

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Arzu YAVUZ

BENZOL PEROKSİT'İN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE *IN VITRO* GENOTOKSİK ETKİLERİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2005

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BENZOL PEROKSİT'İN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE
***IN VITRO* GENOTOKSİK ETKİLERİ**

Arzu YAVUZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez/....../2005 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği/ Oyçokluğu İle Kabul Edilmiştir.

İmza.....

İmza.....

İmza.....

Prof.Dr.Mehmet TOPAKTAŞ

Prof.Dr.Rüştü HATİPOĞLU

Doç.Dr.Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

DANIŞMAN

ÜYE

ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu Tez Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu-Bilim Adamı Yetiştirme Grubu (TÜBİTAK-BAYG) Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: FEF.2003.YL.39

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, şekil ve fotoğrafların gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BENZOL PEROKSİT'İN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE
IN VITRO GENOTOKSİK ETKİLERİ**

Arzu YAVUZ
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ

Yıl: 2005, Sayfa: 132

Jüri : Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ

Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU

Doç. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

Bu çalışmanın amacı, unda beyazlatma maddesi olarak kullanılan benzol peroksit'in genotoksik etkisinin olup olmadığını insan perifer al lenfositlerinde *in vitro* kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom aberasyonu (KA) ve mikronükleus (MN) testleri ile araştırmaktır. Hücreler 25, 50, 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarındaki benzol peroksit ile 24 ve 48 saat muamele edilmiştir.

Bu çalışmada, benzol peroksit'in genel olarak KKD'yi arttırdığı, ancak bu artışın sadece en yüksek konsantrasyondaki (100 µg/ml) benzol peroksit ile 48 saatlik muamele süresinde istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır. Ayrıca benzol peroksit insan perifer al lenfositlerinde 24 saatlik muamele süresinde 75 µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda, 48 saatlik muamele süresinde tüm konsantrasyonlarda anormal hücre yüzdesini ve hücre başına düşen kromozom aberasyonu sayısını (KA/Hücre) arttırmıştır. Bu artış doza bağlı bir durum göstermiştir. Bunun yanında benzol peroksit'in 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde genel olarak hem replikasyon indeksini (RI) hem de mitotik indeksi (MI) olumsuz yönde etkilediği, ancak bu durumun sadece 48 saatlik muamele süresinde istatistiksel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca benzol peroksit'in insan perifer al lenfositlerinde MN oluşumunu uyardığı, ancak bu artışın, yüksek iki konsantrasyonda (75 µg/ml ve 100 µg/ml) 48 saatlik muamele süresinde kontrole göre önemli olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: İnsan Perifer al Lenfositleri, Benzol Peroksit, Kardeş Kromatid Değişimi (KKD), Kromozom Aberasyonu (KA), Mikronükleus (MN)

ABSTRACT

MSc THESIS

IN VITRO GENOTOXIC EFFETS OF BENZOYL PEROXIDE IN HUMAN PERIPHERAL LYMPHOCYTES

Arzu YAVUZ

DEPARTMENT OF BIOLOGY

INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor : Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ

Year: 2005, Pages: 132

Jury : Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ

Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU

Assoc. Prof. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

The aim of this study was to investigate the possible genotoxic effects of benzoyl peroxide, which used as bleaching agent in flour, by determining *in vitro* sister chromatid exchange (SCE), chromosome aberration (CA) and micronucleus (MN) tests in human peripheral lymphocytes. The cells were treated with 25, 50, 75 and 100 µg/ml benzoyl peroxide for 24 h and 48 h treatment periods.

Benzoyl peroxide generally induced SCEs, but this effect was found significant only at the highest concentration (100 µg/ml) for 48 h treatment period in the present study. Also benzoyl peroxide increased both percentage of abnormal cells and number of chromosome aberrations per cell (CAs/Cell) at 75 µg/ml and 100 µg/ml concentrations for 24 h treatment period and at all concentrations for 48 h treatment period in human peripheral lymphocytes. This increase was dose-dependently manner. In addition to this, benzoyl peroxide affected negatively both replication index (RI) and mitotic index (MI). However this effect was found statistically significant only for 48 h treatment period. Benzoyl peroxide generally induced micronucleus formation. Besides, this effect was statistically significant at 75 µg/ml and 100 µg/ml concentration for 48 h treatment period when compared with control.

Key words: Human Peripheral Lymphocytes, Benzoyl Peroxide, Sister Chromatid Exchange (SCE), Chromosome Aberration (CA), Micronucleus (MN)

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ'a ve Doç. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Genetik laboratuvarında birlikte çalıştığım ve çok büyük yardımlarını gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Hasan Basri İLA, Arş. Gör. Ahmet KAYRALDIZ, Arş. Gör. Ayşe YAVUZ, Arş. Gör. Songül Budak DİLER, Biyolog Fatma Funda KAYA ve Biyolog Semir CANIMOĞLU'na teşekkür ederim.

Öğrenimim süresince burs vererek projemizi, maddi yönden destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu-Bilim Adamı Yetiştirme Grubu'na (TÜBİTAK-BAYG) ve yine projemizi maddi yönden destekleyen Ç.Ü. Araştırma Fonu yöneticilerine de teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
KISALTMALAR.....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	9
2.1. Askorbik Asit’le Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	9
2.2. Azodikarbonamid’le Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	18
2.3. Benzol Peroksit.....	18
2.3.1.Benzol Peroksit ile Yapılan Diğer Genotoksisite Çalışmaları.....	18
2.3.2.Benzol Peroksit’in DNA Tek İplik Kırıkları Üzerindeki Etkileri.....	21
2.3.3.Benzol Peroksit’in, Kimyasallar ile Uyarılan Kanserleşmedeki Etkileri.....	23
2.3.3.1.Kanser Oluşumunda Benzol Peroksit’in Tümör Başlatma Aktivitesi.....	25
2.3.3.2.Kimyasallar Tarafından Uyarılan Kanser Oluşumunda Benzol Peroksit’in Tümör Geliştirme Aktivitesi.....	25
2.3.3.3.Kimyasallar Tarafından Uyarılan Kanser Oluşumunda Benzol Peroksit’in Tümör İlerletme Aktivitesi.....	28
2.3.3.4.Benzol Peroksit’in Kimyasallarla Kanser Oluşumundaki Etkilerinin İnaktivasyonu.....	28

2.3.4. Benzol Peroksit'in Hücreler Arası Haberleşmedeki Etkileri.....	31
2.4. Klor ve Klor Dioksit'le Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	31
2.5. Lesitin'le Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	35
2.6. L-Sistein'le Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	35
2.7. L-Sistein Monohidroklorit'le Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	37
2.8. Nitrojen Peroksit (Nitrojen Dioksit)'le Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	38
2.9. Potasyum Bromat.....	40
2.9.1. Potasyum Bromat'la Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	40
2.9.2. Potasyum Bromat'la Yapılan Kanserojenite Çalışmaları.....	46
2.10. Potasyum İyodat'la Yapılan Genotoksisite Çalışmaları	49
2.11. Potasyum Sorbat'la Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	49
2.12. Propiyonik Asit'le Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	51
2.13. Sodyum Benzoat'la Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	52
2.14. Sodyum Metabisülfıt'le Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	52
2.15. Sorbik Asit'le Yapılan Genotoksisite Çalışmaları.....	53
3. MATERYAL VE METOD.....	55
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları.....	55
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	55
3.1.1.1. Benzol Peroksit.....	55
3.1.1.1.(1). Benzol Peroksit'in Kullanım Alanları.....	55
3.1.1.1.(2). Benzol Peroksit'in Kimyasal Parçalanması ve Biyolojik Metabolizması.....	57
3.1.1.1.(3). Benzol Peroksit'in Vücuda Giriş Yolları.....	58
3.1.1.1.(4). Benzol Peroksit'in Canlılara Etkisi.....	58
3.1.1.1.(5). Benzol Peroksit'in Özellikleri (Merck).....	59
3.1.1.2. Mitomycin C (MMC) (Kyowa).....	59
3.1.1.3. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma).....	60
3.1.1.4. Kromozom Medyumı.....	61
3.1.1.5. Kolkisin (Sigma).....	61

3.1.1.6. Hipotonik Eriyik.....	62
3.1.1.7. Fiksatif.....	62
3.1.1.8. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd) (Sigma).....	62
3.1.1.9. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer).....	63
3.1.1.10. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği.....	63
3.1.1.11. Giemsa (Merck).....	63
3.1.1.12. Entellan (Merck).....	64
3.1.1.13. Nitrik Asit (HNO ₃).....	64
3.1.1.14. Cytochalasin B (Sigma).....	64
3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları.....	65
3.1.2.1 Hassas Terazî.....	65
3.1.2.2. Santrifüj.....	65
3.1.2.3. Mikroskop.....	65
3.1.2.4. İnkübatör.....	65
3.2. Lamların Temizlenmesi.....	65
3.3. Sterilizasyon.....	66
3.3.1. BrdUrd Eriyiğinin Sterilizasyonu.....	66
3.3.2. Saf Suyun Sterilizasyonu.....	66
3.4. Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) (Sister Chromatid Exchange= SCE) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) (Chromosomal Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması.....	66
3.4.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....	66
3.4.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması.....	68
3.5. Daimi Preparatlarda Mikroskopik İnceleme.....	69
3.5.1. KKD Sayısının ve Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi =PI) Saptanması.....	69
3.5.1.1. KKD Sayısının Saptanması.....	69
3.5.1.2. Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi = PI) Saptanması.....	70

3.5.2. Kromozom Anormallikleri (KA) ve Mitotik İndeksin (MI)	
Saptanması.....	75
3.5.2.1. Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması.....	75
3.5.2.2. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması.....	76
3.6. Mikronükleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre	
Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması.....	76
3.6.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....	76
3.6.2. Preparatların Boyanması.....	77
3.7. Mikronükleus Preparatlarında Mikroskopik İnceleme.....	77
3.7.1. Mikronükleus Sayısının Saptanması.....	77
3.8. Mikroskopta Fotoğraf Çekme.....	78
3.9. İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....	78
4. BULGULAR.....	80
4.1. Benzol Peroksit'in Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerindeki	
Etkileri.....	80
4.2. Benzol Peroksit'in Kromozom Aberasyonlarının (KA) Oluşumu	
Üzerindeki Etkileri.....	81
4.3. Benzol Peroksit'in DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme	
Üzerindeki Etkileri.....	93
4.4. Benzol Peroksit'in Mikronükleus (MN) Oluşumları	
Üzerindeki Etkileri.....	97
5. TARTIŞMA.....	100
5.1. Benzol Peroksit'in Kardeş Kromatid Değişimleri (KKD)	
ve Kromozom Aberasyonları (KA) Üzerindeki Etkileri.....	100
5.2. Benzol Peroksit'in DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme	
Üzerindeki Etkileri.....	103
5.3. Benzol Peroksit'in Mikronükleus (MN) Oluşumları	
Üzerindeki Etkileri.....	104
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	106
KAYNAKLAR.....	108
ÖZGEÇMİŞ.....	132

KISALTMALAR

B'	:Kromatid Kırığı
B''	:Kromozom Kırığı
BaP	:Benzo(a)pyrene
BrdUrd	:5'-bromo-2'-deoxyuridine
BPO	:Benzol peroksit
CA	:Chromosome Aberration
CuCl	:Bakır klorür
Cyt-B	:Cytochalasin-B
DMBA	:7,12-dimethylbenz[a]anthracene
DMSO	:Dimethyl Sulfoxide
DS	:Disentrik Kromozom
dT	:Deoxytimidin
dU	:Deoxuridine
DNA	:De(z)oksiribonükleik asit
E	:Endoreduplikasyon
EDTA	:Etylenediamine tetraacetic acid
EPR	:Electron Paramagnetic Resonans Spectroscopy
F	:Fragment
FAO	:Food and Agriculture Organisation (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı)
FBS	:Fetal Bovine Serum
G	:Gap
HGPRT	:Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase
HPLC	:High Pressure Liquid Chromatography (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi)
KA	:Kromozomal Aberasyon
KCl	:Potasyum klorür
KD	:Kromatid Değişimi
KKB	:Kardeş Kromatidlerin Birleşmesi

KKD	:Kardeş Kromatid Değişimi
MI	:Mitotik İndeks
MMC	:Mitomycin C
MN	:Mikronükleus
MNNG	:N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
NaCl	:Sodyum klorür
NE	:Normokromatik Eritrosit
NIER	:National Institute of Environmental Research
NTP	:National Toxicology Programme
P	:Poliploidi
PE	:Polikromatik Eritrosit
PI	:Proliferasyon İndeksi
RI	:Replikasyon İndeksi
rpm	:Round (Rotor) Per Minute
SA	:Satellit Assosiasyonu
SCD	:Sister Chromatid Differentiation
SCE	:Sister Chromatid Exchange
SCGE	:Single Cell Gel Electrophoresis (Comet Testi)
SMART	:Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi
SSB	:DNA Single Strand Breaks (DNA Tek İplik Kırıkları)
SSC	:Standart Saline Citrate
T	:Translokasyon
TPA	:12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
UV	:Ultraviole (Morötesi)
WHO	:World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 4.1. Değişik Dozlarda Benzol Peroksit ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Lenfositlerinde Ortalama KKD Sayısı.....	80
Çizelge 4.2. Değişik Dozlarda Benzol Peroksit ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Lenfositlerinde Kromozom Anormallik Çeşitleri, Anormal Hücre Oranı, KA/Hücre.....	82
Çizelge 4.3. Değişik Dozlarda Benzol Peroksit ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Lenfositlerinde Replikasyon İndeksi (RI) ve Mitotik İndeks (MI).....	94
Çizelge 4.4. Değişik Dozlarda Benzol Peroksit ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Lenfositlerinde MN'lu İki Nükleuslu Hücre Yüzdesi.....	97

Şekil 3.1. Benzol Peroksit'in Kimyasal Olarak Parçalaması ve Biyolojik Metabolizması a) Kimyasal Parçalanma b) Biyolojik Parçalanma.....	57
Şekil 3.2. Kardeş Kromatid Değişiminin Olduğu ve Olmadığı Durumun Şematik Olarak Gösterilmesi	70
Şekil 3.3. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin (dU)'in Kimyasal Yapıları.....	71
Şekil 3.4. BrdUrd'nin DNA yapısına Girmesi ile Birinci, İkinci ve Üçüncü Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Ayırt Edilmesinin Şematik Olarak Açıklanması.....	73
Şekil 3.5. Birinci Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Metafaz Kromozomları (x1000).....	74
Şekil 3.6. İkinci Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Metafaz Kromozomları (x1000).....	74
Şekil 3.7. Üçüncü Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Metafaz Kromozomları (x1000).....	75
Şekil 3.8. Sitoplazma Bölünmesinin Engellenmesi Sonucunda Oluşan İki Nükleuslu Hücre (x1000).....	78
Şekil 4.1. Farklı Dozlarda Benzol Peroksit ile 24 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde AH'nin Doza Bağlı Olarak Artışını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.....	83
Şekil 4.2. Farklı Dozlarda Benzol Peroksit ile 24 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde KA/Hücre Oranının Doza Bağlı Oluşan Artışını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.....	83
Şekil 4.3. Farklı Dozlarda Benzol Peroksit ile 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde AH'nin Doza Bağlı Olarak Artışını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.....	84

Şekil 4.4. Farklı Dozlarda Benzol Peroksit ile 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferal Lenfositlerinde KA/Hücre Oranının Doza Bağlı Olarak Artışını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.....	84
Şekil 4.5. Kromatid Kırığı (B') (100 µg/ml benzol peroksit, 24 saatlik muamele, ♂) (x1000).....	85
Şekil 4.6. Kromatid Kırığı (B') (75 µg/ml benzol peroksit, 48 saatlik muamele, ♀) (x1000).....	85
Şekil 4.7. Kromatid Kırığı (B') (50 µg/ml benzol peroksit, 48 saatlik muamele, ♀) (x1000).....	86
Şekil 4.8. Kromatid Kırığı (B') (25 µg/ml benzol peroksit, 48 saatlik muamele, ♂) (x1000).....	86
Şekil 4.9. Kromatid Kırığı (B') (50 µg/ml benzol peroksit, 48 saatlik muamele, ♂) (x1000).....	87
Şekil 4.10. Kromozom Kırığı (B'') (25 µg/ml benzol peroksit, 24 saatlik muamele, ♂) (x1000).....	87
Şekil 4.11. Fragment (F) (25 µg/ml benzol peroksit, 24 saatlik muamele, ♂) (x1000).....	88
Şekil 4.12. Kardeş Kromatid Birleşmesi(KKB) (25 µg/ml benzol peroksit, 48 saatlik muamele, ♂) (x1000).....	88
Şekil 4.13. Disentrik Kromozom (DS) (75 µg/ml benzol peroksit, 24 saatlik muamele, ♂) (x1000).....	89
Şekil 4.14. Translokasyon (T) (a) ve Kromozom Kırığı (B'') (b) (50 µg/ml benzol peroksit, 48 saatlik muamele, ♂) (x1000).....	90
Şekil 4.15. Translokasyon (T) (50 µg/ml benzol peroksit, 24 saatlik muamele, ♂) (x1000).....	90
Şekil 4.16. Quadriradyal Şekilde Kromatid Değişimi (KD) (c) ve Kromozom Kırığı (B'') (b) (25 µg/ml benzol peroksit, 48 saatlik muamele, ♂) (x1000).....	91
Şekil 4.17. Poliploidi (P) (25 µg/ml benzol peroksit, 24 saatlik muamele, ♂) (x1000).....	92

Şekil 4.18. Endoreduplikasyon (E); Kromozom Kırığı (b) ve Kromatid Kırığı (d) (50 µg/ml benzol peroksit, 48 saatlik muamele, ♂) (x1000).....	93
Şekil 4.19. Farklı Dozlarda Benzol Peroksit ile 24 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferel Lenfositlerinde RI'nin Doza Bağlı Olarak Azalmasını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.....	95
Şekil 4.20. Farklı Dozlarda Benzol Peroksit ile 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferel Lenfositlerinde RI'nin Doza Bağlı Olarak Azalmasını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.....	95
Şekil 4.21. Farklı Dozlarda Benzol Peroksit ile 24 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferel Lenfositlerinde MI'in Doza Bağlı Olarak Azalmasını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.....	96
Şekil 4.22. Farklı Dozlarda Benzol Peroksit ile 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferel Lenfositlerinde MI'in Doza Bağlı Olarak Azalmasını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.....	96
Şekil 4.23. Farklı Dozlarda Benzol Peroksit ile 24 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferel Lenfositlerinde MN'lu Hücre Oranının Doza Bağlı Olarak Artışını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.....	98
Şekil 4.24. Mikronükleus taşıyan iki nükleuslu hücre (50 µg/ml benzol peroksit, 48 saatlik muamele, ♀) (x1000).....	98
Şekil 4.25. Büyük bir mikronükleusa sahip iki nükleuslu hücre (100 µg/ml benzol peroksit, 48 saatlik muamele, ♂) (x1000).....	99
Şekil 4.26. Mikronükleus taşıyan iki nükleuslu hücre (50 µg/ml benzol peroksit, 48 saatlik muamele, ♀) (x1000).....	99

1. GİRİŞ

Çağdaş teknoloji, insanlara sunduğu kolaylıkların yanı sıra, büyük bir sorun olan çevre kirliliğini de beraberinde getirmekte ve bu bütün canlıları olumsuz yönde etkilemektedir. Doğadaki tüm canlılar günlük yaşamda sık sık doğal ya da yapay kimyasal maddelerle yüz yüze gelmektedirler. Gıdalarda bulunan doğal kimyasallar, pestisitler, gıda katkı maddeleri, saç boyaları, kozmetik ve ilaç gibi yapay kimyasallar, sigara dumanı, su ve havadaki kirleticiler gibi karmaşık bileşikler bunlardan birkaçıdır.

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan benzol peroksit (BPO) plastik endüstrisinde, boya endüstrisinde, gıda endüstrisinde, ilaç endüstrisinde, inşaat endüstrisinde, kozmetik sanayide çok yaygın kullanım alanına sahip olan bir maddedir. Bu nedenle yeryüzündeki tüm canlılar bir şekilde bu maddeye maruz kalmaktadırlar. Benzol peroksit alkalın solüsyondaki hidrojen peroksit (hydrogen peroxide) ile benzol klorid'in (benzoyl chloride) kimyasal reaksiyonu ile kapalı reaktörlerde üretilmektedir. Bu nedenle üretim faaliyetleri sırasında paketleme işlemlerinde benzol peroksit'le temas oldukça sınırlıdır. Benzol peroksitle ilgili diğer endüstri dallarında çalışan insanlar, deri yoluyla veya nefes alıp verme yoluyla bu maddeyle temas etmektedirler. Ancak mesleki maruz kalma oldukça sınırlı olmaktadır. İnsanları benzol peroksit ile karşı karşıya getiren asıl etken, bu maddenin unları beyazlatmak amacıyla katkı maddesi olarak kullanılmasıdır. Ekmek yapımında, unun bileşimi ve özelliklerinden kaynaklanan bazı kusurlar ve eksiklikleri gidererek kalitenin iyileştirilmesi amacıyla çeşitli katkı maddeleri yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Una ilave edilen katkı maddeleri özellik ve görevlerine göre şu şekilde gruplandırılabilir:

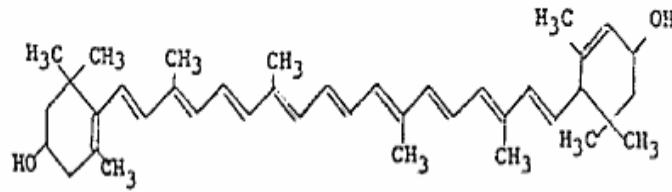
Yükseltgen Maddeler

Bu grupta yer alan maddeler değirmenlerde yeni öğütölmüş unun karakteristik sarımsı rengini beyazlatmak ya da unda daha düzgün bir protein yapısı oluşturmak amacıyla kullanılırlar.

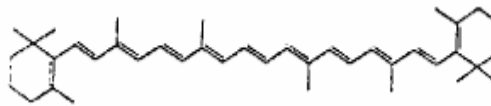
a) Un Ağartma Maddeleri

Undan yapılan gıdaların önemli bir bölümünde görmeye alışılan renk beyazdır. Ancak yeni öğütülmüş buğday, sarımsı bir pigmentasyon içerir. Bu durum ekmeklerde sarımsı bir renklenmeye yol açmaktadır. Undaki bu renk, genel olarak karotenoid adı verilen ve yapıları birbirine benzeyen bileşiklerden meydana gelmektedir. Bu grubun en önemli üyelerinden birisi aşağıda moleküler yapısı gösterilen ksantofil'dir. Bu ve benzeri yapılar genelde karotenler olarak isimlendirilir ve provitamin A aktivitesine sahiptirler.

Ancak undaki renklenmeye sebep olan karotenoid pigmentlerinin çoğu, gerçek karotenlerden değildir ve buna bağlı olarak da vitamin A aktivitesine sahip değildirler. Bu nedenle, unun beyazlatılması esnasında yapılan işlemlerle bu yapıların uzaklaştırılması unun besin değerini azaltmayacaktır.



Ksantofil



Beta Karoten

Yukarıdaki şekilde görülen çifte bağlar aynı zamanda bu moleküllerin renklerinden sorumludur. Bu çifte bağlarla etkileşebilen bir kimyasal madde, molekülün konfigürasyonunu değiştirecek ve bu sayede renk uzaklaştırılmış olacaktır (Duydu, 2005). Bu amaçla kullanılan maddeler arasında aseton peroksit, azodikarbonamid, benzoil peroksit, klor, klor dioksit, nitrojen peroksit (nitrojen dioksit) ve potasyum bromat yer almaktadır (www.naturalovens.com; www.bakingbusiness.com; www.ourcivilisation.com).

b) Un Olgunlaştırıcılar

Unda en önemli protein olan gluten'in yapısı ve özellikleri unun kalitesini belirlemektedir. Gluten'in yapısını oluşturan yüksek molekül ağırlığındaki proteinlerin ve düşük molekül ağırlığındaki proteinlerin ayrı ayrı birbirleriyle birleşmelerini sağlamak için düşük molekül ağırlığındaki proteinlerin kuvvetli bir yükseltgen madde ile yükseltgenerek tutulmaları gerekmektedir. Böylece yüksek molekül ağırlığındaki proteinler ile düşük molekül ağırlığındaki proteinlerin birbirleriyle birleşerek daha düzgün bir protein yapısı oluşturmaları sağlanmaktadır. Bu yapı oluştuğunda un, olgunlaşmış ve istenen özellikleri bünyesinde toplamış bulunmaktadır. Bu amaçla kullanılan maddeler arasında askorbik asit, aseton peroksit, kalsiyum bromat, kalsiyum iyodat, kalsiyum peroksit ve potasyum iyodat yer almaktadır (www.naturalovens.com; www.bakingbusiness.com).

Yüzey Aktif Maddeler

Hem hidrofilik hem de hidrofobik özellikteki grupları bir arada bulunduran yüzey aktif maddeler ekmek yapımında etki mekanizmaları bakımından hamur güçlendiriciler ve bayatlamayı geciktiriciler olarak iki ana grup altında incelenebilmektedir.

Günümüzde hamur güçlendirici olarak kullanılan başlıca yüzey aktif maddeler mono ve digliseridlerin diasetil tartarik asit esterleri, sodyum steoril laktilat, sodyum steoril fumarat, kalsiyum steoril laktilat, etoksile mono ve digliserid (ethoxylated mono and diglycerides), süksinile monogliserid'lerdir (succinylated monoglycerides).

Bayatlamayı geciktirmek amacıyla kullanılan yüzey aktif maddeler arasında yağ asitlerinin mono ve digliseridleri, gliserol monostearat, sorbitan monostearat, polisorbat 60, polisorbat 65, polisorbat 80 ve mono propilen glikol yer almaktadır.

Lesitin ise hem hamur güçlendirmek hem de bayatlamayı geciktirmek amacıyla kullanılan bir yüzey aktif maddedir (Özer, 2003; www.naturalovens.com; www.bakingbusiness.com).

İndirgen Maddeler

İndirgen maddeler unda yer alan protein molekülleri ararsındaki disülfid bağlarını parçalayarak serbest sülfidril grubu oluşturan ve hamurun gelişimini hızlandırmak amacıyla kullanılan maddelerdir. Bu maddeler arasında L-sistein, L-sistein monohidroklorit ve sodyum metabisülfid yer almaktadır (www.ekmekdunyasi.com; www.naturalovens.com; www.bakingbusiness.com).

Koruyucu Maddeler

Koruyucu maddeler, ekmeğin küflenmesine ve yapısında değişikliğe neden olan bakterilere karşı kullanılan maddelerdir. Bu amaçla en fazla kullanılan kimyasallar kalsiyum propiyonat, sodyum propiyonat ve propiyonik asit'tir. Bunların dışında potasyum sorbat, sodyum benzoat, sodyum diasetat, sorboil palmitat, sorbik asit ve propil paraben unlara ilave edilen ve koruyucu olarak kullanılan gıda katkı maddeleri arasında yer almaktadır (www.ekmekdunyasi.com; www.naturalovens.com; www.bakingbusiness.com).

Enzimler

Ekmek yapımında katkı maddesi olarak çeşitli enzimler kullanılmakla birlikte, bunlardan en yaygın olanları α -amilaz, β -amilaz ve amiloglikozidaz enzimleridir. Ancak özellikle son yıllarda sellülotik ve lipolitik enzim preparatları da ekmek katkıları arasında kullanılmaya başlamıştır (Özer, 2003).

Bu çalışmada test maddesi olarak belirlenen benzol peroksit unları beyazlatmak amacıyla en yaygın olarak kullanılan maddedir. Daha önce bahsedildiği gibi unda istenmeyen renklenmeyi gidermek için karotenoidlerin yapısında renklenmeye sebep olan çifte bağları ortadan kaldırmak gerekmektedir. Benzol peroksit bu çifte bağlar üzerinde bir oksijen köprüsü meydana getirmekte ve sonuçta ya bu bağların kopmasına ya da çifte bağların tekli bağlara dönüşmesine neden olmaktadır. Her iki durumda da istenmeyen renklenmeye sebep olan moleküller

özelliklerini kaybetmiş olmaktadır. Bu arada benzol peroksit'in bir kısmı bu reaksiyonu gerçekleştirirken benzoik asit'e dönüşmektedir (Duydu, 2005). Bu şekilde benzol peroksit ekmek tüketimi ile tüm insanları etkilemektedir.

İnsanların vücuduna doğrudan ya da dolaylı yoldan giren kimyasalların kanserojenik ve genotoksik risklerinin belirlenmesi gerekir. Kimyasal maddelerin kanserojenik risklerini ortaya çıkarmak için en akılcı yaklaşım, deney hayvanlarında tümör oluşumunun uyarılmasıdır. Ancak bu testlerin sonuçlanması uzun zaman almakta ve maliyetleri yüksek olmaktadır. Bu nedenle araştırmacılar kanserojenite taramalarına esas olabilecek kısa zamanda sonuç verebilen ve düşük maliyetli birçok kısa zamanlı genotoksisite test sistemleri geliştirmişlerdir. Bu testler, kimyasal maddelerin genotoksik risklerini belirlemeye yöneliktir. Kısa zamanlı test sistemlerinden en yaygın olarak kullanılanlar; kardeş kromatid değişimi (KKD) (Sister Chromatid Exchange = SCE) ve kromozom aberasyonu (KA) (Chromosomal Aberration = CA) testleridir. Bu testler, Perry ve Evans (1975) tarafından mutajen ve kanserojenlerin KKD ve KA'yı uyardığını saptamalarından sonra mutajen ve kanserojenlerin belirlenmesinde kullanılmaya başlanmıştır. Carrano ve ark. (1978), mutajen ve kanserojenlerin toksik dozların altındaki dozlarda meydana getirdikleri genetik hasarların kısa zamanda, hassas bir şekilde ve kantitatif olarak gösterilmesinin KKD ve KA analizi ile mümkün olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca aynı araştırmacılar bir maddenin mutasyon meydana getirmesi ile KKD oluşumunun uyarılması arasında lineer bir ilişki olduğunu da belirtmişlerdir. Görüldüğü gibi bir maddenin mutajen ve kanserojen olup olmadığının belirlenmesi, bu maddenin KKD ve KA'yı uyarıp uyardığının saptanması ile mümkün olabilmektedir.

