşumlarıdır. Bunu sırası ile vagrant kromozom, kromatinin eşit olmayan dağılımı,

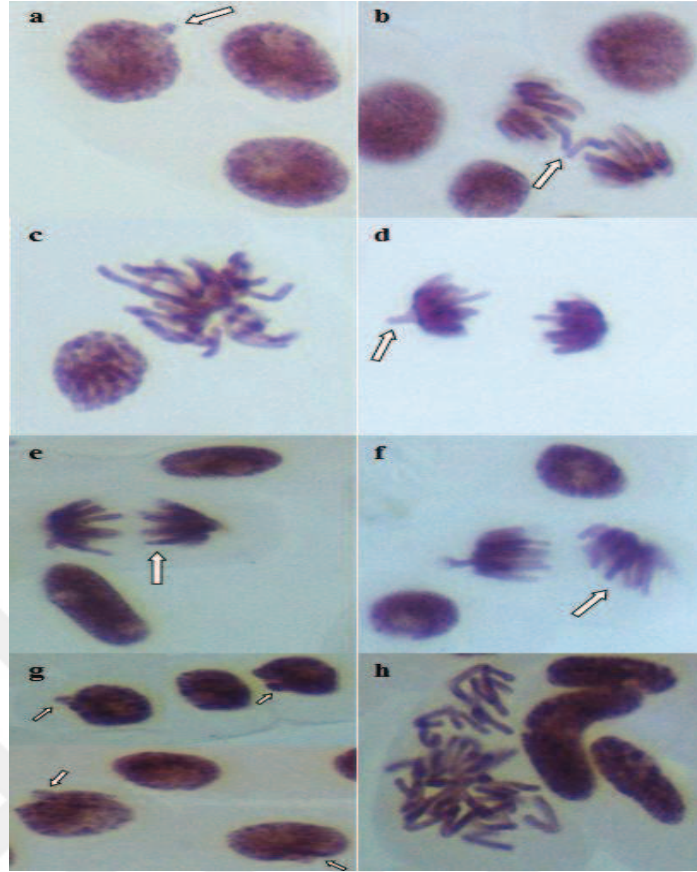
ters kutuplaşma, nukleus hasarı ve c-mitoz izlemiştir (Şekil 4.1). Benzer toksik etki MN oluşumunda da gözlenmiş ve KBrO₃ uygulama dozunun 25 mg/L'den 100 mg/L'ye arttırılması ile MN sıklığının da arttığı ve sayılan toplam 1.000 hücrede 50,00±7,18 oranında MN oluşumu gözlenmiştir. KBrO₃ uygulaması ile oluşan kromozomal anormallik ve MN oluşumları hücre proliferasyonunda anormalliklere neden olmuş ve bu hipotez MI oranlarındaki azalma ile kanıtlanmıştır. Kontrol grubunda bölünen hücre sayısı 900,00±22,00 iken, 100 mg/L KBrO₃ uygulanan grupta bu değer 500,00±21,12 olarak belirlenmiştir. Kısaca MI oranı 100 mg/L KBrO₃ uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla 1,8 kat azalmış ve %9'dan %5'e gerilemiştir. KBrO₃ uygulamasının *A. cepa* kök ucu hücrelerinde oluşturduğu sitogenetik hasarlar KBrO₃'ün potansiyel toksisitesinden kaynaklanmaktadır. KBrO₃'ün oksidatif DNA hasarına yol açtığı ve 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. DNA'da oluşan oksidatif hasar polinükleotid zincirindeki baz ve şeker yapılarında hasara, zincir kırıklarına ve çapraz bağlı DNA-protein komplekslerinin oluşumuna neden olmaktadır [26]. DNA'daki bazlar arasında guanin oksidasyona en açık olandır ve oksidatif hasar durumunda DNA modifikasyonları arasında en sık rastlanan ürün 8-OHdG'dir. Bazlarda oluşan bu tür yapısal değişimler yanlış eşleşmelere, abazik bölgelerin oluşumuna, tek zincir kırıklıklarına ve stabil olamayan DNA yapısına yol açmaktadır [27]. Tüm bu anormallikler fragment gibi çeşitli tipte kromozomal anormallik ve MN oluşumları ile hücre döngüsünde aksamalara neden olmaktadır. Tüm hücresel aktivite genetik kontrol altındadır ve genomik hasarın mitoz bölünmeyi ve doğal olarak MI oranlarını da etkilemesi de muhtemeldir. DNA'daki yapısal hasarlar hücre bölünmesinin kontrol noktalarında durmasına, tamir mekanizmasının çalışmasına ve mitotik döngüde gecikmelere yol açmaktadır. Tamir edilemeyecek durumda olan hücrelerde ise kontrollü ölüm süreci başlamaktadır. Tüm bu anormallikler MI oranlarında azalmalara yol açmaktadır. KBrO₃ uygulaması ile MI'da görülen azalma, 8-OHdG oluşumuna bağlı olarak DNA yapısında hasar ve bu hasara bağlı olarak mitozun gecikmesi ile açıklanabilir. Bu çalışmada KBrO₃ uygulaması ile elde edilen sitogenetik değişimler literatürdeki bulgular ile örtüşmektedir. Lee ve arkadaşları [28] KBrO₃ uygulamasının DNA'da oksidatif hasara neden olduğunu, 8-OHdG oluşumunu indükleyerek tümör oluşumunu tetiklediğini rapor etmişlerdir. Romnick