Genotoksisitenin belirlenmesinde kullanılan bir başka metod mikronükleus (MN) testidir. Mikronükleus hücre bölünmesinin anafaz evresinde kromozomların geri kalmasından ya da asentrik kromozom fragmentlerinden köken aldığı gibi multipolar anafaz ve telofaz da mikronükleus oluşumuna sebep olmaktadır (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 1995). Rothfuss ve ark. (2000), göğüs kanserinin oluşumundan sorumlu olan gendeki (BRCA1) mutasyonların sitogenetik olarak belirlenmesinde MN testinin güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada BRCA1 geni mutasyona uğramış kişilerin lenfositlerinin gamma (γ) ışınları ile

ışınlandırılmasından sonra MN'lu binükleer hücre oranının arttığı saptanmıştır. Uzun zamandan beri uygulanan sitogenetik bir teknik olan MN testi mitoz bölünme geçiren tüm bitki, hayvan ve insan hücrelerinde, fiziksel ve kimyasal ajanların meydana getirdiği genotoksik etkilerin belirlenmesinde güvenli olarak kullanılmaktadır.

Benzol peroksit'in genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla farklı canlılarda yapılan birçok kısa süreli genotoksisite çalışması bulunmaktadır. Benzol peroksit ile ilgili genotoksisite çalışmalarından birisi Epstein ve ark. (1972) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada maddenin genotoksik aktiviteye sahip olup olmadığı intraperitoneal (i.p.) enjeksiyon yöntemiyle 54 ve 62 mg/kg benzol peroksit alan ICR/Ha Swiss farelerinde, *in vivo* dominant letal mutasyon yöntemi ile araştırılmış ve benzol peroksit'in kontrol seviyesinde dominant letal mutasyona sebep olduğu gösterilmiştir. Epstein ve ark.'nın benzol peroksit'in üreme hücrelerine bir zararının olmadığını gösteren bu çalışması ile uygunluk gösteren bir başka çalışma Ishidate ve ark. (1984) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada araştırmacılar, maksimum 0.2 mg/ml dozundaki benzol peroksit ile *in vitro* 24 ve 48 saat muamele edilen Chinese hamster fibroblast hücrelerinde kromozomal anormallikleri saptamak üzere deney düzenlemişler ve metabolik aktivasyonun olmadığı ortamda negatif sonuç bildirmişlerdir.

Benzol peroksit'in KKD'yi uyarmada zayıf pozitif etkiye sahip olduğunu gösteren iki çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birincisinde benzol peroksit'in Chinese hamster yumurtalık hücre kültüründe, karaciğer S9 mix varlığında KKD'yi doza bağlı olarak iki kat kadar arttırdığı saptanmıştır. Ancak bu etkinin karaciğer S9 mix fraksiyonu yokken gözlenmediği belirtilmiş ve benzol peroksit'in KKD'yi uyarmada etkisiz olduğu sonucuna varılmıştır (Jarventaus ve ark. 1984; Binder ve ark. 1995'ten). Diğer çalışmada ise Chinese hamster V79 hücrelerinde benzol peroksit etkisiyle KKD'de kontrole göre yaklaşık 1.2 kat kadar küçük bir artışın meydana geldiği bildirilmiştir (Swierenga ve ark. 1987; Binder ve ark. 1995'ten).

Başka bir çalışmada benzol peroksit'in genotoksik etkilerini belirlemek için ICR (SPF) farelerine 50, 100, 200 mg/kg benzol peroksit i.p. yoldan verilmiş ve mikronükleus (MN) oluşturmadaki etkileri araştırılmıştır. Bu çalışma sonucunda

benzol peroksit'in MN testinde negatif sonuç verdiği saptanmıştır (National Institute of Environmental Research (NIER), 2001: SIDnitial Assessment Report, 2002'den).

Benzol peroksit'in mutajenik etkilerini belirlemek için birçok araştırmacı *Salmonella*/Ames (Mikrozom) test yöntemini kullanmıştır. *Salmonella typhimurium*'un TA1535, TA1537 ve TA1538 suşları kullanılarak yapılan bir çalışmada fare, sıçan ve maymunların akciğer, karaciğer ve testislerinden elde edilen S9 mix'li ortamda veya S9 mix yokken benzol peroksit'in mutajenik etkileri araştırılmış ve bu maddenin negatif sonuç verdiği bildirilmiştir (Litton Bionetics, 1975: Binder ve ark. 1995'ten). Benzer şekilde sıçan karaciğer S9 mix'li ortamda TA98 ve TA100 suşları ile yapılan bir başka çalışmada da benzol peroksit'in negatif sonuç verdiği belirtilmiştir (Yamaguchi ve Yamashita, 1980: Binder ve ark. 1995'ten). TA97, TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538 ve reaktif oksijen türlerine hassas TA102 suşları kullanılarak yapılan bir başka çalışmada benzol peroksit'in etkisiz olduğu bildirilmiştir (DeFlora ve ark. 1984: Binder ve ark. 1995'ten). Ishidate ve ark. (1984), yaptıkları deneyde benzol peroksit'in TA98, TA100, TA1535 ve TA1537 suşlarında (+/-sıçan karaciğer S9 mix) negatif sonuç verdiğini belirlemişlerdir. Benzol peroksit'in (0.001, 0.005, 0.01, 0.05 ve 0.1 µg/petri) mutajenik etkilerini belirlemek için TA97 ve TA102 suşları kullanılmış ve hem metabolik aktivasyonun olduğu hem de olmadığı ortamda negatif sonuç verdiği ayrıca metabolik aktivasyonun olmadığı durumda 0.05 ve 0.1 µg/petri konsantrasyonlarındaki benzol peroksit'in sitotoksiste oluşturduğu belirtilmiştir (Fujita ve Sasaki, 1987: SIDnitial Assessment Report, 2002'den). Benzol peroksit'in negatif sonuç verdiğini belirten bu çalışmaların yanında pozitif sonuç verdiğini belirten bir çalışma Matula ve ark. tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada benzol peroksit'in sıçan karaciğer S9 mix'in olduğu ya da olmadığı ortamda TA98, TA100, TA1535 ve TA102 suşlarında negatif sonuç verirken TA97 suşunda S9 mix yokken zayıf mutajenik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bunların dışında, bu çalışmalarda emülsiyon veya lipozom olarak kullanılan ticari bir benzol peroksit losyonunun sıçan karaciğer S9 mix yokluğunda TA97 ve TA1537 suşlarında pozitif sonuç verdiği belirtilmiştir. Ayrıca daha önce yapılan çalışmalarda negatif sonuçların elde edilmesinin, aktif oksijen türlerini ortadan kaldıran dimethyl sulfoxide'in (DMSO)

çözücü olarak kullanılmasına bağlı olduğu belirtilmiştir. (Matula ve ark. 1987: Binder ve ark. 1995'ten). Ancak U.S. National Toxicology Programme (NTP) adına yapılan çalışmada dişi Sprague-Dawley sıçanları ve Syrian hamsterlerinden elde edilen % 10 ve % 30 karaciğer S9 mix'in olduğu ve olmadığı ortamda TA97, TA98, TA100 ve TA1535 suşlarında DMSO kadar aseton içinde çözünmüş benzol peroksit'in de negatif sonuç verdiği belirtilmiştir (Zeiger ve ark. 1988: Binder ve ark. 1995'ten). Daha yakın zamanlarda Dillon ve ark. (1998), çeşitli aldehit ve peroksitlerin mutajenik etkilerini belirlemek amacıyla F334 sıçanları ve B6C3F1 farelerinin karaciğerlerinden hazırlanan S9 mix'in olduğu ve olmadığı ortamda TA97, TA100, TA102 ve TA104 suşlarını kullanarak deney düzenlemişler ve bu koşullar altında 1-100 µg/petri benzol peroksit'in mutajenik olmadığını belirtmişlerdir. *S. typhimurium*'un TA98, TA100, TA1535 ve TA1537 suşları kullanılarak yapılan deneylerde, dişi Sprague Dawley sıçanlarından elde edilen S9 mix'in olduğu ya da olmadığı ortamda 0.274, 0.74, 2.22, 6.67, 20 ve 60 µg/petri benzol peroksit'in negatif sonuç verdiği bildirilmiştir (NIER, 2001: SIDnitial Assessment Report, 2002'den). Sultana ve ark. (2004), sıçangillere ait deride benzol peroksit etkisiyle ortaya çıkan tümör gelişimine, oksidatif strese ve mutajeniteye karşı 13-sis retinoik asit'in etkilerini araştırdıkları deneyler sırasında benzol peroksit'in *S. typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşlarında (+S9 mix) mutasyonları uyardığını belirlemişlerdir.

Görüldüğü gibi benzol peroksit'in insan periferel lenfositlerinde genotoksik etkileri araştırılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, benzol peroksit'in genotoksik etkisinin olup olmadığını insan periferel lenfositlerinde *in vitro* kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom aberasyonu (KA) ve mikronükleus (MN) testleri ile araştırmaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bu araştırma ile ilgili olarak, una ilave edilen çeşitli katkı maddeleri ile yapılan genotoksisite çalışmaları şu şekilde özetlenebilir:

2.1. Askorbik Asit'le Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Askorbik asit unları olgunlaştırmak amacıyla ilave edilen oksidan maddelerdendir.

Inoue ve ark. (1985), insan lenfositlerinde KKD testi ile nitrososimetidin'in etkilerini araştırmışlar ve bu maddenin KKD'yi artırma aktivitesine sahip olduğunu ve askorbik asit'in bu artışı etkilemediğini belirlemişlerdir. Weitberg ve Weitzman (1985), Chinese hamster yumurtalık hücrelerinde oksijen radikalleri üreten enzimatik sistemin (ksantin oksidaz+hipoksantin) KKD'yi arttırdığını belirtmişlerdir. Bu sisteme askorbik asit'in dahil edilmesiyle birlikte bazı durumlarda (0.1 mM'den daha az konsantrasyonlarda) KKD oluşumunun azalması sonucu koruyucu aktivite gözlenirken bazı durumlarda oksijen radikallerinin oluşumunun artması sonucunda KKD'de artış meydana geldiğini belirtmişlerdir. Krishna ve ark. (1986), askorbik asit'in farelerin dalak ve kemik iliği hücrelerinde MMC ve siklofosamid tarafından uyarılan KKD üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Yapılan çalışmalarda askorbik asit'in KKD'yi arttırmadığını, her iki hücre tipinde de *in vivo/in vitro* MMC ve siklofosamid aracılığı ile artan KKD'yi azalttığını saptamışlardır. Weitberg (1987), memeli hücre kültüründe askorbik asit tarafından KKD uyarılmasının mekanizmasını araştırmıştır. Bu çalışmada Chinese hamster yumurtalık hücreleri, oksijen radikalleri üreten enzimatik sisteme (ksantin oksidaz+hipoksantin) maruz bırakıldığında KKD sayısında artışın olduğu, 0.1 mM veya daha fazla askorbik asit ilavesinin KKD'yi daha çok arttırdığı, 100 µl/ml süperoksit dismutaz ve 220 µl/ml katalaz ilavesinin ksantin oksidaz, hipoksantin ve askorbik asit tarafından uyarılan KKD'yi azalttığı belirtilmiştir. Araştırmacı bu çalışmalar sonucunda askorbik asit'in oksijen radikalleri aracılığıyla genotoksisite oluşturabileceğini belirtmiştir. Lialiaris ve ark. (1987), insan lenfosit kültüründe 0.02 ve 0.2 mM askorbik asit'in tiyotepa ve L-etionin'in

uyardığı KKD'ye karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu ancak 2 mM askorbik asit'in bu maddeler tarafından KKD uyarılmasını arttırdığını belirtmişlerdir. Ayrıca tiyotepa ve L-etionin aracılığıyla hücre bölünmelerinde gecikmelerin meydana geldiği ve mitotik indeksin düştüğü; 2 mM askorbik asit'in bu parametreleri olumsuz etkilediği ancak diğer iki dozun düzenlediği belirtilmiş ve biyolojik sistemlerde askorbik asit'in doza bağlı olarak genotoksisiteye sebep olabileceği veya genotoksisiteyi önleyebileceği sonucuna varılmıştır. Vogel ve Spielmann (1989), askorbik asit'in tek başına ya da siklofosfamid ile kombine durumda genotoksik ve embriyöletal etkilerini belirlemek için hamile farelerde KKD ve KA testlerini ve sitotoksik etkiyi belirlemek için proliferasyon testini kullanmışlardır. Çalışmalarda askorbik asit'in tek başına embriyotoksik, sitotoksik ve genotoksik aktivite göstermediğini saptamışlardır. Ayrıca anormal metafaz oluşumunu % 50, KKD'yi % 100 arttıran ve hücre proliferasyonunu kuvvetli bir şekilde ortadan kaldıran 10 mg/kg siklofosfamid ile 25-1.600 mg/kg askorbik asit'in kombine uygulanmalarının KKD ve hücre proliferasyonunu değiştirmedığını ancak anormal metafazları azalttığını saptamışlardır. Ayrıca 200 mg/kg askorbik asit'in 40 mg/kg siklofosfamid ile birlikte uygulanması durumunda da antiklastojen aktivitenin görüldüğünü ve embriyo letalitesinin ortadan kalkmasına yardımcı olduğunu belirlemişlerdir. Rivas-Olmedo ve ark. (1992), mitomisin C'nin (MMC) genotoksik aktivitesine karşı askorbik asit'in düzenleyici fonksiyonunu *in vivo* hücre proliferasyon kinetiği ve KKD testi ile farelerde araştırmışlardır. 2 mg/kg MMC alan farelere 3, 5 ve 7 mg/kg askorbik asit verilmesi durumunda her üç dozda MMC'nin uyardığı KKD'nin kuvvetli bir şekilde engellendiği (sırasıyla % 52.30, % 54.61 ve % 70.02) saptanmıştır. Ayrıca çalışmada, MMC ile birlikte uygulanan askorbik asit'in hücre proliferasyonunu hafif derecede düşürdüğü saptanmıştır. Yuan ve Zhang (1992), *Hordeum vulgare*'de (arpa) kardeş kromatid değişimleri ve kardeş kromatid farklılaşması üzerine etki eden faktörleri araştırmışlardır. Araştırmacılar askorbik asit, MMC, adriyamisin ve maleik hidrazin gibi maddelerin serbest radikaller üreterek *Hordeum vulgare*'de KKD'yi uyardığını bildirmişlerdir. Ayrıca sülfidril grubu içeren sistein ve glutatyon gibi maddelerin adı geçen maddeler tarafından uyarılan KKD'yi kısmen ya da tamamen engellediğini bildirmişlerdir. Hoda ve Sinha (1993),

organofosforlu pestisit olan rogor'un genotoksik etkilerini soğan kök hücrelerinde mitotik indeks testi, farelerde mayotik indeks ve KA testi ve *Drosophila*'da letal mutasyon testi ile araştırmışlardır. Çalışmada bu pestisidin mitotik ve mayotik inhibisyonlara neden olduğu, klastojenik aktivite gösterdiği ve letal mutasyonları uyardığı saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada askorbik asit'in rogor'un genotoksik etkilerini düzenleme aktivitesi araştırılmış ve pozitif sonuç elde edilmiştir. Bobyleva ve ark. (1993), KA ve KKD testlerini kullanarak askorbik asit'in, molibden'in genotoksisitesi üzerindeki etkilerini molibden işletmesinde çalışan 5 işçide araştırmışlar ve askorbik asit'in molibden tarafından uyarılan kromozom yapı değişikliklerini azalttığını belirlemişlerdir. Tyrsina ve ark. (1994), askorbik asit ve türevlerinin antimutajenik aktivitelerindeki mekanizmayı açıklamak amacıyla düzenledikleri Ames testinde bu maddelerin TA100 suşunda N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidin'in (MNNG) uyardığı mutajeniteyi ortadan kaldırdıklarını belirlemişlerdir. Foltinova ve ark. (1994), tek hücreli flagellat *Euglena gracilis*'te askorbik asit, alfa-tokoferol (vit E), klorofillin ve sodyum selenit'in, MNNG ve furadantin'in genotoksik etkilerini önemli derecede azalttıklarını belirlemişlerdir. Ayrıca bu maddelerin *S. typhimurium*'un TA97, TA100 ve TA102 suşlarında da antimutajenik etki gösterdiği ancak klorofillin'in TA102 suşunda etkili olmadığını belirtmişlerdir. Surh ve ark. (1994), 5-sulfoksimetilfurfural'ın *S. typhimurium*'un TA100 suşunda doza bağlı olarak mutasyon uyardığını ve ortama eklenen askorbik asit'in bu mutasyonları önemli derecede ortadan kaldırdığını bildirmişlerdir. Anderson ve ark. (1995), bleomisin üzerine askorbik asit ve vit E'nin etkisini araştırmak için *S. typhimurium* bakteriyel mutasyon testi, insan periferall lenfositlerinde KA testi ve fare kemik iliği hücrelerinde MN testini kullanmışlardır. Askorbik asit'in bakteriyel mutasyon testinde koruyucu aktivite göstermemekle birlikte insan periferall lenfositlerinde kromozom hasarlarını ve fare kemik iliği hücrelerinde MN oluşumunu ortadan kaldırarak koruyucu aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Cozzi ve ark. (1997), Chinese hamster yumurtalık hücre kültüründe *in vitro* hidrojen peroksit ve bleomisin tarafından uyarılan hasarlara karşı askorbik asit ve beta-karoten'in etkilerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada her iki vitamininde hidrojen peroksit'in uyardığı KKD'yi azalttığı ancak hidrojen peroksit

ve bleomisin tarafından uyarılan kromozomal anormallikleri arttırdıkları saptanmıştır. Morales-Ramirez ve ark. (1998), farelerde 100 mg/kg askorbik asit'in gama ışınından önce ya da sonra verilmesinin, 0.63 Gy veya 0.45 Gy gama ışınları tarafından uyarılan KKD'yi çok fazla azaltmadığını saptamışlar ve askorbik asit'in çok hafif bir radyasyon koruyucu potansiyele sahip olduğunu belirtmişlerdir. Gentile ve ark. (1998), çok geniş bir şekilde kanser tedavisinde kullanılan siklofosfamid, bleomisin, doksorubisin, sisplastin'in mutajenik aktivitelerini askorbik asit, klorofillin ve catechin gibi maddelerin varlığında ve yokluğunda Ames testi ile araştırmışlardır. Bu çalışmalarda askorbik asit'in sisplastin'in genotoksik etkisine karşı çok fazla, bleomisin ve doksorubisin'inkine karşı daha az etkili olduğunu, siklofosfamid'inkine karşı ise etkili olmadığını saptamışlardır. Konopacka ve ark. (1998), farelerde gama ışınlarının klastojenik etkisine karşı askorbik asit, vit E ve beta-karoten'in düzenleyici fonksiyonunu araştırmışlardır. Çalışmada klastojenik aktivitenin belirlenmesi için MN testi kullanılmış ve vitaminler, 2 Gy gama ışını ile ışınlandırmadan hemen sonra veya önce, oral yoldan 5 gün uygulanmıştır. Askorbik asit'in konsantrasyona bağlı olarak radyasyonun klastojenik aktivitesini arttırdığı (400 mg/kg) ya da azalttığı (50-100 mg/kg) belirlenmiştir. Giri ve ark. (1998), Swiss albino farelerde MN, KA ve sperm başı anormallikleri testleri ile sisplastin'in tek başına ve askorbik asit ile kombine halde uygulanması durumunda ortaya çıkan etkilerini araştırmışlardır. Askorbik asitle birlikte uygulanmaları durumunda sisplastin'in tek başına uygulanması durumuna göre tüm parametrelerde önemli ölçüde azalma meydana geldiğini saptayan araştırmacılar askorbik asit'in sisplastin tarafından uyarılan mutajeniteye karşı koruyucu bir rol oynadığını belirtmişlerdir. Edenharter ve ark. (1998), askorbik asit'inde içinde yer aldığı birkaç vitaminin 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2) ve siklofosfamid üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla insan periferik lenfositlerinde KKD testini kullanmışlardır. Askorbik asit'in hem test maddeleriyle aynı anda hem de test maddelerinden önce uygulandığını, her iki durumda da Trp-P-2'ye karşı etkisizken siklofosfamid'in uyardığı KKD'yi arttırdığını saptamışlardır. Askorbik asit'in test maddelerinden sonra uygulanması durumunda Trp-P-2 tarafından KKD uyarılmasını azalttığını saptamışlardır. Vijayalaxmi ve Venu (1999), fare kemik iliğinde

siklofosfamid, mitomisin C (MMC) ve bleomisin hidroklorit tarafından uyarılan MN oluşumu üzerine askorbik asit'in etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmalarda 10, 30 ve 60 mg/kg askorbik asit'in 50 mg/kg siklofosfamid ve 20 mg/kg bleomisin hidroklorit ile 24 saatlik muamelede oluşturulan MN'a karşı koruyucu aktivite gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca 4 mg/kg MMC'nin oluşturduğu MN'a karşı askorbik asit'in koruyucu aktivitesinin sadece en yüksek dozda ortaya çıktığı belirtilmiştir. Lu ve ark. (1999), fare lenfosit L5178Y ve insan lenfoblastosit WTK1 hücre hattını kullanarak askorbik asit ve klorofil'in bakır ve sodyum tuzlarının, MMC tarafından oluşturulan mutajenitenin ortadan kaldırılmasındaki etkilerini *in vitro* MN testi ile araştırmışlardır. Araştırmacılar her iki hücre hattında da askorbik asit ve klorofil'in MMC ile MN uyarılmasını arttırmadığını ve askorbik asit'in MMC'den önce veya MMC ile eş zamanlı uygulanmasının MN oluşumunun azaltılmasında oldukça etkili olduğunu belirlemişlerdir. Cecchi ve Takahashi (1999), sigara içen ve içmeyen insanların lenfosit kültüründe bleomisin tarafından DNA hasarlarının uyarılmasını ve askorbik asit'in düzenleyici rolünü araştırmışlardır. Bu çalışmada lenfosit kültürüne hücre döngüsünün G2 fazında 20 µg/ml bleomisin ile 100, 200 ve 400 µg/ml askorbik asit'in eş zamanlı uygulandığı belirtilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda sigara içen ve içmeyenler arasında bleomisin tarafından oluşturulan mutajenik etki yönünden istatistiksel bakımdan önemli bir fark olmadığı saptanmıştır. Ayrıca bleomisin ile uyarılan kromozomal anormallik frekansını üzerine askorbik asit'in önemli bir etkisinin olmadığı da belirtilmiştir. Antunes ve Takahashi (1999), doksorubisin tarafından uyarılan kromozom anormallikleri üzerine askorbik asit'in etkilerini araştırmak üzere insan periferik lenfositlerinde *in vitro* KA testini kullanmışlar ve 1.000 µg/ml dozu hariç askorbik asit'in klastojen etkiye sahip olmadığını, 100 ve 200 µg/ml askorbik asit'in doksorubisin ile aynı zamanda, doksorubisinden önce veya sonra uygulanması durumunda kromozomal anormallikleri önemli ölçüde azalttığını ve 500 ve 1.000 µg/ml konsantrasyonlarda aynı koruyucu aktiviteyi göstermediğini ve sitotoksik olduğunu belirlemişlerdir. Cabrera (2000), altı mutajen üzerine beş antimutajenin antigenotoksik etkilerini microscreen prophage-induction testi, *Tradescantia* (Telgraf çiçeği) MN testi ve Ames testi ile araştırmıştır. Araştırmacı mutajen olarak 2-aminoantrasen, benzopiren,

2-nitrofloren, toksafen, diklorvos ve nitrofen'i; antimutajen olarak klorofillin, beta-karoten, vit A, C ve E'yi belirlemiştir. Bu çalışmada microscreen prophage-induction testinde askorbik asit'in 2-aminoantresen, benzopiren, 2-nitrofloren ve nitrofen'in etkilerini azalttığını belirlemiştir. Alves ve ark. (2000), *Penicillium*, *Aspergillus* ve *Byssoschlamys*'in bazı türleri tarafından üretilen bir mikotoksin olan patulin'in genotoksik etkisini insan lenfositlerinde MN testi ve Chinese hamster V79 hücrelerinde KA testi ile araştırmışlar ve her iki testte de patulin'in DNA hasarlarını uyardığını belirlemişlerdir. Aynı çalışmalarda 0.8 µM patulin'in neden olduğu klastojen etkinin 80 µM askorbik asit tarafından tamamen ortadan kaldırıldığı belirlenmiştir. Fahmy ve Aly (2000), fare kemik iliğinde *in vivo* KKD ve MN uyarılması ve hem somatik hem de üreme hücrelerinde kromozom aberasyonları üzerine kadmiyum klorit'in etkilerini araştırmıştır. İ.p. yoldan farelere verilen 1.9, 5.7 ve 7.6 mg/kg kadmiyum klorit'in doza bağlı olarak MN oluşumunu uyardığı, uygulanan en düşük dozun KKD oluşumunu etkilemediği ancak diğer iki dozun KKD'yi önemli derecede arttırdığı ve yüksek iki dozda kromozomal anormallik yüzdesini arttırdığını saptamışlardır. Ayrıca kullanılan her üç dozunda spermatosit sayısını azalttığı ve 5.7 mg/kg kadmiyum klorit'in uygulamadan 12 gün sonra spermatositlerde kromozomal anormallik oluşturduğu saptanmıştır. *In vitro* çalışmalarda 10, 15 ve 20 µg kadmiyum klorit'in KKD frekansını önemli ölçüde arttırdığı, yüksek iki dozda kromozom anormalliklerini uyardığı belirlenmiştir. 3 ve 6 µg askorbik asit'in kadmiyum klorit tarafından uyarılan anormal hücre yüzdesini önemli derecede azalttığı saptanmıştır. Perminova ve ark. (2001), bakır-nikel sülfür işletmelerinde çalışan işçilerde nikel'in genotoksik etkilerini ve askorbik asit'in düzenleyici rolünü MN testi ile araştırmışlar ve 30 gün boyunca günde 1g askorbik asit alınmasının MN sayısını önemli derecede azalttığı sonucuna varmışlardır. Rao ve ark. (2001), insan lökosit kültüründe 1.052, 5.262 ve 10.524 µM civa klorit'in (HgCl₂) genotoksik aktivitesi ile 9.734 µM askorbik asit'in düzenleyici rolünü araştırmışlardır. Araştırmacılar civa klorit'in hücre kinetiğini etkilemeden doza bağlı olarak KKD sayısını arttırdığını, kromozomal anormallik taşıyan hücrelerin oluşumunu önemli derecede uyardığını ve askorbik asit'in civa klorit'in mutajenik aktivitesine karşı koruyucu potansiyele sahip olduğunu bulmuşlardır. Khaidakov ve

ark. (2001), bir memeli kanserojeni olan 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) ile serbest radikal oluşturarak DNA hasarı meydana getiren antitümör ajan bleomisin tarafından uyarılan mutasyon frekansının artmasında askorbik asit, Vit E, beta-karoten gibi antioksidanlar ile selenyum mineralinin etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmalarda dişi F344 sıçanlarına mutajenlerin uygulanmasından iki hafta önce antioksidanlarla ayrı ayrı ya da kombine halde ön muamele yapılmış ve çalışmalarda askorbik asit ve vit E'nin HGPRT (Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase = Hipoksantin-Guanin Fosforibozil Transferaz) lokusunda ortaya çıkan mutasyon frekansındaki artışı en yüksek oranda ortadan kaldırdığı saptanmıştır. Nefic (2001), insan periferel lenfositlerinde *in vitro* KA test metodu ile sisplastin'e karşı askorbik asit'in koruyucu potansiyelini araştırmıştır. Araştırmacı askorbik asit ile muamele sonucunda sisplastin ile uyarılan anormal metafaz ve kromozomal anormallik sayısında istatistik bakımından önemli derecede azalma meydana geldiğini belirtmiştir. Ayrıca çalışmada askorbik asit'in antimutajen etkisinin ortaya çıkmasında konsantrasyonun önemli olduğu ve yüksek konsantrasyonlarda serbest radikal üreterek genetik hasara neden olduğu bildirilmiştir. Aly ve Donya (2002), tüberküloz tedavisinde kullanılan rifampisin'in genotoksik etkilerine karşı askorbik asit ve vit E'nin etkilerini araştırmışlardır. Farelere oral yoldan verilen 10, 50, 150, 300 mg/kg rifampisin'in kromozom anormalliklerini arttırdığı ancak bu artışın tedavide kullanılan 10 mg/kg rifampisin'in 30 ardışık gün uygulanması durumunda daha az olduğu; 25, 50 ve 75 mg/kg askorbik asit'in doza bağlı olarak rifampisin'in yaptığı kromozom anormalliklerini önemli derecede azalttığı belirlenmiştir. Ahmad ve ark. (2002), insan lenfosit kültüründe hidrokortizon'un KA ve KKD'yi arttırdığını, askorbik asit ve vitamin E'nin araştırılan parametrelerdeki artışa karşı koruyucu potansiyele sahip olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca yapılan çalışmalarda askorbik asit ile Vit E'nin birlikte uygulanmasının kromozom hasarlarının önlenmesinde daha etkili olduğu gösterilmiştir. Kaya ve ark. (2002), *Drosophila melanogaster*'de wing spot testi ile çeşitli mutajenlerin genotoksik aktivitelerinin düzenlenmesinde askorbik asit'in rolünü araştırmışlardır. Araştırmacılar kobalt klorit (CoCl_2), 4-nitrokinolin ve potasyum dikromat'ın ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) *Drosophila*'da somatik mutasyon ve rekombinasyon testlerinde (SMART) genotoksik aktivite gösterdiğini

ve 25, 75 ve 250 mM askorbik asit'in mutasyon frekansını arttırmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar askorbik asit ile üç test maddesini kombine uygulamışlar ve potasyum dikromat'ın genotoksik aktivitesini azalttığını, 4-nitrokinolin'in genotoksisitesini etkilemediğini ve kobalt klorit'in neden olduğu mutasyon frekansını arttırdığını belirlemişlerdir. Kitano ve ark. (2002), potasyum sorbat, askorbik asit ve demir tuzlarının karışımının mutajenik aktivitesini Ames testi ile araştırmışlar, ayrı ayrı uygulandıklarında inaktif olan bu maddelerin birlikte uygulandıklarında da *S. typhimurium*'un TA98 (+/-S9) suşunda mutajenitenik etki göstermediklerini belirlemişlerdir. Bununla birlikte aynı araştırmacılar bu maddelerin birlikte uygulanması durumunda TA100 suşunda S9 mix varken mutasyonların uyarılmadığını buna karşılık S9 mix yokken doza ve uygulama süresine bağlı olarak mutajenitenin arttığını bildirmişlerdir. Egel ve ark. (2002), toksoplazma ve malarya tedavisinde kullanılan pirimetamin'e karşı askorbik asit'in ve folinik asit'in aktivitesini araştırmışlardır. İnsan lenfosit kültürüne 0.025 mg/ml pirimetamin ile 20, 40 ve 80 mM askorbik asit ya da 25, 50 ve 100 mM folinik asit ilave edildiğini bildiren araştırmacılar, pirimetamin tarafından oluşturulan aberasyonların askorbik asit ve folinik asit tarafından doza bağlı olarak azaltıldığı sonucunu elde etmişlerdir. Konopacka ve ark. (2002), insan lenfositlerinde gama ışınları tarafından kromozom hasarlarının uyarılmasında 1-100 µg/ml askorbik asit'in etkisini KA ve Comet testi ile araştırmışlardır. Araştırmacılar ışınlandırılmamış hücrelerde en yüksek doz olarak belirlenen 20 µg/ml dışındaki dozlarda askorbik asit'in KA frekansını etkilemediğini, Comet testinde 50 µg/ml konsantrasyonda DNA hasarı meydana getirdiğini belirlemişlerdir. Işınlandırılmış hücrelerde KA frekansının askorbik asit varlığında önemli derecede (% 34) azaldığını, Comet testinde 2 Gy gama radyasyonunun oluşturduğu DNA kırıklarının uzaklaştırılmasının askorbik asit tarafından hızlandırıldığını ve böylece askorbik asit'in DNA tamir işlemlerini uyarabileceğini saptamışlardır. Grey ve Adlercreutz (2003), *S. typhimurium*'un TA102 suşunu kullanarak çeşitli oksidanlar tarafından uyarılan mutajenitenin önlenmesinde antioksidanların etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmalarda askorbik asit'in hidrojen peroksit ve t-bütil hidroperoksit tarafından oluşturulan mutajenitenin ortadan kaldırılmasında etkili bir ajan olduğu belirtilmiştir. Premkumar ve Bowlus (2003),

demir ile askorbik asit'in bir arada uygulanmalarının genotoksisite üzerindeki etkilerini C3H/He farelerinin kemik iliği hücrelerinde MN testi ile araştırmışlardır. Üç hafta boyunca 100-300 mg/kg demirle (± 15 g/kg askorbik asit) beslenen farelerde yüksek dozdaki demirin, düşük dozdaki demire göre MN frekansını arttırdığı, askorbik asit ilavesinin düşük demir konsantrasyonlarında MN oluşumunu etkilememesine rağmen yüksek konsantrasyonlardaki demir'in uyardığı MN frekansını azalttığını belirlemiş ve askorbik asit'in demir'in klastojenik aktivitesine karşı koruyucu olduğu sonucuna varmışlardır. Krishnaja ve Sharma (2003), insan periferik lenfositlerinde MMC tarafından uyarılan kromozom hasarları üzerine askorbik asit'in düzenleyici fonksiyonunu çalışmışlardır. Bu çalışmada 200 $\mu\text{g/ml}$ askorbik asit ile 1 veya 2 saatlik ön muamelenin 0.1 ve 0.2 $\mu\text{g/ml}$ MMC üzerindeki etkisi KA, KKD ve MN testleri kullanılarak araştırılmıştır. Askorbik asit ile ön muamelenin MMC tarafından uyarılan KKD ve MN frekansının önemli derecede artmasına neden olduğu, KA testinde ise artış meydana getirmediği saptanmıştır. Robichova ve ark. (2004), HepG2, V79 ve VH10 olmak üzere üç farklı hücre hattında bir hepatokanserojen olan N-nitrosomorfolin'in klastojenik aktivitesi ve DNA hasarı oluşturma aktivitesi ile askorbik asit, vit A ve vit E'nin düzenleyici fonksiyonunu araştırmışlardır. Araştırmacılar DNA hasarları oluşturma aktivitesini belirlemek için Comet testini, klastojenik etkiyi belirlemek için KA testini kullanmışlar ve N-nitrosomorfolin'in doza bağlı olarak DNA hasarlarını uyardığını, HepG2 ve V79 hücrelerinde kromozomal anormallikleri önemli ölçüde arttırdığını saptamışlardır. HepG2 hücrelerinin belirlenen vitaminlerle ön muamelesi sonucunda N-nitrosomorfolin tarafından uyarılan DNA hasarlarının her üç vitamin tarafından önemli derecede azaltıldığı halde klastojenik aktivitesinin vit A ve E tarafından önemli derecede azaltıldığı ancak vit C tarafından değiştirilmediği saptanmıştır. Ahmad ve ark. (2004), hidrokortizon tarafında uyarılan genotoksisiteye karşı askorbik asit'inde içinde bulunduğu çeşitli bitkisel ajanların etkilerini insan periferik lenfositlerinde KA, KKD ve replikasyon indeksi (RI) testleri ($\pm S_9$ mix) ile araştırmışlardır. Çalışma sonucunda 60 ve 80 μM askorbik asit'in 24, 48 ve 72 saatlik muamelelerde KKD ve KA'yı azalttığını ve RI'ni arttırdığını saptamışlardır. Geetha ve ark. (2005), quercetin (kersetin) ve askorbik asit ile bunların

kombinasyonlarının t-bütilhidroperoksit'e karşı antimutajenik etkilerini Ames testi ile araştırmışlardır. 0.5-8 nmol kersetin ve 0.1-100 µmol askorbik asit'in antimutajenik aktiviteye sahip olduğunu belirten araştırmacılar 4 ve 8 nmol kersetin ile 500 nmol askorbik asit'in birlikte uygulanması durumunda antimutajenik aktivitenin arttığını bildirmişlerdir.

2.2. Azodikarbonamid'le Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Azodikarbonamid, unları beyazlatmak amacıyla kullanılan maddeler arasında yer almaktadır.

Hirakawa ve ark. (2003), p53 tümör baskılayıcı geni ile c-Ha-ras protoonkogeninden elde ettikleri 5' ucu ³²P ile etiketlenmiş DNA fragmetlerini kullanarak semikarbazid'in DNA hasarları oluşturma aktivitesini araştırmışlar ve yaptıkları deneylerde semikarbazid'in, Cu(II)'in bulunduğu ortamda karbomoil radikalleri ile timin ve sitozin bölgelerinde DNA hasarı oluşturduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca araştırmacılar azodikarbonamid'in de karbomoil radikalleri oluşturarak DNA'da GGG ve GG sıralarının 5'-G bölgesinde hasar meydana getirdiğini belirtmişlerdir.

2.3. Benzol Peroksit

Benzol peroksit, unlardaki istenmeyen renklerin ortadan kaldırılması amacıyla kullanılan maddeler arasında yer almaktadır. Benzol peroksit'in Slaga ve ark. (1981) tarafından fare derisinde bir tümör promotorü (geliştirici) olarak belirlenmesinden sonra bu maddenin güvenilirliği hakkındaki şüpheler artmış ve birçok genotoksisite-kanserojenite testi ile güvenilirliği saptanmaya çalışılmıştır.

2.3.1. Benzol Peroksit ile Yapılan Diğer Genotoksisite Çalışmaları

Maya D-4 döllerinde gen mutasyon testinde metabolik aktivasyonun olduğu ve olmadığı ortamlarda benzol peroksit'in negatif sonuç verdiği belirlenmiştir

(Litton Bionetics, 1975; Binder ve ark. 1995'ten). Bir başka çalışmada benzol peroksit'in *E. coli*'de DNA hasarları oluşturmada zayıf bir aktiviteye sahip olduğu ve DNA tamir sistemi olanlara göre DNA tamir sisteminden yoksun olan *E. coli* WP-2 suşlarında daha toksik olduğu bildirilmiştir (DeFlora ve ark. 1984; Binder ve ark. 1995'ten). Benzol peroksit'in *E. coli* SOS (umu) testinde pozitif sonuç verdiği belirtilmiştir. Çalışmada benzol peroksit'in SOS aktivitesini (beta galaktosidaz sentezini) kontrole göre arttırdığı ancak bu etkinin doza bağlı olmadığı belirtilmiştir (Matula ve ark. 1987; Binder ve ark. 1995'ten). Eder ve ark.'da (1989), benzol peroksit'in *E. coli* PQ37 suşunda SOS aktivitesini arttırdığını ancak PM21 ve GC4798 suşlarında bu artışın görülmediğini belirtmişlerdir. *E. coli* WP-2 uvrA suşlarında hem S9 mix'in bulunduğu hem de bulunmadığı ortamda benzol peroksit'in mutasyon uyarmadığı bildirilmiştir (National Institute of Environmental Research (NIER), 2001: SIDnitial Assessment Report, 2002'den).

Yapılan başka bir çalışmada benzol peroksit'in sıçan hepatosit kültüründe zamansız DNA sentezinde küçük bir artışa neden olduğu belirtilmiş ancak deneyde kullanılan çözücüde de aynı etki gözlemlendiğinden elde edilen sonuçların biyolojik olarak önemli olmadığı vurgulanmıştır. Ayrıca bu çalışmada T-51-B hücrelerinde benzol peroksit'in sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmış ve benzol peroksit'in HGPR gen lokusunda mutasyon oluşturmada zayıf pozitif etkiye sahip olduğu, ancak ortaya çıkan bu mutajenik yanıtın, doza bağlı olmadığı; 10 µg/ml ve 50 µg/ml benzol peroksit'in mutasyon frekansında istatistiksel olarak önemli bir artış meydana getirirken 20 µg/ml ve 35 µg/ml benzol peroksit'te bu etkinin görülmediği bildirilmiştir (Swierenga ve ark. 1987; Binder ve ark. 1995'ten).

Akman ve ark. (1992), mutasyon belirleyici pS189 plazmidinin supF geninde benzol peroksit'in promutajenik hasarları uyarma potansiyelini araştırmışlardır. Deney için pS189 plazmidi, Cu(I)'ın olduğu veya olmadığı ortamda benzol peroksit ile muamele edilmiş ve daha sonra insan Ad293 hücrelerine transfekte edilerek replikasyonu sağlanmıştır. Deney sonucunda 0.1-1.0 mM benzol peroksit'in plazmid replikasyonunu engellediği ve Cu(I) ilavesinin plazmid toksisitesini arttırmadığı belirlenmiştir. Ayrıca benzol peroksit'in tek başına ya da 0.1 mM Cu(I) ile birlikte uygulandığında spontan mutasyon frekansını doza bağlı olarak 100 kattan daha fazla

arttırdığı belirlenmiştir. Aynı zamanda mutasyonların uyarılması için Cu'nun gerekli olmadığını, ancak Cu'nun hem benzol peroksit aracılığıyla mutasyonların uyarılmasını arttırdığı hem de mutasyon oluşumu için gerekli olan benzol peroksit konsantrasyonunun eşik değerini düşürdüğünü belirlemişlerdir. BPO/Cu(I) aracılığıyla uyarılan bu mutasyonların metal bağlayıcı EDTA (Etylenediamine tetraacetic acid) tarafından engellenirken mannitol ve DMSO gibi hidroksil radikal yakalayıcıları ya da indirgenmiş glutatyon tarafından değiştirilmediği belirlenmiştir. supF geninde büyük ve küçük delesyonların yanında mutantların büyük bir kısmının nokta mutasyonu taşıdığı belirtilmiştir. Araştırmacılar, mutasyonların sıklıkla meydana geldiği bölgelerin, GC baz çifti bölgeleri olduğunu ve bu bölgelerin Cu'nun DNA'ya bağlandığı bölgeler olabileceğini belirtmişlerdir. Bu sonuçlardan yola çıkan araştırmacılar Cu'nun DNA'ya bağlanmasının, benzol peroksit ile promutajenik DNA hasarlarını aktive edebileceğini belirtmişlerdir.

Daha yakın bir zamanda Akman ve ark. (1993), pCMV plazmid gal DNA'sında benzol peroksit ve CuCl tarafından bazların modifikasyonunu araştırmışlardır. Benzol peroksit ve CuCl reaksiyonu ile meydana gelen modifiye bazların yanında muamelesiz kontrol gruplarında da spontan olarak oluşan baz modifikasyonları belirlenmiş ve adenin (A) modifikasyonunda 20 kat, guanin (G) ve sitozin (S) modifikasyonunda yaklaşık 4 kat ve timin (T) modifikasyonunda yaklaşık 2 kat artışın olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca benzol peroksit/CuCl muameleli plazmid DNA'sında baz modifikasyonu en yüksek oranda 8-hidroksiguanin meydana geldiğini de saptamışlardır. Araştırmacılar benzol peroksit ve Fe'in baz hasarlarında nispeten daha etkisiz ve benzol peroksit'in en büyük metaboliti olan benzoik asit'in ise tamamen etkisiz olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar hidroksil radikal yakalayıcısı DMSO'nun, benzol peroksit/CuCl tarafından uyarılan baz modifikasyonlarını % 10-50 oranında ortadan kaldırdığını belirlemişlerdir. Bu verilerden yola çıkan araştırmacılar benzol peroksit ve CuCl reaksiyonu sonucu, DNA baz hasarlarına sebep olan hidroksil radikallerinin veya benzer reaktif türlerin oluştuğunu ve bunların benzol peroksit/CuCl aracılığıyla ortaya çıkan mutasyondan sorumlu olabileceğini belirtmişlerdir.

King ve ark. (1996), memelilerde benzol peroksit aracılığıyla mutasyon oluşumunda baz modifikasyonlarının rolünü araştırmak için düzenledikleri deneyde sıçangillere ait keratinosit kültüründeki DNA'da 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) oluşumunu belirlemişlerdir. Deneyde 10 μ M benzol peroksit'in 1-2 saat içinde 8-OHdG miktarını, kontrole göre 3 kat arttırdığını ve benzol peroksit ile muameleden sonraki 6 saat içinde 8-OHdG miktarının sabit kaldığını belirtmişlerdir. Cu bağlayıcı bathocuproine disulfonic acid ile ön muamele yapılmasının benzol peroksit ile oluşturulan 8-OHdG miktarını azalttığını ancak demir bağlayıcı desferal'in azaltmadığını belirten araştırmacılar benzoik asit'in 8-OHdG oluşumunda etkisiz olduğunu da belirlemişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar sitotoksik olmayan konsantrasyonlardaki benzol peroksit'in 8-OHdG oluşumunda Cu'a bağımlı aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

2.3.2. Benzol Peroksit'in DNA Tek İplik Kırıkları Üzerindeki Etkileri

DNA tek iplik kırıklarının biyolojik önemi bilinmemektedir. Ancak yapılan birkaç çalışma, DNA iplik kırıklarının genotoksisitede önemli bir rol oynamayacağını göstermektedir. Buna dair en inandırıcı veri KA uyarılmasında radyasyonun rolünü araştıran çalışmalardan elde edilmiştir. Yapılan çalışmalarda düşük enerjili radyasyonun, yüksek miktarda DNA tek iplik kırıkları oluştururken KA'yı uyarmada çok daha az etkili olduğu, bunun aksine yüksek enerjili radyasyonun daha az tek iplik kırığı, daha çok çift iplik kırığı oluşturduğu belirlenmiştir (Preston, 1983; Binder ve ark. 1995'ten). Başka bir çalışmada Morgan ve ark. (1985), DNA tek iplik kırıklarının genellikle çok hızlı tamir edildiğini ve bu nedenle anormallik oluşturma şansının azaldığını, hatta tamirde gecikme olsa dahi anormallik frekansının artmadığını belirlemişlerdir. Ancak yinede DNA tek iplik kırığı testi genotoksisitenin belirlenmesinde indikatör test olarak kullanılmaktadır. Benzol peroksit'in DNA tek iplik kırıklarının (DNA single strand breaks=SSB) oluşumunu uyarmadaki etkilerini araştırmak için yapılan birçok deneysel çalışma bulunmaktadır.

Gensler ve Bowden (1983), JB6 fare epidermal hücrelerinde 50 μ M benzol peroksit'in sitotoksositeye neden olmaksızın DNA tek iplik kırıklarını uyardığını belirlemişlerdir. Saladino ve ark. (1985), 56 μ M benzol peroksit'in insan bronşiyal epitel hücrelerinde büyümeyi % 50 oranında ortadan kaldırdığını ve 100 μ M benzol peroksit'in DNA tek iplik kırıklarını uyardığını saptamışlardır. Birnboim (1986), *in vitro* insan lökositlerinde 50 μ M benzol peroksit ile uyarılan DNA iplik kırıklarının benzol peroksit'in hücrelerden yıkanarak uzaklaştırılmasını takiben 30 dakikalık bir zaman içerisinde tamir edilmediğini belirlemiştir. Ancak aynı koşullar altında iyonize radyasyon tarafından uyarılan DNA iplik kırıklarının yeteri kadar tamir edilebildiğini belirtmiş ve DNA hasarlarının yavaş tamir edilmesinin, tümör ilerlemesinde önemli olabileceği sonucuna varmıştır. Ancak Binder ve ark. (1995), benzol peroksit gibi lipofilik maddelerin, yıkanarak hücrelerden tam olarak uzaklaştırılamayacağını ve yıkanmadan sonra iplik kırıklarındaki artışın devam etmesinin buna bağlı olduğunu belirtmektedirler.

Hartley ve ark. (1985 ve 1987), fare epidermal BALB/c keratinositlerinde tamamen sitotoksik doz olan 100 μ M benzol peroksit'in DNA tek iplik kırıklarını uyardığını belirtmişlerdir. Buna zıt olarak kanserojenlerle muamele edilmiş deriden veya papillomlardan türeyen hücre hattının, benzol peroksit tarafından uyarılan iplik kırıklarına karşı dirençli olduğunu belirtmişlerdir. Benzer olarak Gabrielson ve ark. (1990), kültüre edilmiş A116 insan bronşiyal epitelyum hücrelerinde DNA tek iplik kırıklarının oluşumunun benzol peroksit tarafından uyarıldığını ancak insan EKVS akciğer karsinomlu iki hücre hattında kırıkların uyarılmadığını belirtmişlerdir. Hartley ve ark. (1985 ve 1987), normal ve karsinomlu hücreler arasındaki bu farkın benzol peroksit'in tümör ilerletici aktivitesinde temel olabileceğini de belirtmişlerdir. Bir başka çalışmada benzol peroksit'in aşırı sitotoksik dozlarda T-51-B bronşiyal epitelyum hücrelerinde DNA iplik kırıkları meydana getirdiği belirlenmiştir (Swierenga ve ark., 1987; Binder ve ark. 1995'ten).

Benzol peroksit aracılığıyla DNA tek iplik kırıklarının uyarılmasının altında yatan mekanizmayı açıklayabilmek için çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda, 10-1000 μ M benzol peroksit'in Φ X-174 fajında DNA tek iplik kırıklarına sebep olduğu bildirilmiştir. Bu sistemde benzol peroksit ile DNA iplik

kırıklarının uyarılmasının tamamen Cu^{+1} ilavesine bağlı olduğu, diğer geçiş metallerinin veya benzoik asit'in bu olayda etkili olmadığı belirtilmiştir. Electron paramagnetic resonans spectroscopy (EPR) ile bu koşullarda öncelikle benzoloksil radikallerinin olduğu gösterilmiştir. Hücre özütünün olmadığı ortamda benzol peroksit'in Cu ile inkübe edildiği zaman fenil radikalleri ve CO_2 oluşturmadığı belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmalarda benzol peroksit tarafından faj DNA'sında tek iplik kırıklarının uyarılmasının metal bağlayıcılar, glutatyon ve ergothioneine gibi hidrojen donörleri ve benzoloksil radikal yakalayıcıları tarafından engellenirken fenil radikal yakalayıcıları, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimler ve mannitol ile benzoik asit gibi hidroksil radikal yakalayıcılar tarafından engellenmediği belirlenmiştir (Swauger ve ark. 1991; Kensler ve ark. 1991; Binder ve ark. 1995'ten). Benzol peroksit ile DNA tek iplik kırıklarının uyarılmasındaki mekanizmayı açıklamaya çalışan bir başka çalışmada 30-300 μM benzol peroksit'in fare epidermal 308 hücre hattında DNA tek iplik kırıklarını doza bağlı olarak arttırdığı gösterilmiştir (Swauger, 1991; Binder 1995'ten). Faj DNA'sı ve epidermal 308 hücrelerinden elde edilen bu verilere dayanarak araştırmacılar benzol peroksit ile DNA iplik kırıklarının oluşumunun uyarılmasında en büyük rolü benzoloksil radikallerinin üstlendiği sonucuna varmışlardır.

2.3.3. Benzol Peroksit'in, Kimyasallar ile Uyarılan Kansereleşmedeki Etkileri

Benzol peroksit ile yapılan çalışmaların önemli bir bölümünü kimyasallar tarafından uyarılan kanser oluşumundaki rolünü araştıran çalışmalar oluşturmaktadır. Kimyasallarla kanser oluşumunda genellikle iki dönem ayırt edilmektedir. Bunlardan birincisi başlatma (initiation) dönemidir. Bu dönemde kimyasal etkenin kendisi veya bu etken prokanserojen ise vücutta ondan oluşan reaktif metabolit, hücrenin DNA zincirlerinde irreversibl, kalıcı bir bozukluk yapar. Bu dönem kısa zamanda (birkaç dakika, saat veya gün) tamamlanır. Kanser oluşumu için böyle bir etki gereklidir fakat yeterli değildir. Başlatıcı etkinin şiddeti, ileride kanser oluşmasının sıklığını saptar. Fare derisi üzerinde kanser oluşturma şeklinde yapılan rutin kimyasallarla kanser oluşum deneylerinde kullanılan başlatıcı maddeler (initiatör) (primer

kanserojen) genotoksiktir ve başlatma işlemi için çoğunlukla mutasyonlar gereklidir. Kimyasal maddelerle kanser oluşum deneylerinde başlatıcı olarak genellikle 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) kullanılmaktadır. DMBA'nın Ha-ras geninin 61. kodonunda A-T çiftinde transversiyon tipi mutasyonlara neden olduğunu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Bizup ve ark. 1986; Quantanilla ve ark. 1986; Brown ve ark. 1986; Roop ve ark. 1986; Leder ve ark. 1990; Nelson ve ark. 1992; Binder ve ark. 1995'ten). Kimyasal maddelerle kanser oluşumunda ikinci basamak geliştirme veya evrim (promotion) dönemidir. Bu dönemi oluşturan etkenler genellikle sitotoksik maddelerdir. Dokuda hücre ölümüne neden olarak onarıcı hücre proliferasyonunu arttırırlar veya kötü huylu potansiyele sahip olan mutant hücrelerin gelişmesine olanak verirler. Bu dönemin tamamlanması başlatma döneminin aksine uzun zaman alır. Aylarca veya yıllarca sürebilir ve geliştirici maddenin ortamda devamlı olarak bulunmasını gerektirir. Maddenin uygulanmasına son verilirse gelişme biter. Yani bu dönem başlatmanın tersine reversibl bir olaydır. Fare derisi üzerinde yapılan deneylerde geliştirici (promotör) (ko-kanserojen) olarak genellikle 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) kullanılır. Bu madde deriye DMBA sürülmesinden sonraki günlerde, yinelenerek fakat kısa süre uygulanırsa genellikle iyi huylu tümör oluşturmaktadır, kötü huylu tümör oluşturmaları için uzun süre uygulanmalıdır.

Başlatma/geliştirme deneyleri genel olarak duyarlı farelerin derilerinde papillom oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Bu iyi huylu tümörlerin bir kısmı gerilerken bir kısmı spontan olarak pullu hücre karsinomlarına dönüşmektedir. Fare deri tümörlerinde kötü huylu fenotiplerin artışının, normal Ha-ras geninin kaybolması ile ortaya çıkan aneuploidi ve bazı durumlarda p53 tümör supresör gen fonksiyonunun inaktivasyonu ile olduğunu belirtilmektedir (Balmain ve ark. 1992; Binder ve ark. 1995'ten). İyi huylu papillomların kötü huylu karsinomlara dönüşümünün, tümörlü derinin kanserojenlerle, bilinen sitotoksik ajanlarla, serbest radikal üreten bileşiklerle ve iyonize radyasyon ile arttırıldığı belirtilmektedir (Roe ve ark. 1972; Hennings ve ark. 1983; O' Connel ve ark. 1986; Hennings ve ark. 1986; Jaffe ve ark. 1987; Hennings ve ark. 1990; Binder ve ark. 1995'ten). Kötü huylu dönüşümleri arttıran bu maddeler ilerletici (progresör) olarak adlandırılmaktadır (Kayaalp, 1994).

2.3.3.1. Kanser Oluşumunda Benzol Peroksit'in Tümör Başlatma Aktivitesi

Yapılan deneysel çalışmalar benzol peroksit'in başlatıcı aktivitesinin olmadığını göstermektedir. Bu çalışmalar şu şekilde özetlenebilir:

21 dişi Swiss fareye 3 hafta boyunca, haftada iki kez aseton içinde % 0.5'lik benzol peroksit ve sonra haftada iki kez % 5'lik kroton yağı vererek yapılan deneyde 67 haftalık deney süresince tümör gelişmediği bildirilmiştir (Saffioti ve Shubik, 1963; Binder ve ark. 1995'ten). Slaga ve ark. (1981), 30 dişi SENCAR fareye asetondaki konsantrasyonu % 0.5-20 oranında olacak şekilde bir kez 1, 10, 20 ve 40 mg benzol peroksit muamelesini takiben 52 hafta boyunca haftada iki kez 2 µg TPA verdiklerinde tümör insidansının, yalnızca asetonu takiben TPA ile muamele edilen kontrol grubundan yüksek olmadığını belirlemişlerdir.

2.3.3.2. Kimyasallar Tarafından Uyarılan Kanser Oluşumunda Benzol Peroksit'in Tümör Geliştirme Aktivitesi

Benzol peroksit'in tümör oluşumunu geliştirici (promotör) aktivitesini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalar şöyle özetlenebilir:

Benzol peroksit'in dişi SENCAR farelerinde DMBA ile başlatılan papillomlar ve pullu hücre karsinomları için tümör geliştirici aktiviteye sahip olduğu ilk kez Slaga ve ark. (1981) tarafından bildirilmiştir. Odukoya ve Shklar (1984), 16 dişi ve erkek Syrian golden hamsterlerin yanak keselerine 10 hafta boyunca haftada 3 kez uygulanan % 0.1 DMBA'i takiben 6 hafta boyunca haftada 3 kez verilen aseton içindeki % 40 benzol peroksit'in karsinom geliştirmede etkili olduğunu belirtmişlerdir. Kurokawa ve ark. (1984), deride kanser oluşumunda 6 oksitleyici maddenin tümör geliştirici aktivitesini ve tamamen kanserojenik aktivitesini belirlemek amacıyla düzenledikleri deneyde dişi SENCAR farelerini, test maddeleriyle DMBA'yı takiben 51 hafta boyunca veya DMBA verilmeden 51 hafta muamele etmişlerdir. Deney sonucunda benzol peroksit'in tümör geliştirici aktivitesine ilaveten tamamen kanserojen aktiviteye sahip olabileceğini de belirlemişlerdir. Bir başka çalışmada 30-40 dişi SENCAR fareye DMBA'yı takiben

40 hafta boyunca haftada iki kere verilen aseton içindeki 20 mg/kg benzol peroksit'in tümör geliştirdiği belirtilmiştir (Reiners ve ark. 1984; Kraus ve ark. 1995'ten). Aynı araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda, 30-40 dişi C57BL/6 farelerinde tümör başlatıcısı olarak DMBA veya benzo(a)pyrene (BaP) kullanıldığında da benzol peroksit'in tümör geliştirmede pozitif sonuç verdiği belirtilmiştir (Reiners ve ark. 1984; Kraus ve ark. 1995'ten). Schweizer ve ark. (1987), yaptıkları çalışmalarda 20 erkek Syrian golden hamsterlerine 10 mg/kg DMBA'yı takiben 1 ml aseton içinde 80 ve 160 mg/kg olmak üzere iki farklı dozda benzol peroksit'i 16 ay boyunca haftada üç kez vermişler ve hamster derisinde melanotik tümör oluşumunda benzol peroksit'in geliştirici aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bir başka çalışmada DBA/2 farelerinde DMBA'dan sonra uygulanan aseton içindeki 10-40 mg benzol peroksit'in tümör geliştirici aktivitesi için pozitif sonuç elde edilmiştir (DiGiovanni ve ark. 1992; Kraus ve ark. 1995'ten). Yapılan bir diğer çalışmada aseton içindeki 20 mg/kg benzol peroksit'in hem DMBA hem de MNNG tarafından başlatılan kanser oluşumunda SENCAR farelerinde tümör geliştirici aktiviteye sahip olduğu, Swiss CD-1 farelerinde tümör başlatıcı olarak DMBA kullanıldığında pozitif, MNNG kullanıldığında negatif sonuç verdiği ve B6C3F1 farelerinde hem DMBA hem de MNNG'de negatif etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (National Toxicology Programme (NTP), 1994; Kraus ve ark. 1995'ten). Daha yakın bir zamanda Qiu ve ark. (2000), Syrian golden hamsterlerinde DMBA tarafından uyarılan kanser oluşumunda benzol peroksit'in tümör geliştirici etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir.