ve arkadaşları [29] 50, 75 and 100 ppm KBrO₃ uygulamasının *A. cepa* meristematik hücrelerinde doza bağlı olarak MN oluşumuna neden olduğunu ve bu oluşumları KBrO₃ tarafından indüklenen oksidatif hasardan kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Tablo 4.2. KBrO₃ tarafından teşvik edilen sitogenetik hasarlar

Hasar tipi	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
FRG	0,00±0,00 ^d	18,00±4,00 ^c	32,00±4,94 ^b	60,00±7,13 ^a
YK	0,10±0,32 ^d	15,00±4,50 ^c	28,00±5,46 ^b	50,00±6,94 ^a
VK	0,10±0,32 ^d	10,00±3,71 ^c	20,00±4,57 ^b	38,00±5,54 ^a
KED	0,20±0,42 ^d	6,00±2,21 ^c	15,00±4,00 ^b	27,00±5,62 ^a
TK	0,00±0,00 ^d	5,00±2,26 ^c	10,00±2,83 ^b	20,00±4,00 ^a
NH	0,00±0,00 ^d	3,50±1,43 ^c	8,00±2,94 ^b	15,00±4,06 ^a
CM	0,20±0,42 ^d	1,50±0,71 ^c	4,10±1,66 ^b	9,20±2,86 ^a
MN	0,00±0,00 ^d	15,00±4,32 ^c	28,00±5,40 ^b	50,00±7,18 ^a
MI (%)	900,00±22,00 ^a (9,00)	820,50±23,75 ^b (8,20)	705,00±17,14 ^c (7,05)	500,00±21,12 ^d (5,00)

*Grup I: Kontrol, Grup II: 25 mg/L KBrO₃, Grup III: 50 mg/L KBrO₃, Grup IV: 100 mg/L KBrO₃. Veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak gösterildi (n=10). MN için her bir grupta 1,000 hücre, kromozomal hasarlar için her bir gruptaki her bir kök ucunda 100, toplamda 1,000 hücre, MI için ise her bir gruptaki her bir kök ucunda 1,000, toplamda 10,000 hücre analiz edildi. Aynı satır içerisinde farklı harfler^(a-d) ile gösterilen ortalamalar istatistiksel açıdan önemlidir (p<0.05). FRG: fragment, YK: yapışkan kromozom, VK: vagrant kromozom, KED: kromatinin eşit olmayan dağılımı, TK: ters kutuplaşma, NH: nukleus hasarı, CM: c-mitoz, MN: mikronukleus, MI: mitotik indeks.