Benzol peroksit'in tümör geliştirme aktivitesine sahip olduğunu belirten bu çalışmaların yanında tümör geliştirmede negatif etkili olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. 16 dişi ve 16 erkek Oslo tüysüz fareye, UV radyasyonundan 5-30 dakika önce % 5 benzol peroksit'e sahip ticari bir formülasyonun (panoxyl) 60-61 hafta boyunca haftada iki kere uygulanmasının UV tarafından oluşturulan tümör insidansını arttırmadığı, aksine UV radyasyonu ile uyarılan tümörlere karşı bir koruma sağladığı bildirilmiştir (Iversen, 1986; Binder ve ark. 1995'ten). Aynı araştırmacı tarafından yapılan bir başka çalışmada 52 hafta, haftada iki kere, UV radyasyonundan 5-30 dakika sonra uygulanan panoxyl'in UV radyasyonu ile

oluşturulan tümör yanıtını etkilemediği belirtilmiştir. Ayrıca bu çalışmalarda DMBA ile muamele edilmiş Oslo tüysüz fareleri ile SENCAR farelerinde panoxyl'in etkisi araştırılmış ve Oslo farelerinde DMBA'nın kanserojenik etkilerini çok az arttırdığını ve SENCAR farelerinde koruyucu etkisinin olduğunu bildirmişlerdir (Iversen, 1988: Binder ve ark. 1995'ten). Epstein (1988), 270 mJ/cm² UV-B radyasyonu verilen tüysüz Uscd farelerinin 54 hafta boyunca haftada 5 kere % 5 benzol peroksit içeren ticari bir ürün ile muamelesinin tümör yanıtına etkisini araştırmış ve Iversen ile tutarlı olarak negatif sonuç bildirmiştir. 30 dişi Swiss CD-1 fare ile yapılan bir başka çalışmada aseton içindeki 20 mg benzol peroksit'in DMBA ve MNNG uygulanmasından sonra tümör geliştirici aktiviteye sahip olmadığı bildirilmiştir. Bu çalışmada benzol peroksit ile muamele süresinin 30 hafta boyunca haftada 2 kez olduğu bildirilmiştir (DiGiovanni ve ark. 1992: Binder ve ark. 1995'ten).

Bu çalışmaların dışında insanlarda akne tedavisi için benzol peroksit kullanımı ile deri kanseri ve kötü huylu melanom oluşumu arasında bir ilişkinin olmadığı bildirilmiştir (Cartwright ve ark. 1988; Hogan ve ark. 1991).

Kawanishi ve ark. (1999), benzol peroksit'in tümör geliştirici fonksiyonundaki mekanizmayı açıklayabilmek amacıyla insan p53 tümör baskılayıcı geni ile c-ha-ras-1 protoonkogeninden elde edilen ⁽³²⁾P işaretli DNA fragmentlerini kullanarak benzol peroksit'in oksidatif DNA hasar yeteneğini araştırmışlardır. Benzol peroksit'in tek iplikli DNA'da tek G bölgelerinde hasar meydana getirmesine karşılık çift iplikli DNA'da Cu(I) varlığında GG ve GGG sıralarındaki 5'-ucu G bölgesinde hasar oluşumlarını uyardığını göstermişlerdir. Araştırmacılar benzol peroksit/Cu(I) tarafından 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksiguanozin (8-oxodG) oluşumunun tek iplikli DNA'ya göre çift iplikli DNA'da daha fazla uyarıldığını belirlemişlerdir. Ayrıca benzol peroksit'in insan hücre kültüründe 8-oxodG miktarını arttırdığını da göstermişlerdir. Sonuç olarak araştırmacılar benzol peroksit ve Cu(I) reaksiyonu ile oluşan benzoloksil radikallerinin, çift iplikli DNA'nın GG ve GGG sıralarındaki 5'-G bölgesini oksitlediğini, 8-oxodG oluşumu ve 5' ucu G lezyonlarına neden olduğunu, bu şekilde benzol peroksit'in tümör geliştirici aktivitesiyle ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir.

2.3.3.3.Kimyasallar Tarafından Uyarılan Kanser Oluşumunda Benzol Peroksit'in Tümör İlerletme Aktivitesi

Benzol peroksit'in kötü huylu dönüşümleri arttırma aktivitesini araştıran birçok çalışma bulunmaktadır. Benzol peroksit'in SENCAR farelerinde deri papillomlarının pullu hücre karsinomlarına gelişmesini arttırdığı Binder ve ark.'nın (1995) bildirdiğine göre ilk kez Rotstein ve ark. (1986) tarafından belirlenmiştir. Bu çalışmada 12 hafta boyunca haftada iki kez uygulanan aseton içindeki 20 mg/kg benzol peroksit'in DMBA/TPA ile uyarılan papillomların, karsinomlara dönüşümünü kontrole göre iki kattan daha fazla arttırdığını bildirilmiştir (Rotstein ve ark. 1986: Binder ve ark. 1995'ten). O'Connell ve ark. (1986) tarafından yapılan çalışmada tümör taşıyan SENCAR farelerine, 20 mg/kg benzol peroksit'in 21-40 hafta boyunca tekrarlanan uygulamalarının iyi huylu papillomların pullu hücre karsinomlarına ve keratoakanthomlara dönüşümünü üç kattan daha fazla arttırdığı belirtilmiştir. Athar ve ark. (1989), SENCAR farelerine DMBA ve TPA uygulanması ve SKH-1 tüysüz farelere UV-B uygulanması sonucunda papillom gelişiminin olduğunu ve hem SENCAR hem de SKH-1 farelerine benzol peroksit uygulanmasının pullu hücre karsinomları ve keratoakanthoma gibi kötü huylu dönüşümleri arttırdığını göstermişlerdir. Bonfil ve ark. (1989), sıçangillere ait CH72 pullu karsinomlu hücre sıralarının yayılma yeteneğinin benzol peroksit tarafından 5-8 kat arttırıldığını göstermişlerdir. Bu hücrelerin benzol peroksit'le birlikte superoksit dismutaz ve CuSO_4 gibi serbest radikal yakalayıcılar ile muamelesinin hücrelerin yayılma potansiyelini önemli ölçüde azalttığını da gösteren araştırmacılar karsinomlu hücrelerin yayılma yeteneklerinin arttırılmasında reaktif oksijen türlerinin rol oynayabileceğini belirlemişlerdir.

2.3.3.4.Benzol Peroksit'in Kimyasallarla Kanser Oluşumundaki Etkilerinin İnaktivasyonu

Kimyasal maddelerle kanser oluşumunda tümör geliştirici (promotör) olarak kullanılan benzol peroksit'in bu aktivitesini ortadan kaldıran çeşitli maddelerle

yapılan çalışmalar da bulunmaktadır. Suda ve ark. (1986), Syrian hamsterlerinde % 0.1 DMBA'nın başlatıcı ve % 40 benzol peroksit'in geliştirici olarak kullanıldığı yanak kesesi kanserinde başlatma ve geliştirme basamaklarının beta-Carotene tarafından engellendiğini belirlemişlerdir. Athar ve ark. (1991), SENCAR farelerinde DMBA ve SKH-1 farelerinde UV-B'den sonra uygulanan benzol peroksit, TPA, 2,2 azobis-(2-amidinopropan) ve tert-bütil peroksibenzoat gibi maddelerin oluşturduğu kötü huylu dönüşümlerin, 10 µg all-trans retinoik asit'in bu maddelerin uygulanmasından bir saat önce muamelesiyle ortadan kaldırılabileceğini göstermişlerdir. Duran ve ark. (1993), fare derisinde benzol peroksit uygulanmasının papillom, keratoakanthom ve pullu hücre karsinomları gibi farklı tipte tümör geliştirdiğini ve superoksit dismutaz bakır(II)(3,5-diisopropylsalicylate)₂'nin benzol peroksit tarafından uyarılan tümör gelişimini ve kötü huylu tümör ilerlemelerini önemli ölçüde ortadan kaldırılabileceğini belirtmişlerdir. Aynı zamanda araştırmacılar benzol peroksit'in uyardığı kanser oluşumunda reaktif oksijen türlerinin önemli olabileceğini de belirtmişlerdir. Yeşil çaydan izole edilen 6 mg polifenolik fraksiyonların benzol peroksit ve 4-nitrokinolin-N-oksit'in arttırdığı kötü huylu dönüşümleri azalttığını göstermişlerdir (Katiyar ve ark. 1993; Mukhtar ve ark. 1994). Zhao ve ark. (2000), SENCAR farelerinde antioksidan silmarin'in serbest radikaller oluşturan benzol peroksit tarafından uyarılan tümör ilerlemesi, oksidatif stres, inflamatuvar yanıt üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla düzenledikleri deneyde 6 mg silmarin'in tüm parametrelerde doza bağlı olarak koruyucu etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Saleem ve ark. (2000 ve 2001), farelerde benzol peroksit muamelesinin, oksidatif stres, ornitin dekarboksilaz aktivitesinin uyarılması, kontrolsüz DNA sentezinin artması, mikrozomal lipid peroksidasyonu ve H₂O₂ üretiminin artması, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon S-transferaz gibi antioksidan enzim miktarının azalması, [³H]-timidin'in DNA'ya katılımının artması gibi tümör gelişmesiyle ilgili belirteçlerin ortaya çıkmasına sebep olduğu belirtmişler ve spearmint (*Mentha spicata*=Kıvırcık nane) özütü (10, 15 ve 20 mg/kg) ve birçok bitkide bulunan lupeol [lup-20(29)-en-3 beta-ol] (0.75 ve 1.5 mg) ile ön muamelenin, benzol peroksit aracılığıyla oluşan hasarlara karşı tüm parametrelerde doza bağlı olarak koruyucu aktiviteye sahip olduğunu

göstermişlerdir. Sultana ve ark. (2003), sıçangillere ait deride 0.2 ml aseton içindeki 20 mg benzol peroksit ve UVB'nin ($420 \text{ J/m}^2/\text{s}$) katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve glikoz-6-fosfat dehidrojenaz gibi antioksidan enzimlerin, glutatyon S-transferaz ve kinon redüktaz gibi faz 2 metabolize enzimlerin azalmasına, mikrozomal lipid peroksidasyonunun, ksantin oksidaz aktivitesinin, ornitin dekarboksilaz aktivitesinin ve [^3H]-timidin'in DNA'ya katılımının artmasına neden olduğunu belirtmişlerdir. 0.2 ve 0.4 mg/kg sikloartenol'ün ön muamelesinin belirtilen parametrelerin düzenlenmesine neden olduğunu belirleyen araştırmacılar sikloartenol'ün deri kanser oluşumunda etkili bir koruyucu ajan olduğu sonucuna varmışlardır. Sultana ve ark. (2004), fare derisinde benzol peroksit'in tümör geliştirme yanıtı üzerine 13-sis retinoik asit'in iyileştirici etkisini araştırmışlar ve benzol peroksit'in ortaya çıkardığı oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, antioksidan enzim aktivitesinin azalması, ornitin dekarboksilaz aktivitesinin ve DNA sentezinin artması gibi tümör belirteçlerinin, 13-sis retinoik asit ile önemli derecede ortadan kalktığını belirlemişlerdir. Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda benzol peroksit'in *S. typhimurium*'un S9 mix varlığında TA98 ve TA100 suşlarında mutasyon uyardığı ve retinoik asit'in bu mutasyonlara karşı da koruyucu potansiyele sahip olduğu belirtilmiştir. Benzer iki çalışma yine aynı araştırmacı grubu tarafından yapılmış ve gentisik asit ile *Hibiscus rosa sinensis* (Çin gülü) özütlerinin Swiss albino farelerde benzol peroksit ve UV tarafından ortaya çıkan tümör yanıtına karşı etkili bir koruyucu ajan oldukları gösterilmiştir (Sharma ve ark. 2004; Sharma ve Sultana, 2004). Mathur ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmada Wistar sıçanlarında 20 gün uygulanan 294 nm UV-B'i takiben bir ay boyunca haftada iki kere verilen 0.2 ml aseton içindeki 20 mg benzol peroksit'in kötü huylu tümör gelişimine neden olduğu ve *Withania somnifera* köklerinden izole edilen 1-oxo-5beta, 6beta-epoxy-witha-2-enolide'in (20 mg/kg) benzol peroksit'in bu etkisine karşı koruyucu aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

2.3.4. Benzol Peroksit'in Hücreler Arası Haberleşmedeki Etkileri

Benzol peroksit'in hücreler arası haberleşmedeki aktivitesini araştıran birçok çalışma bulunmaktadır. Slaga ve ark. (1981), Chinese hamster V79 hücrelerinde, Lawrence ve ark. (1984), insan epidermal keratinositlerinde, hücreler arasındaki haberleşmenin benzol peroksit tarafından engellendiğini belirtmişlerdir. Ancak Zeilmaker ve Yamasaki (1986), Chinese hamster V79 hücrelerinde sitotoksik olmayan dozlardaki benzol peroksit'in hücreler arası haberleşmeyi etkilemediğini belirtmiştir. Bunun üzerine Binder ve ark. (1995), benzol peroksit'in V79 hücrelerinde metabolik işbirliği üzerindeki etkilerini yeniden araştırmışlar ve benzol peroksit'in hücreler arası haberleşmeyi engellediğini göstermişlerdir. Farklı çalışmalarda farklı sonuçların bulunmasını Binder ve ark. (1995) benzol peroksit'in çözünürlük sınırıyla ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir. Hu ve Cotgreave (1995), WB-F344 sıçanlarının karaciğer epitel hücrelerini kullanarak yaptıkları çalışmada 25-150 µM benzol peroksit'in hücreler arası iletişimde zayıf fakat doza bağlı bir azalma meydana getirdiğini bildirmişlerdir. Bir başka çalışmada fare primer keratinositlerinde, kanserojen maddelerle tümör başlatılmış fare epidermal 3PC hücrelerinde ve fare deri karsinomlarından türeyen CA3/7 hücrelerinde benzol peroksit ile birlikte birkaç maddenin hücreler arası haberleşmedeki etkisi araştırılmış ve benzol peroksit tarafından her üç hücrede de haberleşmenin engellendiği (primer keratinosit>3PC>CA3/7) belirlenmiştir (Jansen ve Jongen, 1996; Jansen ve ark. 1996). Budunova ve ark. (1996), SENCAR farelerinin epidermisinde çeşitli maddelerin hücre yüzeyi bağlantı proteinlerin (connexin 26, connexin 43 ve connexin 31.1) ekspresyonu üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve 83 µmol benzol peroksit'in, bu proteinlerin ekspresyonunda değişiklik meydana getirerek hücreler arası haberleşmeyi etkilediğini belirlemişlerdir.

2.4. Klor ve Klor Dioksit'le Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Klor ve klor dioksit unları beyazlatmak amacıyla kullanılan kimyasallar arasında yer almaktadır.

Ishidate ve ark. (1984), Salmonella/mikrozom testi ve Chinese hamster fibroblast hücrelerinde *in vitro* KA testi ile 190 sentetik ve 52 doğal gıda katkı maddesinin mutajenik etkilerini araştırmışlar ve klor dioksit'in sadece Ames testinde pozitif etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Meier ve ark. (1985), klor (hipoklorit ve hipoklorik asit), monokloramin, klordioksit, sodyum klorit ve sodyum klorat'ın genotoksik etkilerini CD-1 farelerinin kemik iliğinde *in vivo* MN ve KA testi ve B6C3F1 farelerinde sperm başı anormalliklerini uyarma testi ile araştırmışlar ve 4-8 mg/kg olacak şekilde ağız yoluyla verilen klor'un sperm başı anormalliklerini önemli ölçüde arttırdığını belirlemişlerdir. Douglas ve ark. (1986), Kanada'da Great göl bölgesindeki altı belediyeye ait klorlanmış su örneklerinin mutajenik etkilerini Salmonella testi ve Chinese hamster yumurtalık hücrelerinde KKD ve MN testlerini kullanarak araştırmışlardır. Klorlanmış su örneklerinin hem Salmonella testinde hem de KKD ve MN testlerinde pozitif sonuç verdiğini belirlemişlerdir. Tan ve ark. (1987), klor dioksit ile sistein, triptofan, tirozin, histidin, hidroksiprolin, prolin aminoasitlerinin ve L-glisil-L-triptofan, L-triptofilglisin ve L-aspartil-L-fenilalanin metil ester (aspartam) dipeptidlerin TA98 ve TA100 suşlarındaki (+/- sıçan karaciğer S9) mutajenik aktivitelerini çalışmışlar ve 3 peptid ile hidroksiprolin ve tirozin amino asitlerinin pozitif etkiye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Hayashi ve ark. (1988), farelere i.p. enjeksiyon yöntemiyle verilen klor dioksit'in MN oluşumunu uyardığını belirlemişlerdir. Owusu-Yaw ve ark. (1991), 70 mM sulu klor veya klor dioksit ile 10 mM triptofanın mutajenik aktivitelerini belirlemek için *S. typhimurium*'un TA100 ve TA98 suşlarını kullanmışlardır. Hem bu testte hem de Chinese hamster yumurtalık hücrelerinde KKD testinde sıçan karaciğer S9 mix yokluğunda pozitif sonuç belirlemişlerdir. Yapılan analizler sonucunda, bu maddelerin reaksiyonu sonucunda oldukça mutajenik aktiviteye sahip olan 1,1,3-trikloropropan, 1,1,3,3-tetrakloropropan ve diklorokinolin'in oluştuğunu belirlemişlerdir. Wrisberg ve Van der Gaag (1992), kâğıt fabrikalarında beyazlaştırıcı olarak klor kullanıldığını belirtmişler ve bu işlem sırasında açığa çıkarak sulara karışan atık maddelerle diğer atık maddelerin genotoksik etkilerini *Mytilus edulis* midyelerinde MN testi ve *Nothobranchius rachowi* balıklarında KKD testi ile araştırmışlar ve pozitif sonuç belirlemişlerdir. Araştırmacılar ortaya çıkan genotoksisitede klorla muamele edilmeyen

maddelerin de etkili olduğunu belirtmişlerdir. Sipi ve ark. (1997), Chinese hamster yumurtalık hücrelerinde *in vitro* KKD testinde eşit oranda klor/klor dioksit karışımının 4 saatlik muamelede doza bağlı olarak kardeş kromatid değişimlerinin artışı uyardığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar, KKD oluşumunda kontrole göre en fazla 1.6 kat artış belirlemişlerdir. Ayrıca klor/klor dioksit karışımı ile 4 ve 20 saatlik muamele sürelerinde kromatid tipi kromozom aberasyonlarında sırasıyla 15.5 kat ve 20.5 kat artış meydana geldiğini belirlemişlerdir. 9:1 oranında hazırlanan klor/klor dioksit karışımı ile 20 saat muamelede kromatid tipi aberasyonların 40.5 kat arttığı ve kromozom aberasyonlarındaki artışın 4 saatlik muamelede de gözlemlendiği belirtilmiştir. Araştırmacılar sıçan karaciğer S9 mix kullanılmasının genotoksik etkiyi azalttığını da belirlemişlerdir. Liu ve ark. (1999), klor ile muameleli su örnekleri, muamelesiz su örnekleri ve Çin'deki Chao göl bölgesinden topladıkları su örneklerinin mutajenik etkilerini Salmonella testi, Chinese hamster akciğer hücrelerinde KKD testi ve gümüş sazanı'nın periferik eritrositlerinde MN testi ile araştırmışlardır. Çalışmaların sonunda klorla muamele edilmiş su örneklerinin hem Salmonella testinde hem de KKD ve MN testlerinde pozitif sonuç verdiğini belirlemişlerdir. Kim ve ark. (1999), *Salmo salar* (Atlantik som balığı) ve *Epinephelus morio*'yu 20 veya 200 ppm klor veya klor dioksit eriyiği ile 5 dakika muamele ettikten sonra balıklardan elde ettikleri özütlerin ve test maddesinin mutajenik etkilerini Ames testi ile araştırmışlardır. Çalışmalar sonucunda muameleli balıklardan alınmış özütün veya klor dioksit'li test maddesinin mutajenik aktivite göstermediğini belirtmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada 200 ppm klorun TA100 suşunda zayıf mutajenik aktiviteye sahip olduğu da belirtilmiştir. Feretti ve ark. (2003), bitkilerde *in vivo* kısa süreli mutajenite test yöntemlerini kullanarak nötral ve asit pH'da sodyum hipoklorit (NaClO), klor dioksit (ClO₂) ve perasetik asit'in (CH₃-CO-COOH) genotoksik etkilerini araştırmışlardır. ClO₂ ile muamele edilmiş su örneklerinin *Tradescantia* polen hücrelerinde MN testinde asit pH'da pozitif sonuç verdiğini belirten araştırmacılar ayrıca *Allium cepa* kök hücrelerinde KA testinde NaClO muameleli su örneklerinin asit pH'da, ClO₂ muameleli örneklerin ise pH 7'de genotoksik etki gösterdiğini belirlemişlerdir. Guzzella ve ark. (2004), suyun dezenfeksiyonu için kullanılan NaClO, ClO₂ ve perasetik asit'in mutajenik etkilerini

S. typhimurium TA98 ve TA100 suşlarında Ames testi, *Escherichia coli*'de SOS testi, *Vibrio fischeri*'de microtox ve mutatox testi ve *Saccharomyces cerevisiae* diploid D7 dölünde gen mutasyonları, nokta mutasyonları ve mitokondriyal DNA mutasyonları testleri ile araştırmışlar ve NaClO ve ClO₂ verilen suyun genotoksisitesinin arttığını, CH₃-CO-COOH 'in ise herhangi bir etki göstermediğini belirlemişlerdir. Buschini ve ark. (2004), insan lökositlerinde Comet testi ve *S. cerevisiae* D7 dölünde gen mutasyonları, nokta mutasyonları ve mitokondriyal DNA mutasyonları testlerini kullanarak NaClO, ClO₂ ve perasetik asit'in etkilerini araştırmışlar ve her üç dezenfektanında insan lökositlerinde zayıf genotoksik etkiye sahip olduğunu ve ClO₂ için etkili en düşük dozun 0.2 ppm olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar *S. cerevisiae*'de yaptıkları çalışmalarda bu maddelerin, suyun dezenfeksiyonu için kullanılan konsantrasyondan 5-10 kat yüksek konsantrasyonlarda genotoksik olduğunu belirtmişlerdir. Sutiakova ve ark. (2004), içme sularındaki klor'un kromozom hasarları oluşturmadaki aktivitesini belirlemek amacıyla dişi koyunların periferik lenfositlerinde KA ve MN testlerini kullanmışlar ve hem anormal hücre frekansının hem de MN frekansının kontrole göre önemli derecede arttığını belirlemişlerdir. Racz ve ark. (2004), dezenfeksiyon için klor'la muamele edilmiş su ile muamelesiz su örneklerinin insan periferik lenfositlerinde apoptotik indeksi nasıl etkilediklerini belirlemek amacıyla düzenledikleri deneylerde 100 µl/ml konsantrasyonda dezenfekte edilmiş suyun lenfosit kültüründe apoptozu önemli ölçüde uyardığını belirtmişlerdir. Monarca ve ark. (2005), suların dezenfeksiyonu için kullanılan sodyum hipoklorit, klor dioksit ve perasetik asit'in genotoksik etkilerini *Allium cepa* (soğan) kök hücrelerinde kromozom aberasyonu testi, *Vicia faba* (bakla) kök hücrelerinde MN testi ve *Tradescantia* polen hücrelerinde MN testini kullanarak araştırmışlar; 1-2 mg/l NaClO ve ClO₂ ile 0.5-2 mg/l perasetik asit'in *Vicia faba* MN testinde nötral pH'da, 0.1-0.5 mg/l NaClO, ClO₂ ve perasetik asit'in, asit pH'da pozitif sonuç verdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca bu çalışmada ClO₂'nin kullanılan konsantrasyonların çoğunda *Tradescantia* MN testinde pozitif sonuç verdiği de belirtilmiştir.

2.5. Lesitin’le Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Lesitin, unlarda hem hamuru güçlendirmek hem de bayatlamayı geciktirmek amacıyla kullanılan yüzey aktif maddeler arasında yer almaktadır.

Minnunni ve ark. (1992), askorbik asit, alfa-tokoferol ve lesitinden oluşan antioksidan vitamin karışımının ve biberiye bitkisine ait özütlerdeki karnosik asit ile karnosol’un *S. typhimurium*’un TA102 suşunda güçlü antimutajenik etki gösterdiğini ve tert-bütül-hidroperoksit ve hidrojen peroksit tarafından ortaya çıkarılan oksijen radikallerinin oluşturduğu mutajeniteyi ortadan kaldırdığını belirtmişlerdir.

2.6. L-Sistein’le Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

L-sistein hamur gelişimini hızlandırmak amacıyla kullanılan indirgen maddelerdendir.

Stich ve ark. (1978), indirgenmiş maddelerin, sistein’in, sisteamin’in, glutatayon’un, askorbik asit’in ve hidrojen peroksit’in toksik olmayan dozlarda Cu^{+2} ’nin bulunduğu ve bulunmadığı ortamda Ames testinde mutasyon frekansını önemli ölçüde arttırmadığını ancak memeli hücre kültüründe KA frekansını arttırdığını ve DNA tamir sentezinde tetikleyici olduğunu bildirmişlerdir. Speit ve ark. (1980), Chinese hamster V79 hücrelerinde serbest radikaller oluşturan hidroksilamin, hidrazin ve tüberküloz tedavisinde kullanılan izoniazid’in KKD oluşumlarını uyardığını ve sistein gibi sülfidril grubuna sahip bir bileşikle eş zamanlı muamelenin hidrazin ve izoniazid tarafından meydana getirilen KKD artışını azalttığını belirlemişlerdir. Gebhart ve Kappauf (1980), kromozomlarda hasar meydana getiren trenimon ve 8-hidroksikinolin sülfat tarafından uyarılan KKD üzerine L-sistein, beta-aminoetilizotiyouranyum ve d,l-homosisteintiyolakton’un etkilerini insan lenfosit kültüründe araştırmışlar ve bu maddelerin klastojen etkiyi azaltmalarına rağmen hiç birinin KKD oranını önemli derecede etkilemediğini belirlemişlerdir. Ray-Chaudhuri ve ark. (1982), tümör geliştirici TPA, fenobarbiton ve sakkarin’in KKD üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve TPA’nın Chinese hamster yumurtalık ve V79 hücrelerinde KKD’de küçük ama önemli bir artış meydana

getirdiğini ve bu artışın L-sistein ilavesi ile azaldığını belirlemişlerdir. Cooray ve ark. (1982), insan lenfositlerinde patulin ve patulin-sistein karışımının DNA sentezi üzerindeki etkilerini hücrel DNA'ya ^3H -timidin katılımı ile belirlemeye çalışmışlar ve patulin'in ^3H -timidin'in DNA'ya girişini engellerken patulin-sistein karışımının uyardığını saptamışlardır. Ayrıca KKD'nin patulin etkisiyle önemli derecede arttığını, sistein'in bu etkiyi güçlendirdiğini belirlemişlerdir. Speit ve ark. (1984), bleomisin, hidrojen peroksit, kısa dalga boylu UV ışını ve uzun dalga boylu UV ışınının etkilerini V79 hücrelerinde KA ve KKD testleri ile araştırmışlardır. Yapılan çalışmalarda bleomisin'in sadece kromozomal anormallikleri uyarırken hidrojen peroksit ile her iki UV ışınının hem KA hem de KKD'yi uyardığını saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmalarda sistein'in tüm muamelelerde tek iplik kırıklarına bağlı kromozom anormalliklerinin frekansını azalttığı, bleomisin ve hidrojen peroksit'in neden olduğu KKD'yi etkilemezken UV ışınının uyardığı KKD'yi hafif derecede azalttığı bildirilmiştir. Inoue ve ark. (1985), insan lenfosit kültüründe nitrososimetidin'in KKD'yi arttırdığını ve bu artışın sistein tarafından engellendiğini saptamışlardır. Shah ve Mittal (1987), HeLa hücrelerinde hücre döngüsünün çeşitli evrelerinde farklı dozlardaki gama ışınlarının KKD üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışma sonucunda gama ışınlarının en çok hücre döngüsünün S fazında KKD uyardığı ve L-sistein'in tek başına uygulandığında kendiliğinden oluşan KKD'yi çok hafif bir şekilde arttırmasına rağmen gama ışınlarından önce verilen L-sistein'in gama ışınlarının uyardığı KKD'yi azalttığı ve bu etkinin en fazla hücre döngüsünün G1 fazında görüldüğü saptanmıştır. Ayrıca gama ışınlarının doza bağlı olarak mitoz bölünmelerin gerçekleşmesini geciktirdiğini ve L-sistein'in hücre döngüsündeki gecikmeleri azalttığını saptamışlardır. Glatt (1989), *S. typhimurium*'un çeşitli suşlarını kullanarak (+S9) glutasyon, sistein ve çeşitli aktif oksijen türlerinin aktivitelerini araştırmışlardır. Bu çalışmalarda sistein ve glutasyonun nicelik ve nitelik bakımından genellikle benzer bir mutajenik aktivite gösterdiği, mutant sayısının TA97 suşunda TA100'e göre 3-4 kat daha fazla olduğu, mutajenik aktivitenin TA92, TA102 ve TA104 suşlarında gözlenirken TA1535 ve TA1537 suşlarında görülmediği belirlenmiştir. Ghaskadbi ve Vaidya (1991), farelerde kolkisin'in mikronükleuslu polikromatik eritrosit (PE) frekansını ve normokromatik

eritrositlerin polikromatik eritrositlere oranını (NE/PE) arttırdığını, kolkisin'le aynı zamanda uygulanan sistein'in gözlenen değişiklikleri etkilemezken kolkisin'den bir saat önce i.p. yoldan verilen sistein'in NE/PE oranını baskımlarken mikronükleuslu PE oranını etkilemediğini ve kolkisin ile sistein'in 37 °C'de 1 saat ön inkübasyonunun kolkisinin etkisini önemli derecede azalttığını belirlemişlerdir. Tayama ve Nakagawa (1991), CHO-K1 hücrelerinde o-fenilfenol ve onun metabolitleri olan fenilhidrokinon ve fenilbenzokinon'un genotoksik aktiviteleri üzerine sistein ve indirgenmiş glutatyon'un etkilerinin araştırılmasında KA ve KKD testlerini kullanmışlardır. O-fenilfenol, fenilhidrokinon (100 µg/ml) ve fenilbenzokinon (50 µg/ml) ile 3 saatlik muamelede uyarılan sitogenetik ve sitotoksik etkilerin S9 mix varlığında sistein ve indirgenmiş glutatyon (3-10 mM) tarafından engellendiği belirlenmiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda sülfidril grupları taşıyan bu iki maddenin S9 mix olmadığı zaman o-fenilfenol tarafından ortaya çıkarılan sitotoksik ve sitogenetik etkileri engellemediği aksine şiddetlendirdiği ve S9 mix bulunmayan kültürde 25 µg/ml fenilhidrokinon ve 5 µg/ml fenilbenzokinon'un sitotoksik etki gösterdiği ve sistein ile indirgenmiş glutatyonun bu toksisiteyi engellediği belirtilmiştir. Sai ve ark. (1992), erkek F344 sıçanlarına i.p. yoldan verilen 60 mg/kg potasyum bromat'ın MN frekansını arttırdığını ve potasyum bromat uygulanmasından 30 dakika önce ya da sonra 800 mg/kg glutatyon veya 400 mg/kg sistein'in i.p. yoldan verilmesinin MN uyarılmasını önemli derecede engellediğini belirlemişlerdir. Yamashita ve ark. (1995), Chinese hamster akciğer hücrelerinde N-nitrosopirolidin veya N-nitrosodietilamin ile UV tarafından kromozomal anormalliklerin uyarıldığını ve bu anormalliklerin süperoksit dismutaz, glutatyon ve L-sistein tarafından engellendiğini belirlemişlerdir.

2.7. L-Sistein Monohidroklorit'le Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

L-sistein monohidroklorit unlara ilave edilen indirgen maddelerdendir.

Ishidate ve ark. (1984), Chinese hamster fibroblast hücrelerinde *in vitro* KA testi ve Ames testini kullanarak L-sistein monohidroklorit'inde içinde yer aldığı

birçok maddenin genotoksik aktivitelerini araştırmışlar ve bu maddenin hem KA hem de Ames testinde pozitif sonuç verdiğini belirlemişlerdir.

2.8. Nitrojen Peroksit (Nitrojen Dioksit)'le Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Nitrojen peroksit unları beyazlatmak amacıyla kullanılan maddeler arasında yer almaktadır.

Inoue ve ark. (1981), alkilüreaz bulunan ya da bulunmayan ortamda NO₂'nin *Drosophila*'da erkek üreme hücrelerinde letal mutasyon meydana getirip getirmediğini eşeme bağlı resesif letal mutasyon testi (sex-linked recessive lethal test) ile araştırmışlardır. Metilüre, etilüre ve NO₂'nin ayrı ayrı uygulandıklarında mutasyon frekansını önemli derecede arttırmadığını ancak iki gün boyunca 0.1 M etilüre ve 0.1 M metilüre verilmesinden sonra 3 saat 150-280 ppm NO₂'ye maruz bırakılan yetişkin sineklerde mutasyon frekansının önemli ölçüde arttığını belirlemişlerdir. Tsuda ve ark. (1981), nitrojen dioksit gazının kromozom morfolojisi üzerindeki etkilerini Chinese hamster V79-H3 hücrelerinde araştırmışlardır. 0, 5, 10, 20, 50 ve 100 ppm NO₂ ile 10 dakika muamele edilen Chinese hamster hücrelerinde KKD ve KA'da doza bağlı olarak artış belirlemişlerdir. Isomura ve ark. (1984), sıçanlardan elde edilen primer akciğer hücrelerinde nitrojen oksitlerin (NO ve NO₂) KA üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar bu çalışmada sıçanların 3 saat boyunca 8-27 ppm konsantrasyonlarındaki nitrojen oksit gazlarına maruz bırakıldığını ve NO'in sadece en yüksek konsantrasyonda (27 ppm) mutasyon uyardığını, NO₂'nin ise 8 ve 27 ppm konsantrasyonlarda kromozom anormalliklerini kontrole göre 2.5-11.6 kat arttırdığını saptamışlardır. Shiraishi ve Bandow (1985), NO₂ ile propilen'in fotokimyasal reaksiyonu ile ortaya çıkan ürünlerin genotoksik etkilerini Chinese hamster V79 hücrelerinde KKD testi ile araştırmışlar ve 2 saatlik muamelede kontrole göre 2-3 kat artış belirlemişlerdir. Ayrıca bu çalışmada NO₂ ile ozonun (O₃) etkisi araştırılmış ve bu durumda da KKD'nin arttığı fakat bu etkinin NO₂+propilen ürünlerine göre daha az olduğu belirlenmiştir. Shiraishi ve ark. (1986), NO₂ ile toluen'in fotokimyasal reaksiyon ürünlerinin etkilerini araştırmak için Chinese hamster V79 hücrelerinde KKD testini kullanmışlardır ve pozitif sonuç elde

etmişlerdir. Kosaka ve ark. (1985), NO₂'nin umuC-lacZ füzyon plazmidini taşıyan *S. typhimurium*'da umuC ekspresyonunu uyardığını belirlemişlerdir. NO₂ gazı bu çalışmada bakteri süspansiyonuna 10, 30 ve 90 µl/l konsantrasyonlarda 30 dakika uygulanmıştır. Ayrıca NO gazının umuC ekspresyonunu uyarmadığı bu çalışmalar sırasında saptanmıştır. Kosaka ve ark. (1986), NO₂ gazının sitotoksitesini, umuC ve recA proteinlerinin sentezini uyarmasını ve mutajenik aktivitesini, farklı kapasitede DNA tamiri yapabilen *Escherichia coli* suşlarında çalışmışlardır. 90 ve 180 µl/l NO₂ gazının *E. coli* bakterilerini öldürdüğünü ve recA mutantlarının en hassas; lexA mutantlarının orta derecede hassas ve uvrA mutantları ile yabani tipin çok daha az hassas olduklarını belirlemişlerdir. 90 µl/l NO₂'nin 30 dakika uygulanması durumunda yabani tipte umuC ve recA gen ekspresyonunun arttığını fakat recA ve lexA mutantlarında uyarılmadığını belirlemişlerdir. Ayrıca yapılan diğer çalışmalarda NO₂'nin WP2 suşlarında mutasyonlara sebep olduğunu belirtmişlerdir. Kosaka ve ark. (1987), NO₂'in *S. typhimurium* ve *E. coli* K-12 suşlarında SOS testinde pozitif sonuç verdiğini ve *E. coli* WP2'de mutajenik olduğunu belirtmişlerdir. Kanoh ve ark. (1987), farelere i.p. yoldan 800 mg/kg oranında piren uygulamasından önce 3 gün 20 ppm NO₂ uygulamışlar ve piren uygulanmasından sonra 24 saat daha NO₂ verilen farelerden elde ettikleri idrar özütlerindeki metabolik ürünlerin mutajenik etkilerini *S. typhimurium*'un TA98 suşlarını kullanarak Ames testi ile araştırmışlardır ve 3-hidroksi-1-nitropiren, 6-hidroksi-1-nitropiren, 8-hidroksi-1-nitropiren ve 1-hidroksipiren'in mutajen olduğunu bildirmişlerdir. Victorin ve Stahlberg (1988), *S. typhimurium*'un TA100 suşunda % 0.5-20 vinil klorit, eten, propen, 1,3-bütadien, 1-200 ppm etilen oksit, 0.5-20 ppm NO₂, 0.1-3.5 ppm ozonun mutajenik aktivitelerini araştırmışlardır. Araştırmacılar bu gazları hızları 250, 500 veya 1.000 ml/dakika olacak şekilde 6 veya 7 saat uygulamış ve vinil klorit, etilen oksit ve NO₂'in mutajenik olduğunu belirlemişlerdir. Bu sistemde eten, propen ve 1,3-bütadien'in mutajenik olmadığını ozonun ise bakteriyotoksik olduğunu ancak toksik olmayan dozlarda mutajenik aktivite göstermediğini belirlemişlerdir. Victorin ve ark. (1990), *Drosophila*'da somatik mutasyon ve rekombinasyon testlerini ve fare kemik iliğinde MN testini kullanarak 1,3-bütadien ve NO₂'in fotokimyasal karışımının genotoksik aktivitesini araştırmışlardır. Yapılan çalışmalarda bütadien'in

tek başına *Drosophila*'da mutajenik aktivite göstermediği ancak 23 saatlik muamelede 10 ppm bütidien'in farelerde MN uyardığı belirlenmiştir. NO₂'in ise her iki test sisteminde de genotoksik aktiviteye sahip olmadığı saptanmıştır. Bu iki maddenin fotokimyasal reaksiyon ürünlerinin ise *Drosophila*'da mutajenik aktivite göstermediği ve fare kemik iliğinde ise genotoksik olmadığı belirlenmiştir. Victorin ve Stahlberg (1991), *S. typhimurium*'un TA100 suşunda klorinlenmiş alken ile NO₂'in fotokimyasal reaksiyonu sonucunda oluşan ürünlerin etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada UV ile ışınlandırma 40 dakika ve muamele ise 20 saat yapılmıştır. Kloroeten, 1,1-dikloroeten ve tetra kloroeten hafif derecede, monokloroeten (vinil klorit) ise yüksek derecede mutajenik bulunmuştur. Bunun yanında 1,2-dikloroeten ve trikloroeten'in mutajen olmadığı saptanmıştır. Yadav ve Seth (1998), NO₂ ve NO gazlarının karışımının genotoksik aktivitesini araştırmak için 50 µg/ml (NO₂+NO) içeren havayı soluyan 45 kişi ile 1770.5 mg/m³ (NO₂+NO) içeren atmosfere maruz kalan 45 altın kuyumcusunun lenfositlerinde mitotik indeks (MI), KA, KKD ve satellit assosiasyonunu (SAs) araştırmışlardır. Bu çalışmada tüm parametrelerin kontrole göre önemli ölçüde arttığını belirlemişlerdir: İlk grupta yer alan kişilerde MI 9.57, ikinci grupta yer alan kişilerde 5.01; benzer şekilde KA taşıyan hücrelerin oranı ilk grupta 3.48, ikinci grupta 0.711; KKD sayısı birinci grupta 10.56, ikinci grupta 7.02 ve SAs sayısı birinci grupta 25.97, ikinci grupta 12.84 olarak belirlenmiştir. Ayrıca bir D grubu kromozom ile bir G grubu kromozom arasındaki satellit assosiasyonun (DG tip) üç D grubu kromozom arasında oluşan satellit assosiasyonundan (D tip) daha fazla olduğunu belirlemişler ve NO₂ ve NO gaz karışımının insanlar için genotoksik olduğu sonucuna varmışlardır.

2.9. Potasyum Bromat

2.9.1. Potasyum Bromat'la Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Potasyum bromat oksidan özelliğinden dolayı unu beyazlatmak amacıyla kullanılmaktadır.

Ishidate ve ark. (1984), Chinese hamster fibroblast hücrelerinde *in vitro* KA ve Ames testlerini kullanarak toplam 242 yapay ve doğal gıda katkı maddesinin genotoksik etkilerini araştırmışlar ve potasyum bromat'ın her iki testte de pozitif sonuç verdiğini belirtmişlerdir. Hayashi ve ark. (1988), 47 kimyasal maddenin genotoksik etkisini farelerde MN testi ile araştırmışlar ve hem intraperitoneal (i.p.) yoldan hem de oral yoldan verilen potasyum bromat'ın MN oluşumunu uyardığını belirlemişlerdir. Fujie ve ark. (1988), sıçan kemik iliğinde i.p. enjeksiyon ile verilen potasyum bromat'ın KA'yı hızlı bir şekilde arttırdığını, 12 saat içinde maximum seviyeye ulaşan aberasyonların 24 saat içinde azaldığını belirlemişlerdir. Ayrıca bu çalışmada hem i.p. hem de ağız yoluyla verilen potasyum bromat'ın doza bağımlı aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Nakajima ve ark. (1989), MS/Ae ve CD-1 erkek farelerde potasyum bromat'ın i.p. veya oral gavaj (p.o) yoluyla verilmesinin MN oluşumuna etkisini araştırmışlar ve 18.8, 37.5, 75 ve 150 mg/kg potasyum bromat'ın i.p. yoldan; 37.5, 75, 150, 300 mg/kg potasyum bromat'ın p.o. yoldan verilmesi durumunda her iki fare dölünde de doza bağılı olarak MN oluşumunu uyardığını belirlemişlerdir. Çalışmada MS/Ae farelerinde potasyum bromat'ın i.p. veya p.o. yoldan uygulanmasının MN oluşumunda bir fark meydana getirmezken CD-1 farelerinde i.p. yoldan verilen potasyum bromat'ın MN oluşumunu daha fazla uyardığı belirlenmiştir. Benzer bir çalışma Hayashi ve ark. (1989), tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada MS/Ae ve CD-1 farelerinde potasyum bromat'ında içinde yer aldığı 17 kimyasalın i.p. veya p.o. yoldan verilmesinin MN oluşumu üzerindeki etkileri araştırılmış ve her iki fare ırkında da her iki yoldan verilen potasyum bromat'ın MN oluşumunu uyardığı belirlenmiştir. Sai ve ark. (1991), i.p. yoldan 70 mg/kg potasyum bromat alan erkek F344 sıçanlarında 6, 24, 48, 72 ve 96 saat içinde böbreklerde 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) miktarı, lipid peroksidasyonu, glutatyon miktarı ve organ ağırlığındaki değişimleri belirlemişlerdir. Bu çalışmada potasyum bromat'ın böbreklerde 24 saat içinde 8-OHdG miktarını önemli derecede arttırdığı ve bundan sonra 8-OHdG miktarının yavaş yavaş azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca lipid peroksidasyonunun 6 saat içinde önemli ölçüde arttığı ve bu artışın 48 saat devam ettiği, glutatyon miktarının 6-72 saatlerde önemli derecede arttığı ve organ ağırlığındaki değişimin 8-OHdG miktarındaki değişimle benzer olduğu

belirlenmiştir. Awogi ve ark. (1992), CD-1 farelerine i.p. yoldan verilen potasyum bromat (KBrO_3) ve potasyum kromat'ın (K_2CrO_4) MN oluşturmadaki etkilerini araştırmışlar ve her iki maddenin de pozitif sonuç verdiğini göstermişlerdir. Sai ve ark. (1992), F344 sıçanlarında i.p. yoldan verilen 60 mg/kg potasyum bromat'ın 32 saat sonra MN frekansını arttırdığını ve potasyum bromat'tan 30 dakika önce ya da sonra verilen 800 mg/kg glutatyonun ya da 400 mg/kg sistein'in MN oluşumunu önemli ölçüde ortadan kaldırdığını göstermişlerdir. Aynı çalışmalarda günlük 200 mg/kg askorbik asit'in 5 gün boyunca intragastrik (i.g.) yoldan verilmesinin de potasyum bromat tarafından MN oluşumunun uyarılmasına karşı koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir. Cho ve ark. (1993), i.p. yoldan Sprague-Dawley sıçanlarına verilen çeşitli maddelerin 48 saatte böbrek ve karaciğerde oksidatif DNA hasarı oluşturmadaki aktiviteleri karşılaştırmışlar ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) analizleri ile potasyum bromat'ın karaciğere göre böbrekte çok daha fazla oranda 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) oluşturduğunu belirlemişlerdir. McLaren ve ark. (1994), gen ekspresyonunun düzenlenmesi, DNA replikasyonu ve DNA tamiri için önemli olan çekirdek proteinlerinin translayon sonrası modifikasyonlarından birisi olan poli-ADP ribozilasyonunun ve DNA çift iplik kırıklarının uyarılmasında çeşitli böbrek kanserojenlerinin etkilerini erkek Wistar sıçanlarında araştırmışlar ve potasyum bromat'ın her iki parametreyi de uyardığını belirlemişlerdir. Sai ve ark. (1994), 2 ve 5 mM potasyum bromat'ın böbrek tübüllerde 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) ve peroksidedilmiş arakhidonik asit miktarını arttırdığını belirlemişlerdir. Suzuki ve ark. (1995), etil metanosülfonat, etil etanosülfonat, N-etil-N-nitrosoüre, vinkristin sülfonat, kolkisin ve potasyum bromat'ın (KBrO_3) ikili kombinasyonlar halinde uygulandıklarında farelerde MN oluşumunu nasıl etkilediklerini araştırmışlar ve potasyum bromat ile etil metanosülfonat'ın sinerjit etki göstermediğini belirlemişlerdir. Giri ve ark. (1999), potasyum bromat'ın böbrek ornitin dekarboksilaz aktivitesini doza bağlı olarak kontrole (tuz çözeltisi) birkaç kat arttırdığını, ^3H -timidinin DNA'ya katılımını arttırdığını, böbrekteki glutatyon ve glutatyon redüktaz aktivitesini zamana bağlı olarak sırasıyla kontrole göre % 60 ve % 40 oranında azalttığını, kandaki üre ve serum kreatin miktarını arttırdığını belirlemişler ve potasyum bromat'ın oksidanlar

oluşturarak oksidatif hasar meydana getirdiği sonucuna varmışlardır. Speit ve ark. (1999), potasyum bromat ve potasyum süperoksit'in Chinese hamster V79 hücrelerinde çeşitli testlerle genotoksik potansiyelini araştırmışlar ve her iki maddenin de Comet testinde DNA kırıklarını arttırdığını, kromozomal anormallikleri ve sitotoksiteyi uyardığını belirlemişlerdir. Ayrıca HPLC analizlerinde potasyum bromat ile muameleden sonra 8-oksodeoksiguanozin miktarında önemli ölçüde artışın meydana geldiğini belirtmişlerdir. Yine bu çalışmalarda potasyum bromat'ın HGPRT lokusunda gen mutasyonlarını uyardığı, yüksek oranda delesyon meydana getirdiği de belirtilmiştir. Cadenas ve Barja (1999), sıçanlara verilen potasyum bromat'ın 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksioyguanozin miktarını % 100'den daha fazla oranda arttırarak oksidatif DNA hasarı meydana getirdiğini ve antioksidan resveratrol'un bu artışı tamamen melatonin, vitamin E ve alfa-fenil-N-tert-bütil nitron'un kısmen ortadan kaldırdığını belirtmişlerdir. Robbiano ve ark. (1999), potasyum bromat, fenasetin, 1,4-diklorobenzen ve nitrilotriasetik asit'in sıçan ve insan böbrek hücre kültüründe MN oluşumu ve DNA hasarlarının uyarılması üzerindeki etkilerini araştırdıkları deneylerde 0.56-1.8 mM konsantrasyonlarındaki potasyum bromat'ın hem insan hem de sıçan böbrek hücre kültüründe MN frekansını, Comet testinde DNA kırıklarını doza bağlı olarak arttırdığını belirlemişlerdir. Ayrıca potasyum bromat'ın DNA'da hasar meydana getirme potansiyelinin sıçanlarda, insan böbrek hücrelerine göre daha fazla olduğu halde MN oluşumunu uyarmadaki potansiyelinin hem insanlarda hem de sıçanlarda aynı olduğu da bu çalışmalar sırasında belirlenmiştir. O'Donoghue ve ark. (1999), 12.5-100 mg/kg potasyum bromat'ın i.p. olarak uygulanmasının farelerde MN oluşumunu uyardığını belirtmişler ve potasyum bromat uygulanmasından önce 6 gün boyunca besinlerine eklenen % 0.8 oranındaki hidrokinon ile beslenen farelerde MN oluşumunun % 36 oranında azaldığını belirlemişlerdir. Ayrıca farelere oral yoldan 50 mg/kg hidrokinon verilmesinden 20 dakika sonra 50 mg/kg potasyum bromat uygulanmasının MN oluşumunu azalttığı da belirlenmiştir. Parsons ve Chipman (2000), sığır timüs DNA'sı ile $KBrO_3$ +glutasyon veya $KBrO_3$ +N-asetilsistein'in birlikte inkübe edilmesi durumunda 8-oksodeoksiguanozin konsantrasyonunda istatistiksel bakımdan önemli bir artışın meydana geldiğini belirlemişlerdir. Ayrıca

diğer indirgen bileşikler ve sülfür taşıyan bileşikler ile $KBrO_3$ 'ün kombine uygulanması durumunda DNA oksidasyonunda önemli bir artışın meydana gelmediğini belirlemişlerdir. Bunları dışında $KBrO_3$ 'ün insan beyaz kan hücrelerinde (5 mM) ve sıçan böbrek epitelyum hücrelerinde (NRK-52E) (1.5 mM) DNA iplik kırıklarını uyardığını belirlemişlerdir. Crosby ve ark. (2000), F344 sıçanlarında mezotelyum, böbrek ve tiroid bezinde kanserojen aktivite gösteren ve oksidatif stres meydana getiren potasyum bromat'ın mezotelyum hücrelerinde 4 ve 12 saatlik muamelelerde gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini *in vitro* koşullarda araştırmışlardır. Muamele edilen sıçan peritoneal mezotelyum hücrelerinde apoptosis, mitotik duraklama ve oksidatif stres ile ilgili genlerin ekspresyonunda değişmelerin olduğu cDNA ile belirlenmiştir. Buna göre oksidatif stres yanıt genlerinin (HO-1, QR, HSP70, GADD45, GADD153, p21 (WAF1/CIP16), GST's, GAPDH, TPX ve GPX-1(0) genleri); transkripsiyon regülatör genlerinin (c-jun, c-fos, jun B, c-myc ve IkappaB); protein tamir bileşenleri genlerinin (Rdelta, RC10-II, C3, RC-7, HR6B ubiquitin-katılma enzimi ve ubiquitin); DNA tamir bileşenleri genlerinin (PCNA, msh2 ve O-6 metilguanin DNA metiltransferaz); lipid peroksit kesme enzim genlerinin (PLA2) ve apoptogenik bileşen genlerinin (TNFalfa, iNOS1 ve FasL) ekspresyonunda artış meydana geldiğini belirlemişlerdir. Ayrıca araştırmacılar antiapoptotik (bcl-2), proapoptotik (bax alfa, bad ve bok) ve hücre döngüsü kontrol elementlerine ait genlerin (cyclins) ekspresyonunda azalma meydana geldiğini belirlemişlerdir. Hücre döngüsüne girmeyi engelleyen Cyclin G ve p14ink4b genlerinin ekspresyonunun arttırdığı da belirlenmiştir. Ayrıca hücre membranındaki taşıma sisteminde, membran reseptörlerinde, yağ asidi biyosentezinde ve tamir bileşenlerinde değişiklik meydana geldiği belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda F344 sıçanlarına $KBrO_3$ uygulanması ile DNA tamir mekanizmasında eksiklik, büyüme kontrolünde düzensizlik, oksidatif stres ve tamir genlerinin transkripsiyonal aktivasyonu gibi nedenlerle kanser oluşumunun meydana gelebileceği belirtilmiştir. Plewa ve ark. (2002), Chinese hamster yumurtalık (CHO) AS52 hücrelerinde içme sularının dezenfeksiyon yan ürünlerinin sitotoksik ve genotoksik etkilerini araştırmışlar ve buradan elde ettikleri sonuçları *S. typhimurium*'da mutajenite testinden elde ettikleri sonuçlar ile karşılaştırmışlardır.

Bu çalışmada maddelerin kronik sitotoksitelerine göre sıralanması bromoasetik asit >3-kloro-4-(biklorometil)-5-hidroksi-2[5H]-furon>dibromoasetik asit>kloroasetik asit>potasyum bromat ($KBrO_3$)>tribromoasetik asit>etilmetanosülfonat (pozitif kontrol)>dikloroasetik asit>trikloroasetik asit şeklinde belirlenmiştir. Bu maddelerin SCGE testinde (single-cell gel electrophoresis, Comet testi) DNA iplik kırıkları oluşturma potansiyellerine göre sıralanışını bromoasetik asit>3-kloro-4-(biklorometil)-5-hidroksi-2[5H]-furon >kloroasetik asit>dibromoasetik asit>tribromoasetik asit>etilmetanosülfonat> $KBrO_3$ şeklinde belirlemişlerdir. Burada bromoasetik asit'in $KBrO_3$ 'e göre 400 kat daha genotoksik olduğu belirtilmiştir. Salmonella testinde belirlenen bakteriyel hücre sitotoksitesi ile CHO hücrelerinde korelasyonun olmadığını belirten araştırmacılar CHO hücrelerinde sitotoksite ve genotoksite çalışmalarına ait sonuçların önemli derecede korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Harrington-Brock ve ark. (2003), fare L5178Y/Tk(+/-)-3.7.2C lenfosit hücrelerinde potasyum bromat ($KBrO_3$) ve sodyum bromat'ın ($NaBrO_3$) timidin kinaz (Tk) genindeki mutajenik etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışmada 0.6 mM potasyum bromat'ın çok düşük sitotoksisiteyle 3 mM potasyum bromat'ın yüksek sitotoksisiteyle Tk genindeki mutasyon frekansını arttırdığını belirlemişlerdir. Poul ve ark. (2004), potasyum iyodat'ın genotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla düzenledikleri Chinese hamster yumurtalık hücrelerinde *in vitro* MN testi ve Comet testinde etki karşılaştırmak amacıyla kullandıkları potasyum bromat'ın hem DNA hasarlarını hem de mikronükleuslu hücrelerin frekansını arttırdığını ve potasyum bromat tarafından uyarılan DNA hasarlarının muameleden sonra 24 saatte tamamlanmadığını ve devam ettiğini belirlemişlerdir. Umemura ve ark. (2004), beş dişi F344 sıçanına i.g. yoldan 300 mg/kg ve i.p. yoldan verilen 80 mg/kg potasyum bromat ile 48 saatlik muamelenin ardından öldürülen farelerde böbrekteki tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri ve 8-oksodeoksiguanozin miktarını belirlemişlerdir. Her iki uygulama şeklinin de bu maddelerin miktarını önemli derecede arttırdığını saptamışlardır. Bir başka deneyde 5 erkek ve dişi F344 sıçanına 4 hafta boyunca içme suyunda 0, 15, 30, 60, 125, 250 ve 500 ppm potasyum bromat verilmiştir. Bu uygulamada tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinin miktarında hem erkek hem de dişi sıçanlarda bir yükselme olmazken 8-oksodeoksiguanozin

miktarında 250 ppm ve daha yüksek konsantrasyonlarda her iki eşemde artış meydana geldiği bildirilmiştir. Ayrıca proksimal tüpte BrdUrd ile etiketlenme oranının erkek sıçanlarda 30 ppm ve üzeri; dişi sıçanlarda 250 ppm ve üzeri konsantrasyonlarda önemli ölçüde arttığı belirlenmiştir. McDorman ve ark. (2005), içme sularının dezenfeksiyon yan ürünlerinin erkek Long-Evans sıçanlarında 8-oksoguanozin oluşturma potansiyellerini araştırmışlar ve kanserojenik konsantrasyondaki (0.4 g/ml) potasyum bromat'ın böbreklerde 8-oksoguanozin oluşumunu arttırdığını belirlemişlerdir.