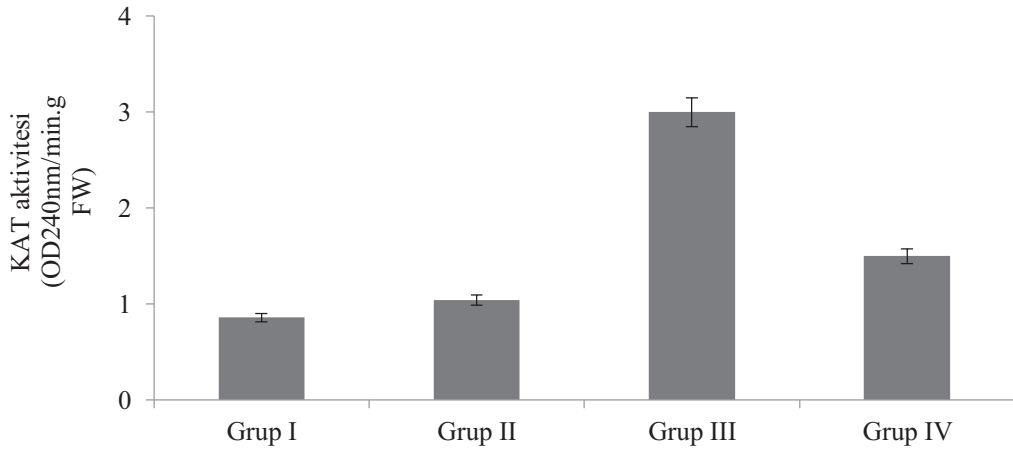
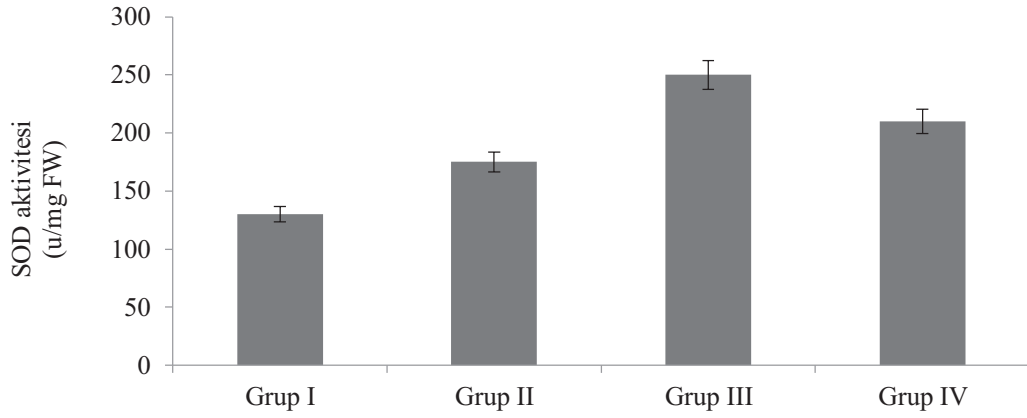
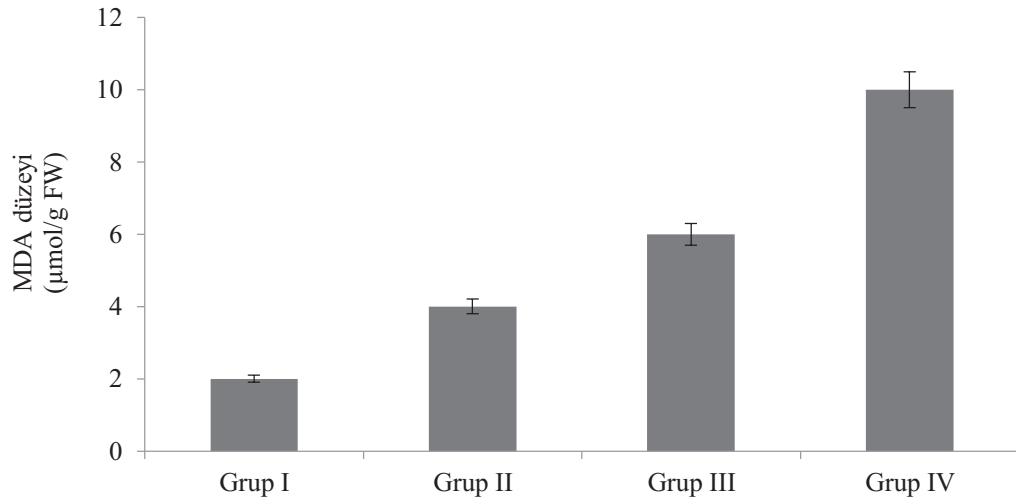


Şekil 4.1. KBrO₃ tarafından teşvik edilen kromozomal hasarlar

(a: MN, b: fragment, c: yapışkan kromozom, d: vagrant kromozom, e: kromatinin eşit olmayan dağılımı, f: ters kutuplaşma, g: nukleus hasarı, h: c-mitoz)