2.9.2. Potasyum Bromat'la Yapılan Kanserojenite Çalışmaları

Potasyum bromat'ın kimyasal maddelerle kanser uyarılmasındaki rolünü araştıran birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar şu şekilde özetlenebilir:

Kurokawa ve ark. (1983), F344 sıçanlarında distile su içinde 250 ve 500 ppm potasyum bromat'ın kanserojenik etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmalarda 500 ppm potasyum bromat'ın erkek sıçanlarda vücut ağırlığındaki artışı belirgin bir biçimde azalttığı belirlenmiştir. Erkek ve dişi farelerde hem 250 hem de 500 ppm potasyum bromat'ın kontrole göre oldukça yüksek oranda böbrek hücre tümörlerine, peritonyumda mezotelioma (hızlı gelişen kötü huylu tümör) oluşumuna neden olduğu belirtilmiştir. Kurokawa ve ark. (1984), SENCAR farelerinde çeşitli kimyasalların kimyasal maddelerle kanser oluşumunda tümör geliştirici aktiviteye sahip olup olmadıklarını araştırmak amacıyla bu maddeleri, DMBA ile başlatıldıktan sonra 51 hafta boyunca haftada iki kez ve tamamen kanserojenik aktiviteye sahip olup olmadıklarını araştırmak amacıyla bu maddeleri 51 hafta tek başlarına uygulamışlardır. Bu çalışmalarda potasyum bromat'ın hem tümör geliştirici hem de tamamen kanserojen aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Kurokawa ve ark. (1986), potasyum bromat, sodyum hipoklorit ve sodyum klorit'in *in vivo* kanser oluşturmadaki etkilerini F344 sıçanları ve B6C3F1 farelerinde araştırmışlardır. Araştırmacılar bu çalışmada sıçanlara 110 hafta uygulanan 250 veya 500 ppm potasyum bromat'ın kanserojenik potansiyele sahip olduğunu, ancak dişi sıçanlara 78 hafta uygulanan 500 veya 1000 ppm potasyum bromat'ın kanserojen aktiviteden

yoksun olduğunu belirlemişlerdir. Kurokawa ve ark. (1987), erkek F344 sıçanlarında böbreklerde tümör oluşumu için potasyum bromat ile minimum uyarma süresini ve minimum muamele süresini araştırmışlardır. Düzenlenen birinci deneyde gruplara ayrılan sıçanlar 500 ppm potasyum bromat ile 13, 26, 39, 52 ve 104 hafta muamele edilmiş ve süre bitiminde hemen öldürülmüşlerdir. Bu deneyde böbrek hücrelerinde adenoma oluşumu (lenf bezlerinin şişmesi) en erken 26 haftada belirlenmiştir. Böbreklerde adenoma ve adenokarsinoma (salgı bezlerine ait epitelyumda kötü huylu tümör), peritonyumda mezotelioma, tiroid bezinde foliküler hücre tümörleri oluşumunun 104 hafta potasyum bromat uygulanması ile önemli derecede arttığını belirlemişlerdir. Diğer deneyde ise gruplara ayrılan sıçanlara 13, 26, 39 veya 52 hafta potasyum bromat uygulamışlar ve bundan sonra 104. haftaya kadar distile su vermişlerdir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçları 104 hafta boyunca potasyum bromat alan sıçanlarla kıyaslamışlar ve adenoma ve adenokarsinoma oluşumunun her iki grupta yaklaşık olarak aynı olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışmalar sonucunda böbrek adenoma için minimum uyarma süresinin 26 hafta, minimum muamele süresinin ve dozunun 13 hafta, 4 g/kg olduğunu belirlemişlerdir. Kurokawa ve ark. (1990), potasyum bromat ile muamele edilmiş unlardan yapılan ekmeklerle beslenmenin yan etkilerinin olmamasına rağmen bu maddenin sıçanlarda kanserojenik aktiviteye sahip olduğunu, oral yoldan verildiğinde hem insanlarda hem de deney hayvanlarında nefrotoksik olduğunu, peritonyumda mezotelioma ve tiroid bezi ile böbrek hücrelerinde tümör oluşturduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca sıçanlarda ve daha az olmakla beraber fare ve hamsterlerde böbreklerde tümör oluşumunda hem başlatıcı hem geliştirici hem de tamamen kanserojenik etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bunun dışında potasyum bromat'ın mikrobiyal test sistemlerinde zayıf mutajenik aktivite gösterirken *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kromozomal anormallikleri güçlü bir şekilde uyardığını belirtmişlerdir. Ayrıca potasyum bromat'ın ürettiği aktif oksijen türlerinin özellikle sıçan böbreğinde 8-hidroksideoksiguanozin üretimine neden olarak toksik ve kanserojenik etki ortaya çıkardığını belirtmişlerdir. Kurata ve ark. (1992), erkek F344/NCr sıçanlarını kullanarak potasyum bromat'ın böbreklerde tümör oluşumunda başlatıcı dozunu araştırmışlar ve 6 haftalık sıçanlara i.g. yoldan verilen 300 mg/kg potasyum bromat'ı

takiben 4000 ppm barbital sodyum'u tümör geliştirici ajan olarak vermişlerdir. KBrO_3 +barbital sodyum ve sadece barbital sodyum alan sıçanlarda nefropati gözlenirken sadece KBrO_3 alanlarda nefropati görülmediğini belirlemişlerdir. Bu çalışma sonucunda hayvanlara verilen 300 mg/kg potasyum bromat'ın tümör başlatma aktivitesi için yeterli olmadığı sonucuna varmışlardır. DeAngelo ve ark. (1998), erkek B6C3F1 fareleri ve F344/N sıçanlarında potasyum bromat'ın kronik ve kanserojenik toksisitesini araştırmak amacıyla düzenledikleri deneylerde farelere 100 hafta boyunca 0, 0.08, 0.4 ve 0.8 g/l ve sıçanlara 0, 0.02, 0.1, 0.2 ve 0.4 g/l potasyum bromat'ı içme sularıyla birlikte vermişlerdir. Erkek farelerde potasyum bromat'ın böbrek kanserojeni olduğu, sıçanlarda böbrek, tiroid ve mezotelyum kanseri oluşturduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar kemirgenlerde en az 0.02 g/l potasyum bromat'ın su içinde verilmesinin kanserojen etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Wolf ve ark. (1998), potasyum bromat'ın sıçanlarda böbrek, tiroid ve mezotelyum kanserine ve erkek farelerde böbrek kanserine sebep olduğunu belirterek Fischer 344 (F344) sıçanlarında potasyum bromat tarafından tümör uyarılmasının zaman ve konsantrasyonla olan ilişkisini belirlemek amacıyla deney düzenlemişler ve 0, 0.02, 0.1, 0.2 ve 0.4 g/l konsantrasyonundaki potasyum bromat'ı F344 sıçanlarının içme sularına ilave ederek 12, 26, 52, 78, 100 hafta boyunca muamele etmişlerdir. Böbrek hücre tümörleri ile mezotelioma tümörlerinin yüksek dozda 52 haftada, tiroid tümörlerinin 26 haftada 0.1 ve 0.2 g/l potasyum bromat alan gruplarda ortaya çıktığını belirlemişlerdir. Khan ve Sultana (2004), i.p. olarak verilen 125 mg/kg potasyum bromat'ın Wistar sıçanlarında böbrek glutatyon içeriğinin, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz, glikoz-6-fosfat dehidrojenaz gibi böbreklerdeki antioksidan enzim aktivitesinin ve glutatyon-S-trasferaz ve kinon redüktaz gibi faz 2 metabolize enzim aktivitesinin azalmasına; ksantin oksidaz, lipid peroksidasyonu, gama-glutamil transpeptidaz ve hidrojen peroksit üretiminin artmasına neden olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca potasyum bromat'ın kanda üre seviyesi ile serum kreatin miktarını ve ornitin dekarboksilaz aktivitesi ile ^3H -timidin'in böbrek DNA'sına girişi gibi tümör geliştirici aktiviteye ait belirteç parametreleri arttırdığını belirlemişlerdir. Wistar sıçanlarına oral yoldan verilen 5 mg/kg soya izoflavon'un KBrO_3 aracılığıyla ortaya çıkan oksidatif stres, toksisite ve

hücre proliferasyon cevabını iyileştirdiğini saptamışlardır. Khan ve ark. (2003 ve 2004), yaptıkları çalışmalarda da potasyum bromat'ın yukarıda sözü edilen parametreleri aynı şekilde etkileyerek oksidatif strese neden olduğunu, tümör geliştirici aktivite gösterdiğini ve toksisite meydana getirdiğini belirtmişler, 10 ve 20 mg/kg kumarin ile 50 ve 100 mg/kg *Nigella sativa* (çörek otu) özütlerinin bu etkilere karşı koruyucu aktiviteye sahip olduğunu saptamışlardır.

2.10. Potasyum İyodat'la Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Potasyum iyodat oksitleyici özelliği sayesinde undaki gluten proteinlerin daha düzgün bir yapıya kavuşmasını sağlamak amacıyla kullanılan un olgunlaştırıcı kimyasallar arasında yer almaktadır.

Parsons ve Chipman (2000), potasyum bromat'ın genetik toksisitesini araştırdıkları çalışmalarda sığır timüs DNA'sında potasyum iyodat'ın 8-oxodG oluşturmadığını yani oksidatif DNA hasarlarını uyarmadığını belirtmişlerdir. Poul ve ark. (2004), potasyum iyodat'ın genotoksik etkilerini araştırmak ve bu etkiyi potasyum bromat ve potasyum klorat ile karşılaştırmak için CHO hücrelerinde MN testi ile Comet testini kullanmışlardır. Araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda 10 mM'e kadar potasyum iyodat'ın Comet testinde DNA hasarı oluşturmadığını ve bu sonucun MN testi ile tutarlı olduğunu saptamışlardır. Ayrıca bu çalışmalarda Comet testinde 10 mM'e kadar potasyum klorat, potasyum iyodit, potasyum bromit ve potasyum klorit'inde negatif sonuç verdiği ancak potasyum bromat ile pozitif sonuç elde edildiği bildirilmiştir.

2.11. Potasyum Sorbat'la Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Potasyum sorbat ekmekte antimikrobiyal madde olarak kullanılmaktadır.

Abe ve Sasaki (1977), 33 çeşit kimyasal maddenin genotoksik etkilerini Chinese hamster hücre kültüründe KKD ve KA testleri ile araştırmışlar ve potasyum sorbat ve sodyum benzoat'ın sadece çok yüksek dozlarda KA ve KKD'yi uyardığını belirlemişlerdir. Hasegawa ve ark. (1984), sorbik asit ve onun potasyum ve sodyum

tuzlarının etkilerini Chinese hamster V79 hücrelerinde gen mutasyonu, KKD ve KA testleri ile araştırmışlar ve sodyum sorbat'ın KA ve KKD'yi önemli derecede uyardığını ve doza bağlı olarak 6-tiyoguanin dirençlilik genindeki mutasyonları arttırdığını saptamışlardır. Ancak bu etkinin pozitif kontrol olarak kullanılan MNNG'den çok daha az olduğunu belirlemişlerdir. Sorbik asit ve potasyum sorbat'ın ise sadece yüksek konsantrasyonlarda KA uyardığını, KKD artışının kontrole göre 1.2 kat olduğunu ve 6-tiyoguanin dirençlilik genindeki mutasyonları uyarmadığını belirlemişlerdir. Munzner ve ark. (1990), potasyum sorbat ve sodyum sorbat'ın genotoksik etkilerini Ames testi, Chinese hamster yumurtalık hücrelerinde KA, KKD ve HGPRT testi, Chinese hamster ve fare kemik iliği hücrelerinde MN testi ile araştırmışlar ve her iki kimyasalın *in vitro* testlerde bir genotoksisite göstermediğini, *in vivo* testlerde ise bu katkı maddelerinin taze hazırlanmış eriyiklerinin hiçbir klastojenik etki göstermemesine rağmen bekletilmiş sodyum sorbat eriyiğinin KA ve MN uyardığını fakat KKD'yi etkilemediğini bildirmişlerdir. Schlatter ve ark. (1992), sodyum sorbat, potasyum sorbat ve sodyum sorbat'ın oksidasyon ürünü olan 4,5-epoksi-2-hekzenoik asit'in genotoksik aktivitesini V79 Chinese hamster hücrelerinde ve *Drosophila melanogaster* somatik hücrelerinde araştırmışlardır. *Drosophila*'da sadece oksidasyon ürününün zayıf genotoksik etki gösterdiğini, V79 hücrelerinde taze hazırlanmış sodyum sorbat'ın en yüksek konsantrasyonda (2.5 mg/ml), 24 saatlik muamelede mitozu durdurarak sitotoksik etki gösterdiğini ve bu etkinin dönüşümlü olduğunu, potasyum sorbat'ın (2.5 mg/ml) ise etkisiz olduğunu belirlemişlerdir. Jung ve ark. (1992), yaptıkları çalışmalarda farelere oral yoldan verilen 500 mg/kg sorbik asit'in MN ve KKD uyarmadığını, insan A549 hücrelerinde kontrolsüz DNA sentez testinde DNA tamirini uyarmadığını, i.p. yoldan sıçanlara verilen 400-1200 mg/kg potasyum sorbat'ın karaciğer hücrelerinden elde edilen DNA profilini değiştirmedeğini, 1-100 µg/ml potasyum sorbat'ın DNA tek iplik kırıklarını uyarmadığını (+/-S9 mix) belirlemişler ve sorbik asit ile potasyum sorbat'ın *in vivo* ve *in vitro* genotoksik olmadığını belirtmişlerdir. Kitano ve ark. (2002), potasyum sorbat, askorbik asit ve demir tuzlarının tek başlarına uygulandıklarında Ames testinde negatif sonuç verdiğini belirlemişlerdir. Araştırmacılar bu maddelerin birlikte uygulanması durumunda *S. typhimurium*'un

TA98 (+/-S9 mix) suşunda mutasyon uyarmadıklarını, TA100 suşunda ise S9 mix varken mutajenik aktivite göstermemelerine rağmen S9 mix yokken doza ve zamana bağlı olarak mutajenik etki gösterdiklerini belirlemişlerdir.

2.12. Propiyonik Asit'le Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Geniş bir pH aralığında etkin olan propiyonik asit, küf ve rop* etkeni bakterilerin gelişimini kontrol altına almak amacıyla kullanılmaktadır.

Basler ve ark. (1987), gıda katkı maddesi olan propiyonik asit'in mutajenik aktivitesini *E. coli* DNA tamir testi ve SOS testi, Salmonella/Mikrozom testi, *in vitro* KKD testi ve *in vivo* MN testi ile araştırmışlar ve *E. coli* DNA tamir testi dışındaki testlerde negatif sonuçların elde edildiğini bildirmişlerdir. Surjan (1989), *Drosophila melanogaster*'de 16 kimyasal maddenin mutajenik aktivitesini araştırmış ve 2-2(2,4-diklorofenoksi) propiyonik asit'in *Drosophila*'da mitotik rekombinasyonlara neden olduğunu belirlemiştir. Sipi ve ark. (1992), içlerinde propiyonik asit'inde bulunduğu 10 maddenin mutajenik aktivitelerini belirlemek için insan lenfositlerinde *in vitro* KKD testini kullanmışlar ve 2.5 mM konsantrasyondaki propiyonik asit'in kardeş kromatid değişimlerinde artış meydana getirdiğini belirlemişlerdir. Philipose ve ark. (1997), ibuprofen, ketoprofen ve naproksen olarak bilinen üç propiyonik asit türevinin mutajenik aktivitelerini TA97, TA100 ve TA102 suşlarında Ames testiyle ve fare kemik iliğinde *in vivo* KKD testiyle araştırmışlardır. Araştırmacılar anti-inflamatuar ilaç olarak kullanılan üç ilacında Ames testinde mutajenik etki göstermediği, *in vivo* KKD testinde ise zayıf genotoksik aktivite gösterdikleri belirlemişlerdir.

*Rop, sporlarının ısıya dirençli olması nedeniyle *Bacillus mesentericus* bakterisinin gelişmesi sonucunda ortaya çıkan, undaki nişasta ve proteinin hidrolizi ile ekmeğin iç kısmındaki proteinlerin ve nişastaların birbirinden ayrılması sonucunda oluşan, ekmek parçalandığı zaman, yapışkan, yumuşak bir maddenin berrak ip-benzeri lifler halinde dışarı çıkması ile belirlenen bir hastalıktır. Yapışkan materyal, nişastaya enzimlerin etkileri sonucu ortaya çıkan bazı basit şekerler ve gam oluşumunun bir sonucu olup ekmekte ortaya çıkan tipik koku da proteinlerin parçalanması nedeniyle ortaya çıkmaktadır. *Bacillus mesentericus* dışında *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus* ve *B. cereus* bakterileri de ekmekte rop oluşumuna neden olabilmektedir.

2.13. Sodyum Benzoat'la Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Abe ve Sasaki (1977), içlerinde ekmekte koruyucu olarak kullanılan sodyum benzoat'ında yer aldığı 33 kimyasalın mutajenik etkilerini Chinese hamster hücrelerinde KKD ve KA testleri ile araştırmışlar ve bu maddenin yüksek dozlarda KA ve KKD uyardığını belirtmişlerdir. Ishidate ve Odashima (1977), Chinese hamster hücrelerinde 134 bileşiğin mutajenik aktivitelerini *in vitro* KA testi ile araştırmışlar ve sodyum benzoat'ın pozitif sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Njagi ve Gopalan (1982), sodyum sülfid ve sodyum benzoat'ın *Vicia faba* kök hücrelerinde doza bağlı olarak mitotik indeksi düşürdüğünü, anafazda köprü oluşumunu uyardığını, interfaz nükleusunda kromatin erezyonuna neden olduğunu ve 23-46 saatte kromozom konfigürasyonunda ve mitotik indekste düzelmelerin meydana geldiğini, bu iyileşmelerin kromozom köprülerinde ve mikronükleus oluşumlarında da görüldüğünü belirlemişlerdir. Kassie ve ark. (1999), benzil izotiyosiyanat'ın *in vitro* testlerde (*E. coli* DNA tamir testi, insan HepG2 hücrelerinde MN testi, gasrointestinal hücrelerde ve hepatositlerde Comet testinde (SCGE=single cell gel electrophoresis) doza bağlı olarak genotoksik aktivite gösterdiği kemirgenlerle yapılan *in vivo* çalışmalarda daha az etkili olduğunu, farelerde yüksek dozlarda (90-270 mg/kg) çeşitli organlarda orta derecede genotoksisite oluşturduğu, sıçanlarda SCGE testinde DNA kırıklarının 220 mg/kg dozunda görüldüğünü belirtmişler ve benzil izotiyosiyanat tarafından oluşturulan reaktif tiyobarbitürik asit'in HepG2 hücrelerinde oluşturduğu DNA hasarının alfa-tokoferol, askorbik asit, sodyum benzoat ve beta-karoten tarafından ortadan kaldırıldığını bildirmişlerdir.

2.14. Sodyum Metabisülfid'le Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Gıdalarda genellikle antimikrobiyal madde olarak kullanılan sodyum metabisülfid unlarda daha çok indirgen madde olarak tercih edilen ve hamurun hızlı bir şekilde gelişmesini sağlayan maddeler arasında yer almaktadır.

Rencüzoğulları ve ark. (2001a), sodyum metabisülfid'in *Allium cepa*'da mitozdaki anormallikleri arttırdığını ve mitotik indeksi düşürdüğünü saptamışlardır.

Rencüzoğulları ve ark. (2001b), sodyum metabisülfid'in mutajenik aktivitesini insan lenfositlerinde KA ve KKD testleri ile araştırmışlar ve bu maddenin kullanılan tüm dozlarda (75, 150, 300 µg/ml) hem 24 hem de 48 saatte KKD ve KA'yı attırdığını, 150 ve 300 µg/ml konsantrasyonlarında 24 ve 48 saatlik muamelelerde mitotik indeks (MI) ve replikasyon indeksini (RI) azalttığını belirlemişlerdir.

2.15. Sorbik Asit'le Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Sorbik asit unlara ilave edilen antimikrobiyal maddeler arasında yer almaktadır.

Namiki ve ark. (1980), sorbik asit ve sodyum nitrit'in aktivitesini Ames ve rekombinasyon testleri ile araştırmışlar ve en yüksek mutajenitenin pH 3.5-4.2 arasında olduğunu belirtmişlerdir. Hasegawa ve ark. (1984), sorbik asit ve onun sodyum ve potasyum tuzlarının genotoksik etkilerini Chinese hamster V79 hücrelerinde KKD, KA ve gen mutasyon testleri ile araştırmışlar ve sorbik asit'in çok yüksek dozlarda KA uyardığını ve KKD'de kontrole göre 1.2 oranında bir artış meydana getirdiğini ve 6-tiyoguanin dirençlilik geninde mutasyon oluşturmadığını bildirmişlerdir. Banerjee ve Giri (1986), 30 gün boyunca farelere oral yoldan tek başına ya da sodyum nitrit ile birlikte verilen sorbik asit'in genotoksik etkilerini araştırmışlar ve 15 mg/kg sorbik asit'in mitotik indeksi arttırdığını ve kromozom hasarları oluşturmadığını saptamışlardır. Mukherjee ve ark. (1988), fare kemik iliği hücrelerinde sodyum nitrit ve sorbik asit'in ayrı ayrı ya da bir arada uygulanmaları durumunda ortaya çıkan genotoksik aktiviteyi *in vivo* KKD ve MN testleri ile araştırmışlardır. Araştırmacılar KKD testinde sorbik asit'in yüksek konsantrasyonlarda, sodyum nitrit'in kullanılan tüm dozlarda kontrole göre KKD'yi arttırdığını, 1:1 oranda birlikte uygulanmalarının görülen etkiyi arttırdığını belirlemişlerdir. MN testinde ise sorbik asit'in en yüksek dozda (150 mg/kg), sodyum nitrit'in ise tüm dozlarda mikronükleus oluşumunu arttırdığını ve kombine uygulandıklarında sinerjit aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir. Walker (1990), sorbik asit ve onun tuzlarının akut ve kronik toksisite, kanserojenite, üreme ve teratojenite testlerinin yapılmış olduğunu, memelilerde çok az düzeyde toksisite meydana getirdiğini, kanserojen

aktiviteden yoksun olduğunu, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda mutajen ve klastojen aktivite göstermediğini belirtmiştir. Jung ve ark. (1992), yaptıkları çalışmalarda farelere oral yoldan verilen sorbik asit'in MN ve KKD uyarmadığını, *in vivo* insan A549 hücrelerinde kontrolsüz DNA sentez testinde DNA tamirini uyarmadığını saptamışlar ve sorbik asit'in *in vivo* ve *in vitro* genotoksik aktivite göstermediğini belirtmişlerdir. Schiffman ve Schlatter (1992), sorbik asit, potasyum sorbat ve sodyum sorbat'ın genotoksik potansiyellerini Syrian hamster embriyo (SHE) fibroblast hücrelerinde *in vitro* MN testi ve SHE hücre transformasyon testi ile araştırmışlar ve sorbik asit, potasyum sorbat ve sodyum sorbat'ın her iki sistemde de genotoksik aktivite göstermediğini ancak bekletilmiş sodyum sorbat eriyiğinin her iki sistemde de pozitif sonuç verdiğini belirlemişlerdir. Ferrand ve ark. (2000a, b, c ve d) sorbik asit ve onun tuzları olan potasyum sorbat ve sodyum sorbat'ın gıdalara koruyucu madde olarak ilave edildiğini ve sorbik asit'in gıdaların işlenmesi sırasında meydana gelebilecek sıklık türevlerinin çeşitli amin grupları ile reaksiyona girerek mutajenite oluşturabileceğini belirtmişlerdir. Bu doğrultuda HeLa hücreleri ve plazmid DNA'sı ile yaptıkları genotoksisite çalışmalarda, Ames testinde ve SOS testinde oluşan ürünlerden hiç birinin mutajenik aktiviteye sahip olmadığını belirtmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada materyal olarak sağlıklı ve sigara içmeyen aynı yaşlarda iki bayan (24 ve 25 yaşlarında) ve iki erkekten (25 yaşlarında) alınan periferik kan ve test maddesi olarak benzol peroksit kullanılmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.1.1. Benzol Peroksit

3.1.1.1.(1). Benzol Peroksit'in Kullanım Alanları

Benzol peroksit, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı (FAO) tarafından birçok ülkede kullanılmasına izin verilen gıda katkı maddelerinden birisidir (Food and Agriculture Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives, 2001). Benzol peroksit'in gıda katkı maddesi olarak kullanım alanlarından en önemlisi un ve peynir gibi yiyecekleri beyazlatmak amacıyla kullanılmasıdır. Katı granüller şeklinde, çeşitli saflıklarda üretilen benzol peroksit un beyazlatıcı olarak genellikle % 22 saflıkta kullanılmaktadır. Unların daha beyaz ve kaliteli görünebilmesi için kullanılan benzol peroksit miktarını belirlemek için Saiz ve ark. (2001) tarafından bir çalışma düzenlenmiştir. Bu çalışmada değirmenlerde öğütülen unların, içerdikleri karotenoidlerden dolayı soluk sarı renkli olduğu ve serbest radikaller oluşturan benzol peroksit'in undaki karotenoidlerin oksitlenmesini sağlayarak daha az renkli bileşiklerin ortaya çıkmasına neden olduğu belirtilmektedir. Araştırmacılar beyazlatma işlemine başlamak için unlara 150 ppm benzol peroksit ilave edildiğini, HPLC metodu ile incelemeler sonucunda beyazlatma ajanı ile temastan dokuz gün sonra

benzol peroksit'in son konsantrasyonunun 11 ppm olarak belirlendiğini ve sonradan belirlenemeyen seviyelere ulaştığını belirtmişlerdir.

Ayrıca benzol peroksit, Assiago peyniri, Gorgonzola peyniri, Parmesan ve Reggiano peyniri, Swiss ve Emmentaler peyniri, Provolone peyniri ve Romano peyniri gibi bazı peynir türlerinin renginin açılması işlemlerinde de kullanılmaktadır. Benzol peroksit'in bu amaçla kullanımına Amerika ve Kanada'da izin verilmektedir (Duydu, 2005).

Bunların dışında benzol peroksit bakteri üremesini engelleyici aktiviteye sahiptir. Cove ve Holland (1983), yaptıkları deneysel çalışmalar sonucunda benzol peroksit'in *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus capitis*, *Stap. epidermidis*, *Stap. hominis*, *Prop. avidum*, *Prop. granulosum* ve *Pityrosporum ovale* bakterilerinde üremeyi durdurucu (germisidal) aktiviteye sahip olduğunu belirlemişlerdir. Bu nedenle benzol peroksit akneye neden olan *P. acnes* bakterisini yok etmek amacıyla 40 yılı aşkın süredir kullanılmaktadır. Benzol peroksit bu amaçla pek çok kremde, losyonda ve jelde ya tek başına ya da retinoids, clindamycin, eritromycin gibi ajanlarla kombine olarak kullanılmaktadır.

Bencini (1994), benzol peroksit'in ameliyatlı bölgelerdeki yara enfeksiyonlarının önlenmesinde ucuz ve etkili bir ajan olarak kullanılabileceğini belirtmiştir.

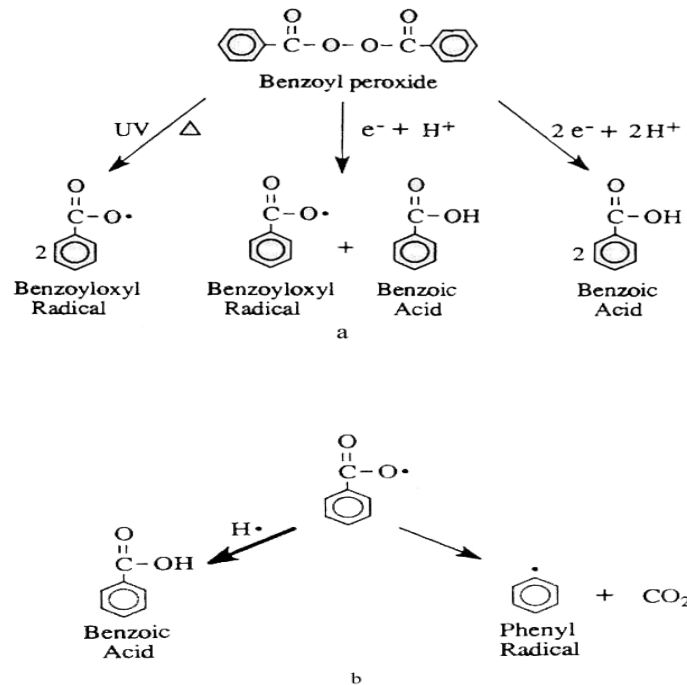
Benzol peroksit plastik endüstrisinde polimerizasyon başlatıcısı olarak da kullanım alanı bulmaktadır. Bu şekilde benzol peroksit kullanımı daha çok plastik, silikon, fiberglas, stropor ve yapıştırıcı üretiminde görülmektedir. Ayrıca dişçilikte kullanılan dental methyl methacrylate (yapıştırıcı) yapımında benzol peroksit'ten yararlanılmaktadır. Plastik endüstrisinde genellikle % 75 saflıktaki benzol peroksit kullanılmaktadır (SIDnitial Assessment Report, 2002).

Bunların dışında benzol peroksit, Danimarka, İsveç ve Norveç gibi ülkelerde tekstil endüstrisinde, boya endüstrisinde, inşaat malzemelerinde, kozmetik ürünlerde kullanım alanı bulmaktadır (SIDnitial Assessment Report, 2002).

3.1.1.1.(2).Benzol Peroksit'in Kimyasal Parçalanması ve Biyolojik Metabolizması

Yapılan çalışmalar benzol peroksit'in serbest radikal oluşturan bir madde olduğunu göstermiştir. Benzol peroksit'in UV ışığı ve sıcaklık etkisiyle ya da elektron bombardımanı ile parçalanarak benzoloksil radikalleri ve benzoik asit oluşturduğu gösterilmiştir (Şekil 3.1 a) (Swain ve ark. 1958; Janzen ve ark. 1972; Binder ve ark. 1995'ten).

Yapılan çalışmalarda neonatal fare keratinositlerinde benzol peroksit radyoaktif olarak işaretlenmiş ($[^{14}\text{C}\text{-carbonyl}]$ - benzol peroksit) ve oluşturduğu metabolitler belirlenmiştir. Araştırmacılar Cu^{+1} 'in elektron donorü olarak kullanıldığı bu reaksiyonlarda benzol peroksit'in benzoloksil radikallerine dönüşebildiğini, bu metabolitinde ya H ayrılması ile benzoik asit'e ya da dekarboksilasyon ile fenil radikalleri ve CO_2 'e dönüştüğünü göstermişlerdir (Şekil 3.1 b) (Kensler ve ark. 1988; Swauger, 1991; Binder ve ark. 1995'ten).



Şekil 3.1. Benzol Peroksit'in Kimyasal Olarak Parçalanması ve Biyolojik Metabolizması. **a.** Kimyasal Parçalanma, **b.** Biyolojik Parçalanma (Kensler ve ark. 1988; Swauger, 1991; Binder ve ark. 1995'ten)

3.1.1.1.(3). Benzol Peroksit'in Vücuda Giriş Yolları

Benzol peroksit üç yolla vücuda girmektedir:

- 1) Ağız yoluyla
- 2) Solunum yoluyla
- 3) Akne tedavisinde kullanılmasıyla deri yoluyla.

Hem insanlarda hem de hayvanlarda benzol peroksit'in derideki gözeneklerden keratin tabakaya (stratum korneum tabakası) geçtiği ve hızlı bir şekilde benzoik asit'e dönüştüğü gösterilmiştir. Ayrıca çalışmalarda bu metabolitin benzoat şeklinde derideki kan damarlarından emilerek kan dolaşımına girdiği ve böbrekler yoluyla atıldığı da saptanmıştır (Nacht ve ark. 1981; Yeung ve ark. 1983; Seubert ve ark. 1984; Morsches ve Holzmann, 1982).

3.1.1.1.(4). Benzol Peroksit'in Canlılara Etkisi

Soluk alıp verme yoluyla % 78 saflıkta 24.3 mg/ml benzol peroksit'e 4 saat maruz kalan erkek sıçanlarda gözlerde kısılma, tükürük salgılama, nefes darlığı, gözlerin yaşarması, kızarıklık, solunum oranında ve motor aktivitelerde hızlanıp yavaşlama gibi değişimlerin gözlemlendiği belirtilmiştir (Wazeter ve ark. 1973: SIDnitial Assessment Report, 2002'den).

Farklı araştırmacılar tarafından tavşanlarda, farelerde ve kobaylarda yapılan çalışmalarda benzol peroksit'in deride irritasyonlara neden olduğu belirtilmiştir. Tavşanlarda yapılan çalışmalarda % 70'lik benzol peroksit'in uygulanmasından sonra 5 dakika içinde yıkanması sonucu gözlerde irritasyonlara neden olmadığı fakat yıkanarak uzaklaştırılmaması durumunda 24 saat sonra gözlerde de irritasyonlar oluşturabileceği belirtilmektedir. Yapılan bu çalışmalar sonucunda benzol peroksit'in hafif irritant etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (SIDnitial Assessment Report, 2002).

Benzol peroksit'in üreme/gelişme üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla yapılan çalışmalarda, gavaj yöntemiyle 29 gün boyunca 1,000 mg/kg benzol peroksit'in tekrarlanan uygulamalarının dişi farelerde çok büyük değişimler

oluşturmazken erkek farelerde testis ve epididimis ağırlığında azalmalara neden olduğu belirtilmiştir (SIDnitial Assessment Report, 2002).

Tedavi amacıyla veya ilgili endüstri dallarında çalışma sonucunda benzol peroksit'e maruz kalan insanlarda da bu maddenin allerjik etkiye sahip olduğu belirtilmiştir. Daha çok fırıncılar ve dişçiler arasında görülen bu allerjik reaksiyonların % 5-10 arasında benzol peroksit içeren akne ilaçlarına karşı da gelişebileceği bildirilmiştir (SIDnitial Assessment Report, 2002).

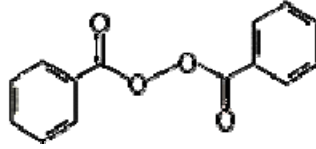
3.1.1.1.(5). Benzol Peroksit'in Özellikleri (Merck)

Benzol peroksit serbest radikaller oluşturan güçlü bir oksitleyici ajandır.

Kimyasal adı: Benzoyl peroxide

Kapalı formülü: $C_{14}H_{10}O_4$ yahut $(C_6H_5CO)_2O_2$

Açık Formülü:



Molekül ağırlığı: 242.24 g/mol

Yoğunluğu: 1.33 g/cm³ (25 °C)

Kaynama noktası: 105 °C'nin üstünde patlayıcıdır.

Erime noktası: 104-106 °C

CAS No: 94-36-0

Merck Cat No: 8.01641.0100

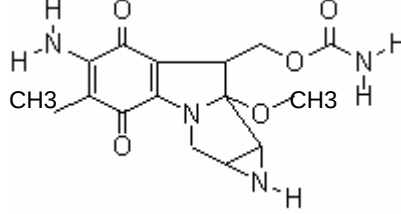
3.1.1.2. Mitomycin C (MMC) (Kyowa)

Mitomycin C, bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Kimyasal adı: Mitomycin C

Kapalı formülü: C₁₅H₁₈N₄O₅

Açık Formülü:



Molekül ağırlığı: 334.327 g/mol

Erime noktası: 360 °C

CAS No: 50-07-7

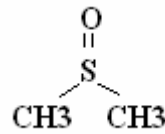
3.1.1.3. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma)

DMSO, bu çalışmada benzol peroksit'in eriticisi olarak kullanılmıştır.

Kimyasal adı: Dimethyl Sulfoxide (DMSO)

Kapalı formülü: C₂H₆SO yahut (CH₃)₂SO

Açık Formülü:



Molekül ağırlığı: 78.13

Yoğunluğu: 1.1 g/cm³

Kaynama noktası: 189 °C

Erime noktası: 18.4-190 °C

Saflık düzeyi: ≥99.9

CAS NO: 67-68-5

Sigma No: 8418

3.1.1.4. Kromozom Medyumu

Biochrom firmasının ürettiği Chromosome Medium B (Cat. No. F 5023), hücre kültürü yapmak için kullanılmıştır. Chromosom Medium B'nin her litresinde aşağıdaki bileşimler belirtilen miktarlarda bulunmaktadır:

MEM JOKLIK with

Non essential Amino Acids.....	850 ml
Heparin.....	25.000 E
Penicillin G, Sodium Salt.....	75.000 E
Streptomycin Sulphate.....	50 mg
Phytohemagglutinin L.....	2.5 mg

Bu medyum her tüpte 2.5 ml olacak şekilde steril şartlarda paylaştırılmış ve bu şekilde kullanılmıştır. Kültür tüpleri steril olarak temin edilmiştir.

3.1.1.5. Kolkisin (Sigma)

Kolkisin (Colchicine), preparatların hazırlanmasında mitotik zehir olarak kullanılmıştır. Kolkisin eriyiği steril saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom medyumunun her mililitresinde 0.06 µg olacak şekilde (0.06 µg/ml) 2.5 ml'lik kromozom medyumuna ilave edilmiştir. Kolkisine ait özellikler aşağıda verilmiştir:

Kimyasal adı: Colchicine

Kapalı formülü: C₂₂H₂₅NO₆

Molekül ağırlığı: 399.4

Etil asetat içeriği: % 3.4

Kloroform içeriği: < % 0.1

Sigma No: C-9754

3.1.1.6. Hipotonik Eriyik

% 0.4'lük KCl (Merck) hipotonik eriyik olarak kullanılmıştır. Eriyik bidistile su içerisinde stok halinde hazırlanıp ağzı kapalı cam kap içerisinde buzdolabında saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık bir saat önce yeterli miktarda hipotonik eriyik alınmış, 37 °C'deki inkübatörde ısıtılıp kullanılmıştır.

3.1.1.7. Fiksatif

KKD ve KA deneylerinde 1 hacim asetik asit' in 3 hacim metanol ile karıştırılması sonucu hazırlanan fiksatif kullanılmıştır.

MN deneyleri için birinci fiksatif, 5 hacim metanol:1 hacim glasiyal asetik asit ve 6 hacim % 0.9 NaCl karıştırılarak hazırlanmıştır. Diğer iki fiksatif ise 1 hacim glasiyal asetik asit ve 5 hacim metanol'ün karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Fiksatifler, her preparasyonda kullanılmadan iki saat önce hazırlanarak buzdolabında saklanmıştır.

3.1.1.8. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd) (Sigma)

BrdUrd kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını belirleyebilmek amacıyla kullanılmıştır. BrdUrd eriyiği steril saf su içerisinde hazırlanmıştır. Bu eriyikten 50 µl alınarak kültür tüplerine ilave edildiğinde kültür, son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde BrdUrd içermiştir.

Kimyasal adı: 5'-Bromo-2'-deoxyuridine

Kapalı formülü: C₉H₁₁BrN₂O₅

Molekül ağırlığı: 307.10 g/mol

Erime noktası: 191-194 °C

CAS No: 59-14-3

Sigma No: B 5002

3.1.1.9. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer)

Bu eriyik, Sorensen Tampon A ve Sorensen Tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmıştır ve bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanılmıştır.

Hazırlanışı

Sorensen Tampon A: 11.34 gr KH_2PO_4 250 ml saf su içerisinde eritilmiştir (pH=4.8)

Sorensen Tampon B: 14.83 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 250 ml saf su içerisinde eritilmiştir (pH=9.3)

KKD'yi incelemek amacıyla preparat yapımı sırasında preparatlar Sorensen tamponu içerisinde UV lambası ile ışınlandırılmıştır. Ayrıca bu tampon % 5'lik Giemsa boyası hazırlanmasında da kullanılmıştır.

3.1.1.10. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği

11.05 gr tri sodyum sitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) tartılarak bir miktar saf su içerisinde eritilmiştir. Daha sonra 21.9 gr NaCl tartılarak yine saf su içerisinde ancak ayrı bir kaptaki eritilmiştir. İki eriyik, bir şişeye dökülerek iyice karıştırılmış ve üzerine 500 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir. Hazırlanan bu stok eriyik 5 x SSC'dir ve bu eriyik buzdolabında saklanmıştır. KKD'yi incelemek için deney yapılırken bu stoktan 20 ml alınarak üzeri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanmış ve elde edilen 1 x SSC eriyiği kullanılmıştır.

3.1.1.11. Giemsa (Merck)

Giemsa boyası Merck firmasından (Cat. No. 9204) temin edilmiş olup, deneylerimizde Sorensen tamponu içinde hazırlanmış % 5'lik boya eriyiği kromozomları ve MN testinde nükleusları boyamak için kullanılmıştır.

3.1.1.12. Entellan (Merck)

Hazırlanan preparatları daimi hale getirmek amacıyla lam ile lameli birbirine yapıştırmak için kullanılan yapışkan sıvıdır (Cat. No. 7961).

3.1.1.13. Nitrik Asit (HNO₃)

Lamları temizlemek amacıyla 1N HNO₃ çözeltisi kullanılmıştır. Plastik şişede saklanarak her defasında tekrar tekrar kullanılmıştır.

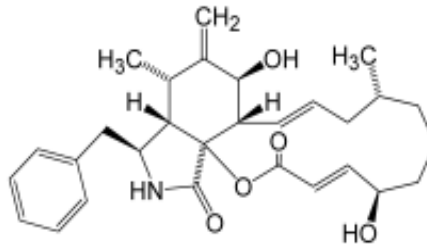
3.1.1.14. Cytochalasin B (Sigma)

Mikronükleus (MN) testinde, hücre bölünmesi sırasında sitokinezi engellemek ve iki nükleuslu hücreler oluşturmak amacıyla kullanılmıştır.

Kimyasal adı: Cytochalasin B

Kapalı formülü: C₂₉H₃₇NO₅

Açık Formülü:



Molekül ağırlığı: 479.61 g/mol

Erime noktası: 218-223 °C

Kaynama noktası: 218-223 °C

Safılık düzeyi: %98

CAS No: 14930-96-2

Sigma No: C-6762

3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları

3.1.2.1 Hassas Terazı

Hava akımlarına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0.0001 gr hassasiyetindeki GEC AVERY marka terazi kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

3.1.2.2. Santrifüj

Çalışmalarda rotor çapı 18 cm, 4000 rpm'e kadar yükselebilen devir hızı, 99 dakikalık zaman ayarlayıcı ve 28 tüp kapasiteli HETTICH UNIVERSAL marka santrifüj kullanılmıştır.

3.1.2.3. Mikroskop

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan MICROS AUSTRIA marka ışık mikroskobu preparatları incelemek için kullanılmıştır.

3.1.2.4. İnkübatör

Hücre kültürünün yapılmasında ve bazı eriyiklerin 37 °C'ye kadar ısıtılmasında DEDEOĞLU marka 0 °C -100 °C ayarlanabilir inkübatör kullanılmıştır.

3.2. Lamların Temizlenmesi

Kültür süresinin bitiminden iki gün önce etiketli olan lamlar dik şaleye dizilmiş ve şale, lamların üzeri iyice örtülecek şekilde 1 N HNO₃ çözeltisi ile doldurulmuştur. Şalenin ağzı kapatılarak 24 saat bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda lamlar, yarım saat boyunca akan çeşme suyunda iyice yıkanmıştır. 3-4 defa saf sudan geçirildikten sonra şale saf su ile doldurularak buzdolabında saklanmıştır.

3.3. Sterilizasyon

3.3.1. BrdUrd Eriyiğinin Sterilizasyonu

BrdUrd eriyiği steril bir erlen içinde bulunan ve steril olan saf su içinde 5'-bromo-2'-deoxyuridine maddesinin eritilmesiyle hazırlanmıştır. Bu eriyik ispiro ocağı ve Flow kabini sayesinde sağlanan steril şartlarda por çapı 0.2 µm olan bakteri filtresinden (Sartorius, membran filtre) geçirilerek steril edilmiştir. Sonra ağzı vida kapaklı steril kültür tüplerine konan bu eriyik, etrafı siyah bant ile kapatılarak buzdolabında saklanmıştır.

3.3.2. Saf Suyun Sterilizasyonu

Temiz bir erlene saf su doldurularak erlenin ağzı pamukla iyice kapatılmıştır. Sterilizasyon esnasında otoklavdaki buhardan pamuğun ıslanmaması için üzeri alüminyum kâğıdı ile örtülmüştür. Erlenindeki saf su otoklavda 1.2 atm. buhar basıncında ve 120 °C'de 15 dakika steril edilmiştir.

3.4. Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) (Sister Chromatid Exchange= SCE) ve Kromozom Anormalliklerini (KA) (Chromosomal Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

3.4.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Sağlıklı ve sigara içmeyen iki bayan (24 ve 25 yaşlarında) ve iki erkekten (25 yaşında) alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş periferik kan örneklerinden 6 damla (0.2 ml) steril şartlarda 2.5 ml'lik kromozom medyumuna ekilmiştir (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991). Yine steril şartlarda daha önceden hazırladığımız BrdUrd eriyiğinden her tüpe son konsantrasyonu 10 µg BrdUrd/ml olacak şekilde ilave

edilerek iyice karıştırılmış ve hücre kültürü inkübatörde 37 ± 1 °C’de 72 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Benzol peroksit’in etkisini incelemek amacıyla kültür bitiminden 24 ve 48 saat önce 25, 50, 75, 100 µg/ml benzol peroksit kültür tüplerine ilave edilmiştir. Ayrıca her deneyin bir kontrolü, DMSO ilave edilmiş bir eritici kontrolü ve MMC ilave edilmiş pozitif kontrolü vardır. Eritici kontrolde, kültür tüpüne 20 µl DMSO konmuştur. Pozitif kontrolde, kültür tüpüne MMC son konsantrasyonu 0.25 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir.

Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan kolkisin eriyiğinden 50 µl (0.06 µg/ml) ilave edilmiş ve tüpler hafifçe sallanarak karıştırılmıştır.

Kültür süresinin sonunda (72. saatin bitiminde) kültür tüpleri 1200 rpm’de 15 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri içeren 0.5-0.7 ml’lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, etüvde 37 °C’ye kadar ısıtılan hipotonik eriyik ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve karıştırılarak yapılmıştır ve hücre süspansiyonu pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Aksi halde hücrelerde kümeleşme olmakta ve amaca uygun preparatlar hazırlanamamaktadır. Her tüpe 5 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra ağzı kapatılan tüpler inkübatöre konmuştur. Hücreler 37 °C de 15 dk. boyunca hipotonik eriyik ile muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 1200 rpm’de 15 dk. santrifüj edilmiş ve santrifüj sonunda süpernatant atılmıştır.

Daha sonra hipotonik eriyik ilavesinde olduğu gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk. fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 rpm’ de 15 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem üç kere tekrarlanmıştır. Üçüncü kez fiksatifle muamelenin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. Son santrifüjden sonra dipte 0.5-0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atılmış ve preparat yapma işlemine geçilmiştir.

Tüpün dibinde kalan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Pasteur pipetine 4-5 damla olacak şekilde hücre süspansiyonundan çekilmiştir. Özel olarak hazırlanmış düzeneğe tutturulan pasteur pipetinden daha

önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanan lamin üzerine 75 cm yükseklikten farklı alanlara birer damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerine yayılması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonunun lamlara dağıtılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edilmiştir.

Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

3.4.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması

Bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını (Sister Chromatid Differentiation = SCD) sağlamak amacıyla Speit (1984), Speit ve Haupter'in (1985) geliştirdikleri metod modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla bir günlük preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri bir film şeklinde Sorensen tamponu ile örtülecek şekilde kapatılmıştır. Işınlama eriyiği 5 ml Sorensen Tampon A, 5 ml Sorensen Tampon B alınıp bu karışımın destile su ile 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır (pH=6.8). Işınlama eriyiğinin az ya da fazla olmasının kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını önemli derecede etkilediği görülmüştür.

Bu şekilde ince bir tabaka halinde ışınlama eriyiği ile örtülen preparatlar, karanlıkta 15 cm yükseklikten 30 W'lık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen tek ultraviole lambası ile 30 dk. ışınlandırılmıştır.

Işınlama bittikten sonra preparatlar 1 x SSC eriyiği içerisinde 58-60 °C'de 60 dk. inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresi bitmeden 15 dk. önce % 5'lik Giemsa boya eriyiği hazırlanmıştır.

% 5'lik Giemsa boyasının hazırlanması: 5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5 ml Giemsa karıştırılarak üzerine 100 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir (pH=6.72). Sonra bu boya dik bir şale içerisine filtre kâğıdı yardımıyla süzölmüştür.

İnkübasyon süresinin sonunda preparatlar 1 x SSC eriyiğinden alınarak doğrudan boya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 20 dk. boya içerisinde

bekletilmiştir (Kardeş kromatidler arasındaki en iyi kontrast farkı bu sürenin sonunda elde edilmiştir). Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarılmış ve üç ayrı kaptaki saf sudan geçirilerek preparatların üzerindeki fazla boyanın akması sağlanmıştır. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette kurumaya bırakılmıştır.

Boyanmış preparatlar kuruduktan sonra entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir.

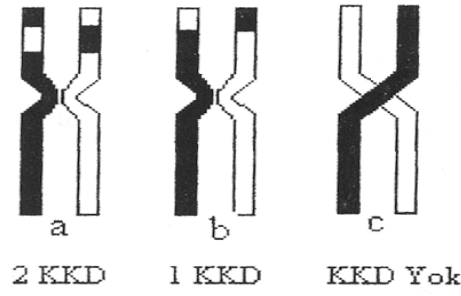
3.5. Daimi Preparatlarda Mikroskopik İnceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar MICROS AUSTRIA marka ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (10 x 100 = 1000 büyütmede). Bu incelemeler sırasında kardeş kromatid değişimi sayısı (KKD) ve kromozomal anormallikler belirlenmiştir. Aynı preparatlarda birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı ve toplam hücre içerisinde mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı saptanmıştır. Bu incelemeler sonucunda proliferasyon indeksi (PI) ve mitotik indeks (MI) saptanmıştır.

3.5.1.KKD Sayısının ve Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi = PI) Saptanması

3.5.1.1. KKD Sayısının Saptanması

KKD sayısı, her kişinin kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 25 hücrede (dört kişiden toplam 100 hücre) saptanmıştır. KKD sayısı bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla belirlenmiştir. Ortadan bir parça değişimi olmuş ise bu iki KKD olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.2.a). Uçtan parça değişimi olmuş ise bu da bir KKD olarak sayılmıştır (Şekil 3.2.b). Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekir. Bu durumda kromozomlarda KKD yoktur (Şekil 3.2.c).



Şekil 3.2. Kardeş Kromatid Değişiminin Olduğu ve Olmadığı Durumun Şematik Olarak Gösterilmesi (Topaktaş ve Speit, 1990)

3.5.1.2. Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi = PI) Saptanması

Benzol peroksit'in DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla RI bulunmuştur. Her kişinin kan kültüründen yapılan preparatlardan tesadüfi seçilmiş 100 hücrenin incelenmesiyle RI belirlenmiştir. Bu incelemeler sırasında gözlenen birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreler sayılmıştır. Bu verilerden yola çıkılarak her bir kişinin kan kültüründeki RI şu şekilde hesaplanmıştır:

$$RI = \frac{1 \times (M1) + 2 \times (M2) + 3 \times (M3)}{100}$$

M1: Birinci mitozu geçiren hücrelerin sayısı

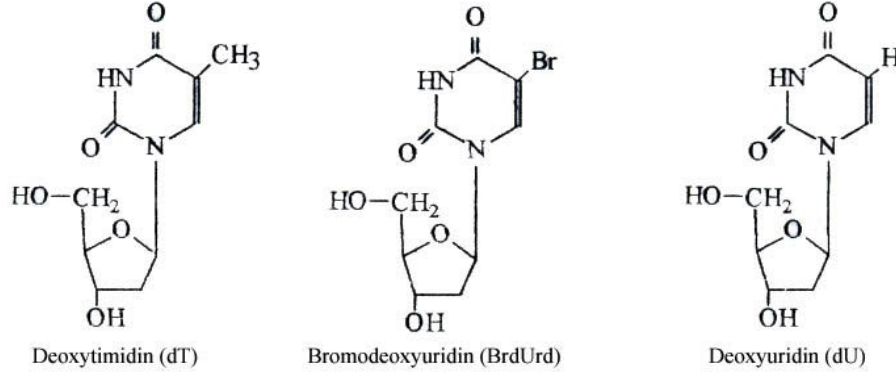
M2: İkinci mitozu geçiren hücrelerin sayısı

M3: Üçüncü mitozu geçiren hücrelerin sayısı

Birinci, ikinci ve üçüncü metafaz plakları şu şekilde ayırt edilmiştir (Topaktaş ve Speit, 1990):

BrdUrd, deoxytimidin (dT) ve deoxyuridin (dU) birbirlerinin analogu olan bileşiklerdir. BrdUrd, dT ve dU arasındaki tek fark taşıdıkları heterosiklik benzen halkasındaki beşinci C atomuna bağlanan grupların farklı olmasından

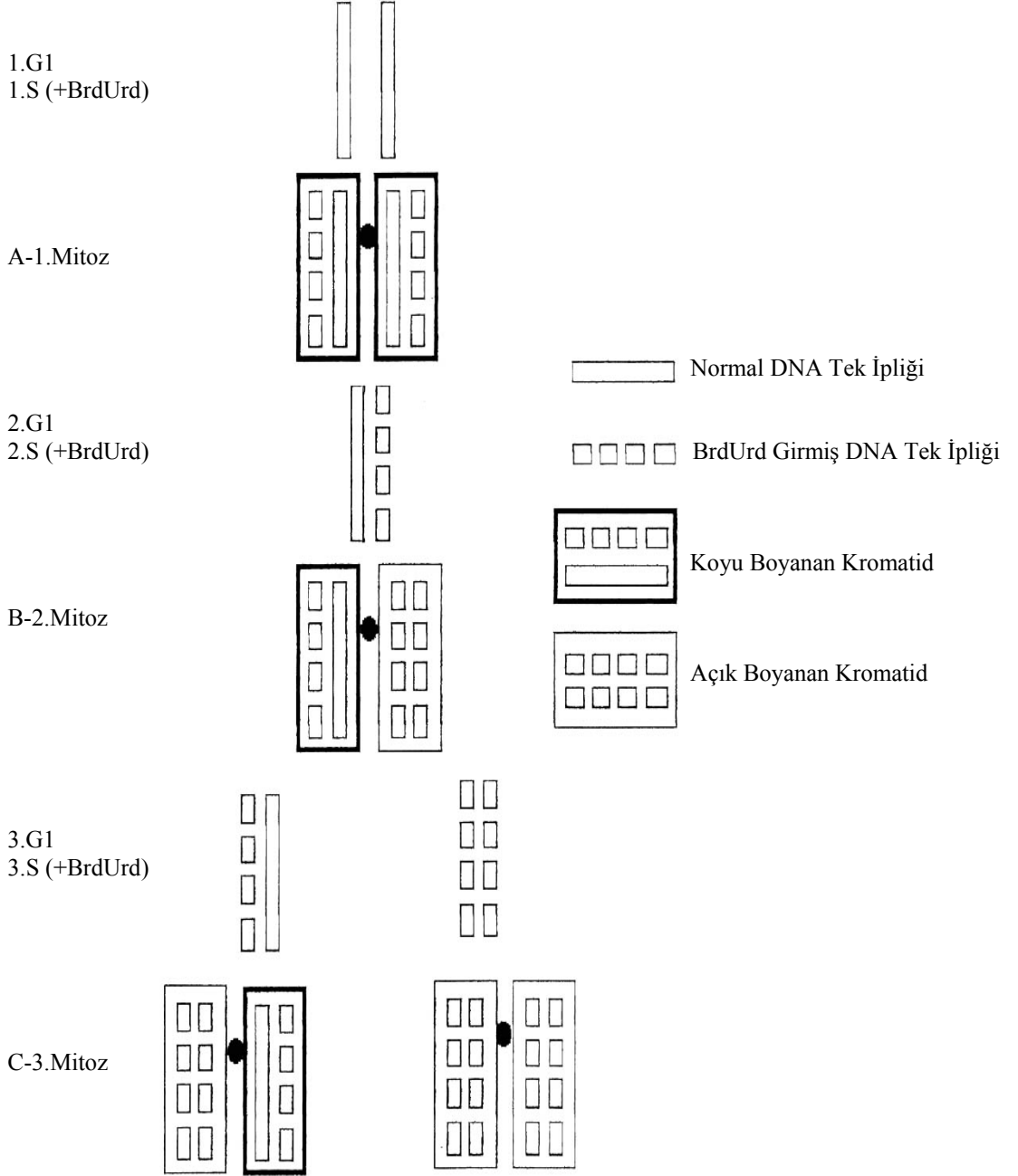
kaynaklanmaktadır. Beşinci C atomuna bağlanan grup dT'de CH₃, BrdUrd'de Br ve dU'de H atomudur (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin (dU)'in Kimyasal Yapıları.

BrdUrd, DNA'nın yapısında bulunan timin bazlarının analogu olduğundan kültür ortamına BrdUrd eklendiğinde hücreler DNA'larını replike ettikleri esnada (birinci S fazında) yeni sentezlenen polinükleotid ipliği içine timinin yerine ortamda bulunan BrdUrd geçecektir. Böyle hücrelerin kromozomları boyandığında bir kromozomun her iki kromatidi de (dT/BrdUrd : dT/BrdUrd) homojen koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.4 A ve Şekil 3.5). Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden meydana gelen yavru hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd' li ortamda ikinci S fazı) timin içeren polinükleotid ipliğine komplementer olarak sentezlenen yeni DNA ipliğinde BrdUrd yer alacaktır. Bu iki polinükleotid ipliği bir kromozomun koyu boyanan kromatidini (dT/BrdUrd) oluşturacaktır. BrdUrd içeren ipliğe komplementer olarak sentezlenen yeni ipliğe de BrdUrd girecektir ve bir kromatidi oluşturan iki polinükleotid ipliği de BrdUrd içereceğinden (BrdUrd/BrdUrd) bu kromatid, aynı kromozomun açık boyanan kromatidini oluşturacaktır. İşte bu hücrenin metafaz devresinde kromozomlar boyandığında tüm kromozomların kromatidlerinden birisi koyu diğeri açık renkte boyanacaktır (dT/BrdUrd : BrdUrd/BrdUrd). Bunlarda ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.4 B ve Şekil 3.6). Bu hücreler tekrar S fazına

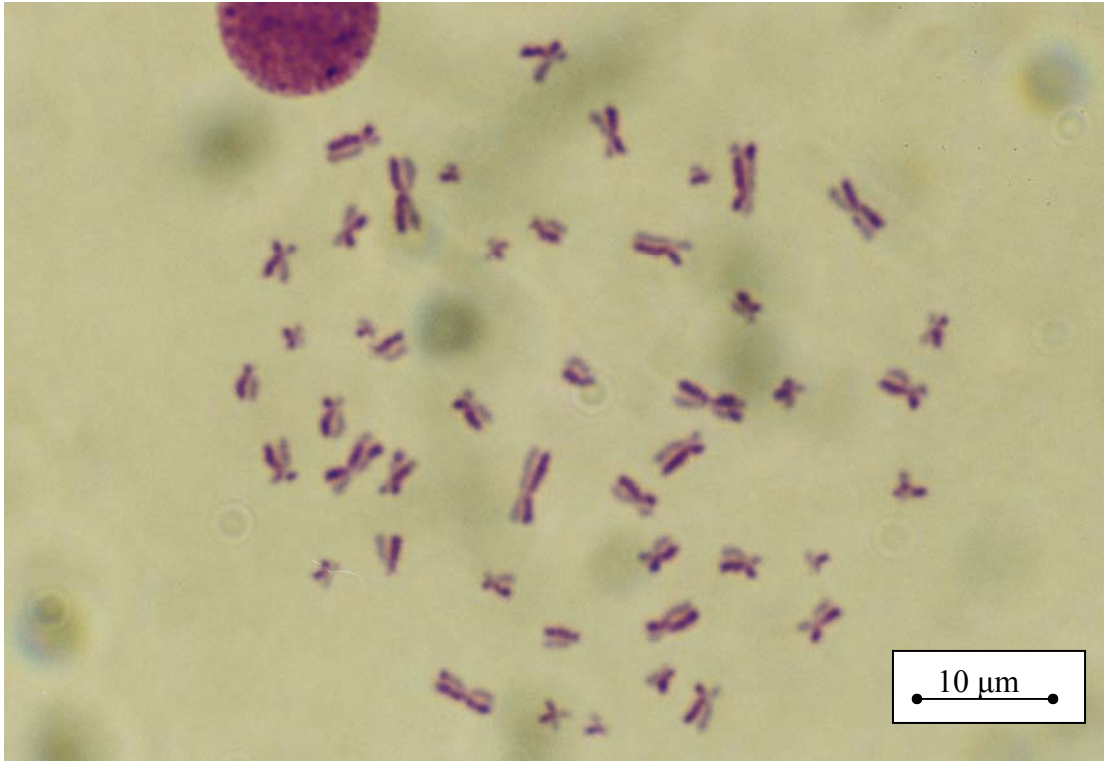
girdiğinde (BrdUrd'li ortamda üçüncü S fazı) ikinci mitozda açık boyanan kromatidden tüm polinükleotid ipliklerine BrdUrd girmiş olan bir kromozom meydana gelecektir ve bu kromozomun her iki kromatidi de açık boyanacaktır (BrdUrd/BrdUrd:BrdUrd/BrdUrd). İkinci mitozda koyu boyanan kromatidden ise, bir kromatidin her iki ipliği BrdUrd'li ve diğer kromatidinin bir ipliği BrdUrd'li diğer ipliği timinli olan bir kromozom oluşacaktır. Bu kromozomda boyandığında bir kromatidi koyu renkte, diğer kromatidi açık renkte olacaktır (dT/BrdUrd:BrdUrd/BrdUrd). İşte böyle hücrenin metafaz devresinde preparat yapıldığında bazı kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık diğer kromatidi koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler de üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.4 C ve Şekil 3.7). İşte bu şekilde birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreler ayırt edilmiş, 100 hücre içinde bu hücrelerin sayısı saptanmış ve elde edilen veriler kullanılarak yukarıdaki formüle göre RI hesaplanmıştır.