KBrO₃ uygulamasının lipid peroksidasyonu göstergesi olan MDA düzeyi ve antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkileri Şekil 4.2’de verilmiştir. Kontrol grubunda 2 µmol/g MDA düzeyi bulunurken, KBrO₃ uygulama dozu ile birlikte MDA düzeyinin arttığı belirlenmiştir. 100 mg/L KBrO₃ uygulanan grupta MDA düzeyinin kontrol grubuna kıyasla 5 kat artarak 10 µmol/g düzeyine ulaştığı gözlenmiştir. Hücrelerde oluşan oksidatif strese karşı antioksidan enzimler aktive olmaktadır. KBrO₃ uygulamasının MDA düzeyini arttırması oksidatif stres oluşumuna işaret etmektedir ve antioksidan enzimlerin bu strese karşı cevap oluşturması beklenmektedir. SOD ve KAT aktiviteleri incelendiğinde KBrO₃ uygulamasına karşı enzim indüksiyonu cevabının olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubunda SOD ve KAT aktiviteleri sırasıyla 130 u/mg ve 0,86 OD240nm/min.g olarak tespit edilmiş, 25-50 mg/L KBrO₃ uygulamasının bu aktiviteleri arttırdığı belirlenmiştir. 50 mg/L KBrO₃ uygulanan grupta SOD ve KAT aktiviteleri sırasıyla

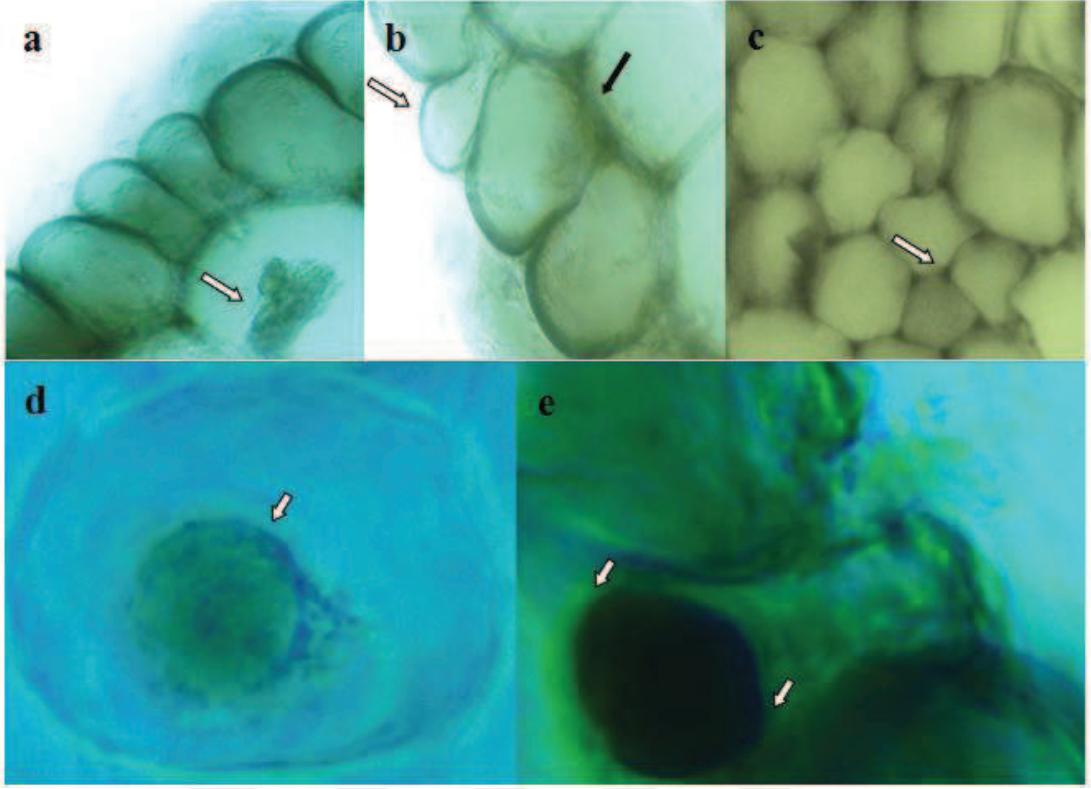
250 u/mg ve 3,0 OD240nm/min.g olarak bulunmuştur. 100 mg/L KBrO₃ uygulanan grupta antioksidan enzim aktivitelerinde azalma gözlenmiş, fakat aktivitenin kontrol grubuna göre hala yüksek olduğu tespit edilmiştir. Hücrelerde dış etkenler ya da iç denge sonucunda serbest radikaller oluşabilmektedir. Bu radikaller hücrelerde oksidatif hasara neden olmaktadır ve hücrede bu hasara karşı antioksidan sistem devreye girmekte ve oksidatif hasara karşı koruyucu rol üstlenmektedir. Hücrelerde antioksidan-oksidan dengenin bozulması pek çok anormalliği de beraberinde getirmektedir. KBrO₃'ün lipid peroksidasyonuna neden olduğu ve oksidatif strese yol açtığı bilinmektedir. Lipid peroksidasyonu, lipidleri ve lipid içeren diğer molekülleri özellikle hücre zarını etkileyen oksidatif hasardır. Hücresel membran lipidleri en önemli oksidatif stres substratlarından ve hücre zarlarındaki doymamış yağ asitleri serbest radikaller tarafından perokside edilir ve MDA gibi ara ürünler ortaya çıkar [30, 31]. MDA lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve varlığı oksidatif stres oluşumuna ve lipid peroksidasyonuna işaret etmektedir. Mutajenik bir ürün olarak bilinen MDA'nın yağ asitleriyle birleşerek hücre zarında çeşitli hasarlara yol açtığı bilinmektedir. Hücrelerde oksidatif hasarın yarattığı etkiler antioksidan enzimler tarafından nötralize edilmektedir. SOD ve KAT oksidatif stres varlığında indüklendiği bilinen iki antioksidan enzimdir. Bu enzimler radikal ürünleri nötralize ederek hücreyi korumaktadır. Bu çalışmada da, KBrO₃ uygulaması ile MDA düzeyinde gözlenen artış oksidatif hasara işaret etmektedir. Ahmad ve arkadaşları [32] 5mM KBrO₃ uygulanan eritrosit hücrelerinde MDA düzeyinin kontrol grubuna kıyasla 6,7 kat arttığını ve bu artışın oksidatif hasar ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Bu çalışmada, 25 ve 50 mg/L KBrO₃ uygulanan kök ucu hücrelerinde SOD ve KAT aktivitelerinde artış gözlenmiş ve bu artış oksidatif strese karşı oluşan cevap olarak değerlendirilmiştir. 100 mg/L KBrO₃ uygulanan grupta ise MDA düzeyindeki artışa rağmen, artan SOD ve KAT aktivitelerinde azalma gözlenmiş ve bu azalma hücrenin tolere edemediği oksidatif stresin enzimatik yapıda oluşturduğu muhtemel bozulma ile ilişkilendirilmiştir. Benzer şekilde, Dalle-Donne ve arkadaşları [33] oksidatif stresin protein yapıdaki enzimlerin oksidasyonuna, amino asitlerde parçalanmaya, protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna ve sonuçta enzimatik fonksiyon kaybına neden olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 4.2. KBrO₃'ün MDA düzeyleri ile SOD ve KAT enzim aktivitelerine etkisi

[Grup I: Kontrol, Grup II: 25 mg/L KBrO₃, Grup III: 50 mg/L KBrO₃, Grup IV: 100 mg/L KBrO₃. Her histogram ondalık bir ortalamadır. Çubukların üzerindeki dikey çizgiler standart sapmayı gösterir].

Sitogenetik ve fizyolojik parametrelerde olumsuz etkilere neden olan ve oksidatif strese sebep olan KBrO_3 uygulaması kök ucu hücrelerinde anatomik yapıda da değişimlere neden olmuştur. KBrO_3 uygulaması ile *A. cepa* kök ucu hücrelerinde gözlenen anatomik değişimler Şekil 4.3’de verilmiştir. *A. cepa* kök ucu meristematik hücrelerinde gözlenen anatomik değişimlerden biri korteks hücrelerinde madde birikimidir. Nekroz, epidermis hücre deformasyonu, korteks hücre çeperinde kalınlaşma ve yassılaşmış hücre çekirdeği ise diğer değişimlerdir. Anatomik değişimlerin görülme sıklığının KBrO_3 uygulama dozunun artıkça arttığı belirlenmiştir. Maksimum anatomik değişimler 100 mg/L KBrO_3 uygulanan grupta gözlenmiştir. Kök epidermis tabakası hücrelerinde gözlenen anatomik değişimler hücre zarının karakteristik yapısındaki bozulmalarla ilişkilidir. Kök anatomisinde, epidermis dokusu KBrO_3 ’e maruz kalan ilk dokudur ve anatomik değişimler burada başlamaktadır. Kök dokusunda, epidermis tabakasını geçen kimyasal maddeler kortekse ulaşır. Korteks hücrelerinde madde birikimi ve KBrO_3 uygulamasından sonra hücre duvarının kalınlaşması gibi anatomik değişiklikler toksisiteye karşı geliştirilen tepkilerdir. Bu anatomik değişiklikler toksik ajanlara karşı bir bariyer görevi görmekte ve merkezi silindire olan akışı azaltmaktadır [34, 35]. Epidermis hücrelerinde KBrO_3 tarafından indüklenen oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu ile özellikle zar yapısına zarar vermekte ve hücrede şekil değişikliği kaçınılmaz olmaktadır. Hücre çekirdeğinin yassılaşması da diğer bir anatomik değişimdir ve KBrO_3 uygulamasının fizyolojik, biyokimyasal ve sitolojik etkileri sonucu hücre içi basıncındaki muhtemel değişim hücresel yapılara uygulanan baskıyı da değiştirmekte ve şekil değişikliğine yol açabilmektedir. Hücre çekirdeği tipik olarak oval veya elipsoidaldir. Ancak, fiziksel veya çevresel değişikliklere cevap olarak değişikliğe uğrayabilir [36, 37]. Nükleer şekil ve hacimdeki değişiklikler, nükleer protein konsantrasyonunu, DNA heliks yapısı ve hacmi ile de ilişkilidir. Hücre çekirdeğindeki bu dengenin bozulması hücre çekirdeğinin şeklinde değişimlere yol açabilir. KBrO_3 uygulaması ile hücre çekirdeğinin şeklindeki değişim pek çok mekanizma ile ilişkilidir. Literatürde de *A. cepa* kök anatomisinde toksik ajanlara karşı belirgin olmayan iletim doku, yassılaşmış hücre çekirdeği, hücre deformasyonu gibi pek çok anatomik varyasyonların olduğu rapor edilmektedir [38, 39].



Şekil 4.3. KBrO₃ tarafından teşvik edilen anatomik değişimler

[a: korteks hücrelerinde bazı maddelerin birikimi, b: epidermis hücre hasarı (*beyaz ok*), nekroz (*siyah ok*), c: korteks hücre duvarında kalınlaşma, d: hücre çekirdeğinin olağan görünümü (*oval*), e: yassılaşmış hücre çekirdeği

BÖLÜM 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Teknolojinin gelişmesiyle birlikte hem çevre hem de canlı organizmalar pek çok kirlenmeye maruz kalabilmektedir. Farklı sektörlerde üretimi arttırmak, raf ömrünü uzatmak, kaliteyi ve görünürlüğü arttırmak adına pek çok katkı maddeleri kullanılmaktadır. $KBrO_3$ gıda sektöründe özellikle ekmek üretiminde kullanılan bir katkı maddesidir ve ekmek tüketimi yoluyla canlılara kontamine olabilmektedir. Bu nedenle, canlıların zaruri olarak kontamine olduğu tüm bileşikler detaylı toksisite testleri ile araştırılmalıdır. Kimyasal ve kimyasalların kullanıldığı endüstri çeşitliliğinin çok olması, bu çalışmaları kaçınılmaz ve yetersiz kılmaktadır. Literatürde $KBrO_3$ üzerine yapılmış çalışmalar bulunmakla birlikte bu çalışmalar henüz istenilen düzeyde değildir ve canlılar üzerindeki etkileri tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışma, literatürdeki bu boşluğun doldurulmasına katkı sağlayacak ve daha ileri çalışmalar için rehber olacaktır. $KBrO_3$ 'ün ökaryotik model bir materyal olan *A. cepa*'da fizyolojik, biyokimyasal, sitogenetik ve anatomik açıdan çeşitli toksik etkilere neden olduğu belirlenmiştir. Özellikle test edilen hücrelerde MDA düzeyindeki artış $KBrO_3$ 'ün oksidatif hasara neden olduğunun kanıtıdır. Antioksidan enzim analizleri ile hücrenin bu toksik etkiyi nötralize edip, edemediği incelenmiş, 25 ve 50 mg/L $KBrO_3$ konsantrasyonun hücrelerde antioksidan sistemi aktive ettiği belirlenmiştir. Hücre bu değişimler de kendi savunma mekanizmasını hareket geçirmiş fakat 100 mg/L $KBrO_3$ dozunda ise antioksidan sistemde de bozulmaların olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu, toksisite çalışmalarında toksik etkinin ve buna karşı geliştirilen cevabın doza bağlı olarak incelenmesi gerekliliğini ortaya koymuştur. Sonuç olarak, endüstrilerde özellikle gıda sektöründe kullanılan katkı maddelerinin canlılar üzerindeki etkileri detaylı olarak araştırılmalı, toksik etkisi bulunan kimyasalların kullanımından kaçınılmalıdır. Kullanımı zaruri olan kimyasalların ise toksik etki göstermeyen ya da organizmaların toksik etkisini nötralize edebileceği dozlar kullanılmalıdır. Tüm bu önlemler alındığında ve dikkatle uygulandığında canlı hayatın sürdürülebilirliği ve yaşam kalitesi artmış olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] Arome D., Chinedu E., The importance of toxicity testing. J. Pharm. Bio Sci., 4, 146-148, 2013.
- [2] Boğa A., Binokay S., Gıda katkı maddeleri ve sağlığımıza etkileri. Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 19(3), 141-154, 2010.
- [3] Şireli M., Emre B., Sagmanlıgil V., İriadam M., Kobaylarda akut nitrit zehirlenmesinin methemoglobin ve hemolitik anemi oluşumu üzerine etkisi. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 42(4), 513-517, 1995.
- [4] Erkmen O., Gıda kaynaklı tehlikeler ve güvenli gıda üretimi. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi, 53(3), 220-235, 2010.
- [5] Sharma M., Rajput A., Rathod C., Sahu S., Food chemicals induces toxic effect on health: overview. UK J. Pharm. Biosci., 6(4), 33-37, 2018.
- [6] Yörük N.G., Danyer E., Gıda katkı maddeleri genel bilgiler ve tanımlar. Türkiye Klinikleri Food Sci. Special Topics, 2(2), 1-10, 2016.
- [7] Göçmen D., Un ve katkı maddelerinin ekmek kalite ve bayatlamasına etkileri. Gıda, 18(5), 325-331, 1993.
- [8] Chemical Information Services, Inc., Directory of World Chemical Producers, 1995/96 Standard Edition , Dallas, TX, p. 587, 1995.
- [9] Kurokawa Y., Maekawa A., Takahashi M., Hayashi Y., Toxicity and carcinogenicity of potassium bromate a new renal carcinogen. Environ. Health Perspect., 87, 309-335, 1990.
- [10] Budavari, S., The Merck Index , 12th Ed., Whitehouse Station, NJ, Merck & Co., p. 1313, 1996.
- [11] Oloyede O.B., Sunmonu T.O., Potassium bromate content of selected bread samples in Ilorin, Central Nigeria and its effect on some enzymes of rat liver and kidney. Food Chem. Toxicol., 47(8), 2067- 2070, 2009.
- [12] Alli A.L., Nwegbu M.M., Inyang B.I., Nwachukwu K.C., Ogedengbe J.O., Onaadeipo O., Onifade E.A., Assessment of bread safety: determination of

potassium bromate in selected bread samples in Gwagwalada, Abuja. *Int J. Health Nutr.*, 4(1), 15-20, 2013.

- [13] Singer T.P., Enzyme systems containing active sulfhydryl groups. The role of glutathione. *Science*, 97(2520), 356-358, 1943.
- [14] Poul J.M., Huet S., Godard T., Sanders P., Lack of genotoxicity of potassium iodate in the alkaline comet assay and in the cytokinesis-block micronucleus test. Comparison to potassium bromate. *Food Chem. Toxicol.*, 42(2), 203-209, 2004.
- [15] Sai K., Takagi A., Umemura T., Hasegawa R., Kurokawa Y., Relation of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in rat kidney to lipid peroxidation, glutathione level and relative organ weight after a single administration of potassium bromate. *Jpn. J. Cancer Res.*, 82(2): 165-9, 1991.
- [16] Atik M., Karagüzel O., Ersoy S., Effect of temperature on germination characteristics of *Dalbergia sissoo* seeds. *Mediterr. Agric. Sci.*, 20(2), 203-210, 2007.
- [17] Staykova T.A., Ivanova E.N., Velcheva I.G., Cytogenetic effect of heavy metal and cyanide in contaminated waters from the region of Southwest Bulgaria. *J. Cell Mol. Biol.*, 4, 41-46, 2005.
- [18] Fenech M., Chang W.P., Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S., Zeiger E., Human micronucleus project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, 534(1), 65-75, 2003.
- [19] Unyayar S., Celik A., Cekic F.O., Gozel A., Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutagenesis*, 21, 77-81, 2006.
- [20] Zou J., Yue J., Jiang W., Liu D., Effects of cadmium stress on root tip cells and some physiological indexes in *Allium cepa* var. *agrogarum* L. *Acta Biol. Cracov. Bot.*, 54(1), 129-141, 2012.
- [21] Beauchamp C., Fridovich I., Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to Acrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 44(1), 276-287, 1971.
- [22] Beers R.F., Sizer I.W., Colorimetric method for estimation of catalase. *J. Biol. Chem.*, 195, 133-139, 1952.
- [23] Chipman J.K., Davies J.E., Parsons J.L., Nair J., O'Neill G. Fawell J.K., DNA oxidation by potassium bromate; a direct mechanism or linked to lipid peroxidation?. *Toxicol.*, 126, 93-102, 1998.

- [24] Khan N., Sultana S., Abrogation of potassium bromate-induced renal oxidative stress and subsequent cell proliferation response by soy isoflavones in Wistar rats. *Toxicology*, 201(1-3), 173–184, 2004.
- [25] De Angelo A.B., George M.H., Kilburn S.R., Moore T.M., Wolf D.C., Carcinogenicity of potassium bromate administered in drinking water to male B6C3F1 mice and Fischer 344/N rats. *Toxicol. Pathol.*, 26, 587–594, 1998.
- [26] Ercan N., Fidancı U.R. Piyodermalı köpeklerde idrarda 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeyleri. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.*, 59, 163-168, 2012.
- [27] Kumar, S.B., Dada, R., Gupta, N.P., Environmental Toxicants–Induced Male Reproductive Toxicity: Role of Oxidative Stress. In *Bioenvironmental Issues Affecting Men's Reproductive and Sexual Health*,). Academic Press, pp. 305-322, 2018.
- [28] Lee Y.S., Choi J.Y., Park M.K., Choi E.M., Kasai H., Chung M.H., Induction of OH8Gua glycosylase in rat kidneys by potassium bromate (KBrO₃), a renal oxidative carcinogen. *Mutat. Res.*, 364, 227–233, 1996.
- [29] Cajigal RM, Leomerto A. Somera. Micronucleus Test of Varying Amounts of Potassium Bromate (KBrO₃) on the Meristematic Cells of *Allium cepa* var. *aggregatum* Root Tips. An Undergraduate Thesis Presented to the Department of Biology College of Arts and Sciences University of the Philippines Manila, 1999.
- [30] Nawrot T.S., Van Hecke E., Thijs L., Richart T., Kuznetsova T., Jin Y., Staessen J.A., Cadmium-related mortality and long-term secular trends in the cadmium body burden of an environmentally exposed population. *Environ. Health Perspect*, 116(12), 1620–1628, 2008.
- [31] Cuypers A., Plusquin M., Remans T., Jozefczak M., Keunen E., Gielen H., Nawrot T., Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*, 23(5), 927-940, 2010.
- [32] Ahmad M.K., Amani S., Mahmood R., Potassium bromate causes cell lysis and induces oxidative stress in human erythrocytes. *Environ. Toxicol.*, 29(2), 138-145, 2014.
- [33] Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D, Milzani A., Colombo R., Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta*, 329(1-2), 23-38, 2003.

- [34] Shu X., Yin L., Zhang Q., Wang W., Effect of Pb toxicity on leaf growth, antioxidant enzyme activities, and photosynthesis in cuttings and seedlings of *Jatropha curcas* L. Environ. Sci. Pollut. Res., 19(3), 893-902, 2012.
- [35] Singh D., Pal M., Singh R., Singh C.K., Chaturvedi A.K., Physiological and biochemical characteristics of *Vigna* species for Al stress tolerance. Acta Physiol. Plant., 37 (4), 87-99, 2015.
- [36] Dahl K.N., Ribeiro A.J., Lammerding J., Nuclear shape, mechanics, and mechanotransduction. Circ. Res., 102, 1307-1318, 2008.
- [37] Dauer W.T., Worman H.J., The nuclear envelope as a signaling node in development and disease. Dev. Cell, 17, 626-638, 2009.
- [38] Tütüncü E., Yalçın E., Acar A., Yapar K., Çavusoglu K., Investigation of the toxic effects of a carbamate insecticide methiocarb in *Allium cepa* L. Cytologia, 84(2), 1-5, 2019.
- [39] Yalçın E., Uzun A., Çavusoglu K., In vivo epichlorohydrin toxicity: cytogenetic, biochemical, physiological and anatomical evidences. Environ. Sci. Pollut. Res. 26, 22400-22406, 2019.

ÖZGEÇMİŞ

Gökçe YILDIRIM 1987 yılında Merzifon'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Amasya'da tamamladı. 2005 yılında Suluova Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. 2007 yılında başladığı Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü 2011 yılında bitirdi. 2018 yılında Giresun Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalında başladığı Yüksek Lisans eğitimini ise Temmuz 2020 yılında tamamladı.