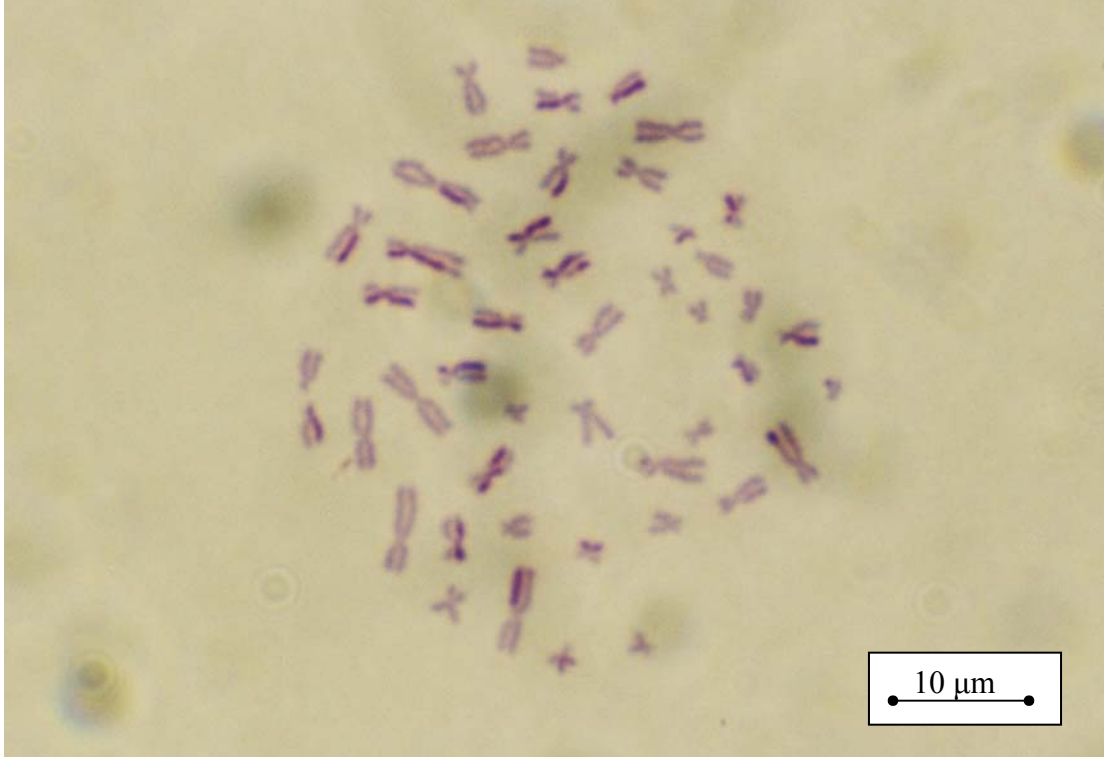
Şekil 3.4. BrdUrd'nin DNA yapısına Girmesi ile Birinci, İkinci ve Üçüncü Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Ayırt Edilmesinin Şematik Olarak Açıklanması (During, 1985: Topaktaş ve Speit, 1990'dan)



Şekil 3.5. Birinci Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Metafaz Kromozomları (x 1000).



Şekil 3.6. İkinci Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Metafaz Kromozomları (x 1000).



Şekil 3.7. Üçüncü Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Metafaz Kromozomları (x1000).

3.5.2. Kromozom Anormallikleri (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

3.5.2.1. Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması

Her bir kişiden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış kromozomlara sahip toplam 100 hücre (dört kişiden toplam 400 hücre) KA'yı saptamak amacıyla incelenmiştir. Bu hücrelerde gözlenen yapı ve sayı anormallikleri kaydedilmiştir. İncelenen bu 100 hücre içinde anormallik taşıyan hücrelerin yüzdesi ile toplam KA sayısı hesaplanmıştır. Toplam KA sayısı incelenen hücre sayısına bölünerek hücre başına düşen KA sayısı (KA/Hücre) saptanmıştır.

Bu çalışmada gap'lar anormallik olarak değerlendirilmemiştir. Gap'lar ile kromatid ve kromozom tipi kırıkları arasındaki farklar, Preston'un (1987) bildirdiğine göre Kauderer ve ark.'na (1991) uygun olarak şu şekilde ayırt edilmiştir:

Gap'larda, kromatidin birinde (kromatid tipi gap) veya kromatidin her ikisinde (kromozom tipi gap) görülen boyanmamış bölge bir kromatidin

genişliğinden daha azdır. Kırıklarda bir kromatiddeki (kromatid tipi kırık) veya her iki kromatiddeki (kromozom tipi kırık) boyanmamış bölge bir kromatidin genişliğinden daha fazladır. İşte bu ölçülere göre gap ve kromatid kırıkları birbirinden ayırt edilmiştir.

3.5.2.2. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

Benzol peroksit'in mitoz bölünme üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla MI saptanmıştır. MI'i saptamak amacıyla her bir kişiye ait preparatlarda toplam 3 bin hücre incelenmiş ve bunlar arasında mitoz bölünme geçiren hücrelerin sayısı kaydedilmiştir. 3 bin hücre içinde mitoz geçiren hücrelerin oranı yüzde cinsinden hesaplanarak MI saptanmıştır.

3.6. Mikronükleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

3.6.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

In vitro mikronükleus testinde Rothfuss ve ark. (2000)'nin geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu yöntem gereği, sağlıklı insanlardan alınan periferik kanın 0.2 ml'si, 2.5 ml kromozom medyumuna ekilerek 37 °C'de 68 saat inkübe edilmiştir. 25, 50, 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarındaki benzol peroksit, kültür ortamına, kültürün başlangıcından 20 ve 44 saat sonra ilave edilmiştir. Ayrıca her deneyin bir kontrolü, bir eritici kontrolü ve bir pozitif kontrolü vardır. İnkübasyonun başlangıcından 44 saat sonra her tüpe konsantrasyonu 8 µg/ml olacak şekilde Cytochalasin-B maddesi ilave edilmiştir. İnkübasyonun sonunda, kültür tüpleri 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve hücreler hipotonik solüsyonla (% 0.4 KCl) 37 °C'de 10 dakika muamele edilmiştir. Hipotonik solüsyon, KKD ve KA deneylerinde olduğu gibi yavaş yavaş ve pipetaj yapılarak ilave edilmiştir. Hipotonik eriyik ile muamelenin ardından 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj yapılmış ve süpernatant atılarak birinci fiksatif ile muamele edilmiştir. Bu

fiksatif 5 hacim metanol:1 hacim glasiyal asetik asit ve ikisinin toplam miktarı kadar % 0.9 NaCl karıştırılarak hazırlanmıştır (5 hacim metanol:1 hacim glasiyal asetik asit:6 hacim % 0.9 NaCl). Birinci fiksatif ile oda sıcaklığında 20 dakika muameleden sonra 1200 rpm’de 15 dk. daha santrifüjlenen tüplere iki kez metanol/glasiyal asetik asit (5:1) ilavesi yapılarak 20 dakika oda sıcaklığında fiksatif muamelesi yapılmıştır. Sonra santrifüj yapılarak süpernatant atılmış ve kültür tüplerinin dibinde toplanmış olan hücreler resüspanse edilmiştir. Daha sonra, hücre süspansiyonu soğuk ve temiz lamalar üzerine 10 cm yükseklikten damlatılarak preparatlar hazırlanmıştır.

3.6.2. Preparatların Boyanması

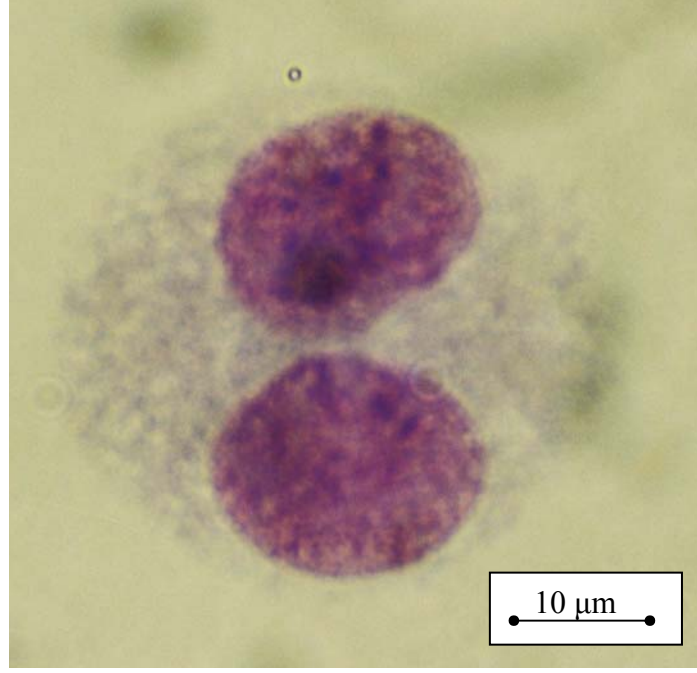
Hazırlanan preparatlar bir gün sonra Sorensen tamponunda hazırlanmış % 5’lik Giemsa boyası ile 15 dk. boyanmış ve 3 ayrı kapta bulunan saf sudan geçirilerek kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işleminden sonra preparatlar entellan ile kapatılarak incelemeye hazır hale getirilmiştir.

3.7. Mikronükleus Preparatlarında Mikroskopik İnceleme

Hazırlanan daimi preparatlar MICROS AUSTRIA marka ışık mikroskopunda 10x40=400 büyütmede incelenmiştir.

3.7.1. Mikronükleus Sayısının Saptanması

Mikronükleus sayısını saptamak amacıyla her bir kişiye ait daimi preparatlarda her kişinin, her muamele grubu ve kontrollerinde iki nükleusa sahip (binükleer) toplam 1000 hücre (Şekil 3.8) incelenerek mikronükleuslu hücreler ve mikronükleus taşıyan hücrelerdeki mikronükleus sayısı kaydedilmiştir. 1000 hücre içinde mikronükleuslu hücre oranı yüzde cinsinden hesaplanmıştır.



Şekil 3.8. Sitoplazma Bölünmesinin Engellenmesi Sonucunda Oluşan İki Nükleuslu Hücre (x 1000).

3.8. Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Fotoğraf çekme işlemi OLYMPUS marka mikroskopta 1000 büyütmede yapılmıştır. Birinci, ikinci ve üçüncü mitozu geçiren hücrelerin, preparatlarda rastlanan bazı ilginç kromozom anormalliklerinin ve mikronükleuslu binükleer hücrelerin fotoğrafları çekilmiştir. Fotoğraf çekiminde Kodak marka 100 ASA'lık renkli film kullanılmıştır.

3.9. İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Mikroskobik inceleme sonucunda elde edilen KKD, KA, MI, RI ve MN oluşumları için önce her bir grubun ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığı tek yönlü varyans analiz metodu ile saptanmış, farkın önemli olduğu gruplarda t-testi ile muameleli gruplardan elde edilen sonuçlar kontrolleri ile (kontrol, eritici kontrol ve pozitif kontrol) karşılaştırılmıştır. Doz-etki ilişkisini belirlemek amacıyla regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı (r) bulunmuş ve regresyon doğrusu çizilmiştir.

Ayrıca mikroskopik incelemeler sonucunda elde edilen değerler çizelge ve grafik halinde verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Benzol Peroksit'in Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerindeki Etkileri

Benzol peroksit, 24 saatlik muamele süresinde kullanılan tüm konsantrasyonlarda KKD'yi genel olarak hem kontrol hem de eritici kontrole göre arttırmıştır (Çizelge 4.1). Ancak KKD'de görülen bu artış, kontrol ve eritici kontrole göre istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.1). Muameleli kültürlerdeki KKD sayısı pozitif kontrolden önemli derecede düşüktür (Çizelge 4.1).

48 saatlik muamelelerde benzol peroksit KKD'yi genel olarak kontrol ve eritici kontrole nazaran arttırmış, ancak bu artış sadece en yüksek konsantrasyonda (100 µg/ml) kontrole göre önemli bulunmuştur (Çizelge 4.1). Muameleli kültürlerde KKD sayısı pozitif kontroldekinden daha düşük bulunmuştur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Değişik Dozlarda Benzol Peroksit ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferik Lenfositlerinde Ortalama KKD Sayısı.

Test Maddesi	Muamele Süresi (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	Min-Max KKD	KKD/Hücre±SH
Kontrol	--	--	2 - 21	7.99 ± 0.33
DMSO (eritici kontrol)	24	20 µl	2 - 15	7.92 ± 0.69
MMC (pozitif kontrol)	24	0.25	25 - 92	55.67 ± 4.21
BPO	24	25	1 - 18	8.49 ± 0.82 c ₃
BPO	24	50	2 - 23	8.46 ± 0.74 c ₃
BPO	24	75	3 - 23	8.89 ± 0.58 c ₃
BPO	24	100	3 - 15	9.22 ± 0.50 c ₃
DMSO (eritici kontrol)	48	20 µl	2 - 17	8.14 ± 0.73
MMC (pozitif kontrol)	48	0.25	62 - 137	95.38 ± 4.13
BPO	48	25	2 - 20	10.26 ± 1.20 c ₃
BPO	48	50	2 - 26	11.12 ± 1.01 c ₃
BPO	48	75	2 - 21	10.81 ± 1.28 c ₃
BPO	48	100*	2 - 23	11.93 ± 1.20 a ₁ c ₃

1)*: Yüksek toksisite nedeniyle KKD için 77 hücre incelenmiştir.

2)a: Kontrol ile; b: Eritici kontrol ile; c: Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemlidir.

a₁b₁c₁: P < 0.05

a₂b₂c₂: P < 0.01

a₃b₃c₃: P < 0.001

4.2. Benzol Peroksit'in Kromozom Aberasyonlarının (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Benzol peroksit ile 24 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde kromozom aberasyonlu hücre oranının son iki yüksek konsantrasyonda (75 µg/ml, 100 µg/ml) kontrol ve eritici kontrole göre önemli derecede yüksek olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.2). 24 saatlik muamele süresinde benzol peroksit kromozom aberasyonlarını doza bağlı olarak arttırmıştır (Şekil 4.1). 75 µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyondaki benzol peroksit ile 24 saat muamele edilen kültürlerde hücre başına düşen anormallik sayısı (KA/Hücre) hem kontrol hem de eritici kontrolden yüksek bulunmuştur. KA/Hücre'deki artış doza bağlı bir durum göstermiştir (Şekil 4.2). 24 saatlik muamele süresinde benzol peroksit KA'yı pozitif kontrol kadar uyarmamıştır (Çizelge 4.2).

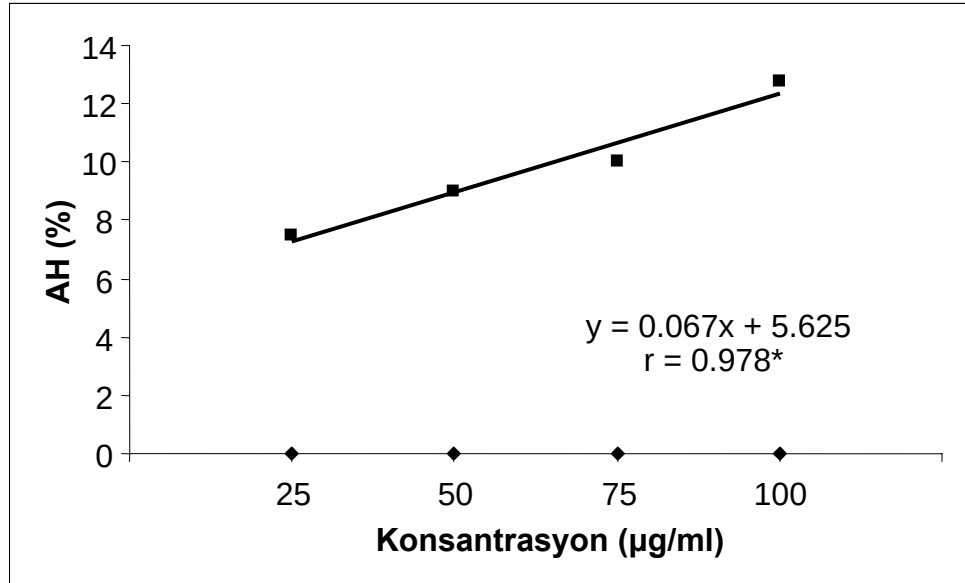
Benzol peroksit ile 48 saat muamele edilen kültürlerde tüm konsantrasyonlarda anormal hücre yüzdesi ve KA/Hücre hem kontroldekinden hem de eritici kontroldekinden yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.2). Yani benzol peroksit 48 saatlik muamele süresinde KA'yı tüm konsantrasyonlarda uyarmıştır. Bu uyarma pozitif kontrol kadar olmamıştır (Çizelge 4.2). 48 saatlik muamele süresinde anormal hücre oranındaki artış doza bağlı bir durum göstermiştir (Şekil 4.3). Bu muamele süresinde hücre başına düşen kromozom aberasyonu sayısı da (KA/Hücre) doza bağlı olarak artmıştır (Şekil 4.4).

Benzol peroksit insan periferik lenfositlerinde kromatid kırığı (Şekil 4.5; Şekil 4.6; Şekil 4.7; Şekil 4.8; Şekil 4.9; Şekil 4.18), kromozom kırığı (Şekil 4.10; Şekil 4.14; Şekil 4.16; Şekil 4.18), fragment (Şekil 4.11), kardeş kromatid birleşmesi (Şekil 4.12), disentrik kromozom (Şekil 4.13), translokasyon (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15), kromatid değişimi (Şekil 4.16), poliploidi (Şekil 4.17) ve endoreduplikasyon (Şekil 4.18) gibi kromozom aberasyonlarına neden olmuştur.

Çizelge 4.2. Değişik Dozlarda Benzol Peroksit ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferal Lenfositlerinde Kromozom Anormallik Çeşitleri, Anormal Hücre Oranı, KA/Hücre.

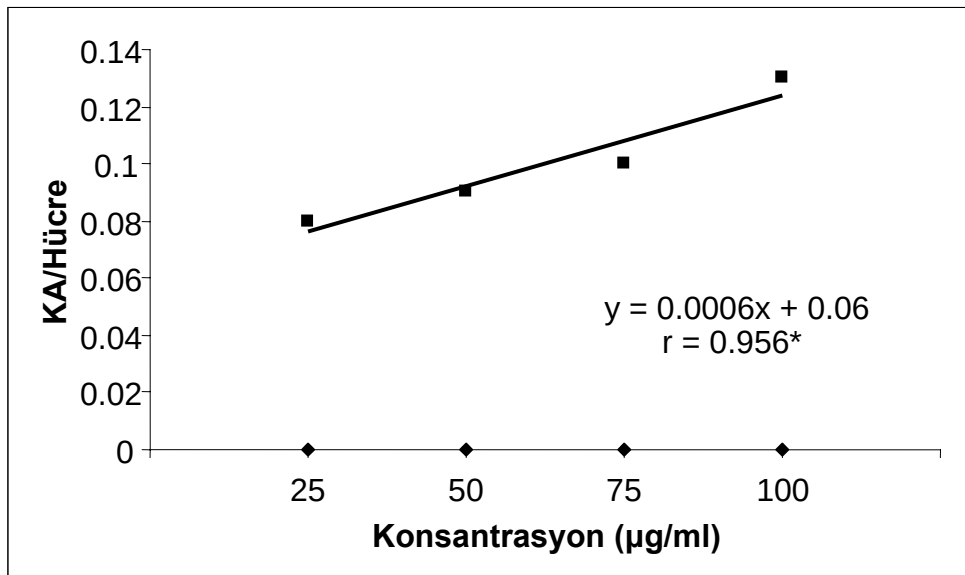
Test Maddesi	Muamele		Anormallikler *									Anormal Hücre ±SH (%)	KA/Hücre±SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)	B'	B''	F	KKB	DS	T	KD	P	E		
Kontrol	--	--	18	6	2	1	-	-	1	-	-	6.50±0.64	0.07±0.00
DMSO (çözücü kontrol)	24	20 µl	18	-	1	2	-	1	-	1	-	6.00±0.40	0.06±0.00
MMC (pozitif kontrol)	24	0.25	200	115	15	7	1	-	40	-	-	57.75±5.66	0.94±0.14
BPO	24	25	17	6	5	1	1	-	2	1	-	7.50±1.04 c ₃	0.08±0.00 c ₃
BPO	24	50	22	11	2	1	-	1	-	1	-	9.00±0.81 b ₁ c ₃	0.09±0.00 b ₁ c ₃
BPO	24	75	30	6	2	3	1	-	-	-	-	10.00±0.40 a ₂ b ₂ c ₃	0.10±0.00 a ₂ b ₂ c ₃
BPO	24	100**	30	6	2	7	1	1	1	-	-	12.75± 1.49 a ₁ b ₁ c ₃	0.13±0.01 a ₁ b ₁ c ₃
DMSO (çözücü kontrol)	48	20 µl	20	3	3	2	-	-	1	-	-	7.00±0.70	0.07±0.00
MMC (pozitif kontrol)	48	0.25	264	6	69	3	5	2	115	2	-	75.25±6.21	1.79±0.33
BPO	48	25	28	2	5	4	2	-	2	-	-	9.75±0.47 a ₂ b ₂ c ₃	0.10±0.00 a ₂ b ₁ c ₃
BPO	48	50	35	7	5	-	-	3	-	-	1	11.75±0.85 a ₂ b ₁ c ₃	0.12±0.00 a ₂ b ₂ c ₃
BPO	48	75	35	7	4	2	4	4	-	-	-	12.25±1.65 a ₁ b ₁ c ₃	0.14±0.01 a ₂ b ₂ c ₃
BPO	48	100***	44	8	3	1	1	1	-	-	-	16.50±0.50 a ₃ b ₃ c ₃	0.18±0.00 a ₃ b ₃ c ₃

- 1)* : B':Kromatid Kırığı; B'': Kromozom Kırığı; F: Fragment; KKB: Kardeş Kromatidlerin Birleşmesi; DS: Disentrik kromozom;
T: Translokasyon; KD: Kromatid Değişimi; P: Poliploidi; E: Endoreduplikasyon
- 2)** : Yüksek toksisite nedeniyle 357 hücre incelenebilmiştir.
- 3)*** : Yüksek toksisite nedeniyle 310 hücre incelenebilmiştir.
- 4)a: Kontrol ile; b: Eritici Kontrol ile; c: Pozitif Kontrol ile karşılaştırmada fark önemlidir.
a₁b₁c₁: P < 0.05 a₂b₂c₂: P < 0.01 a₃b₃c₃: P < 0.001



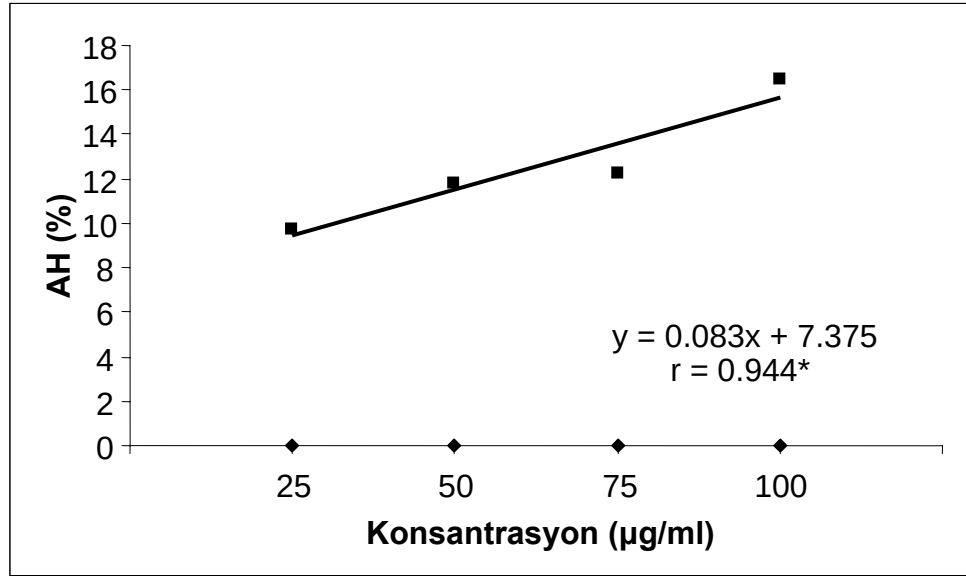
Şekil 4.1. Farklı Dozlarda Benzol Peroksit ile 24 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde AH'nin Doza Bağlı Olarak Artışını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.

* : $P < 0.05$



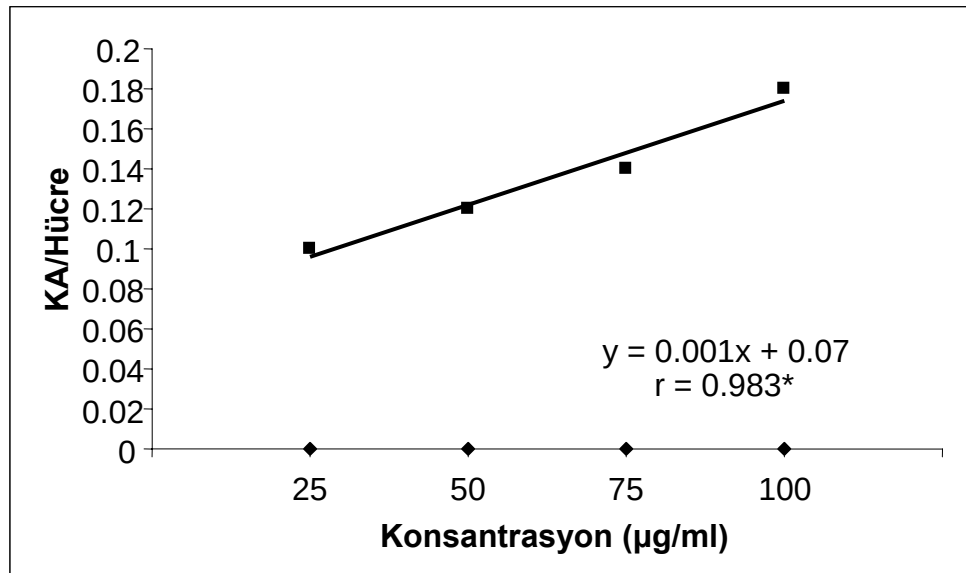
Şekil 4.2. Farklı Dozlarda Benzol Peroksit ile 24 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde KA/Hücre Oranının Doza Bağlı Olarak Artışını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.

* : $P < 0.05$



Şekil 4.3. Farklı Dozlarda Benzol Peroksit ile 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde AH'nin Doza Bağlı Olarak Artışını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.

* : $P < 0.05$

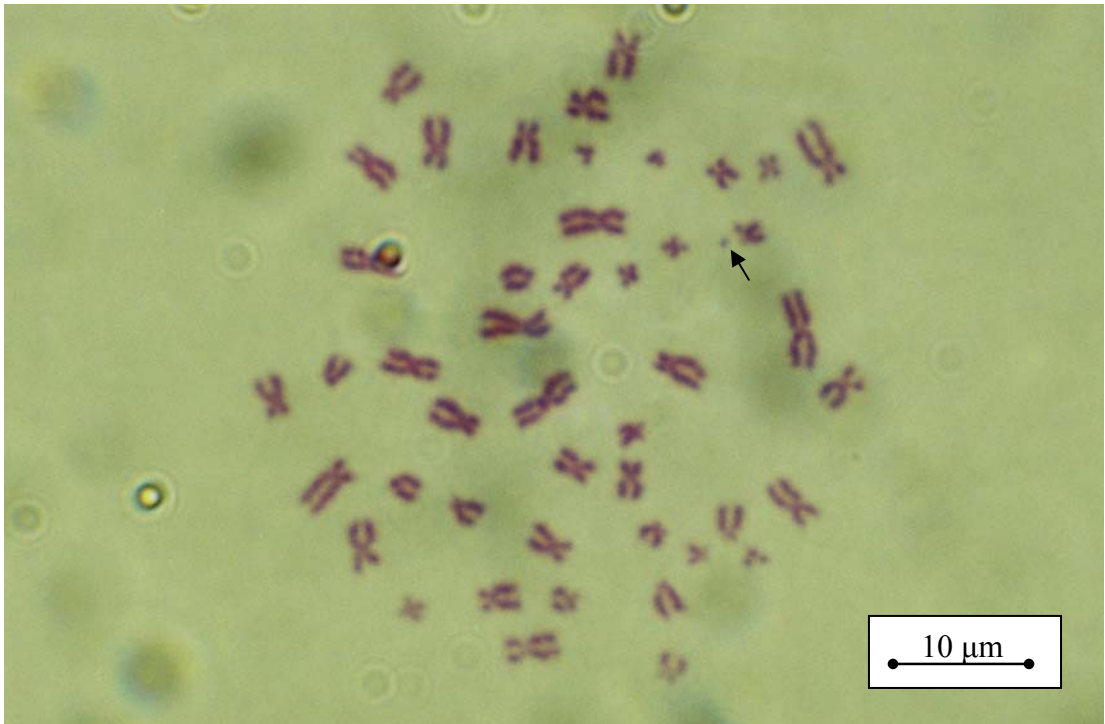


Şekil 4.4. Farklı Dozlarda Benzol Peroksit ile 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde KA/Hücre Oranının Doza Bağlı Olarak Artışını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.

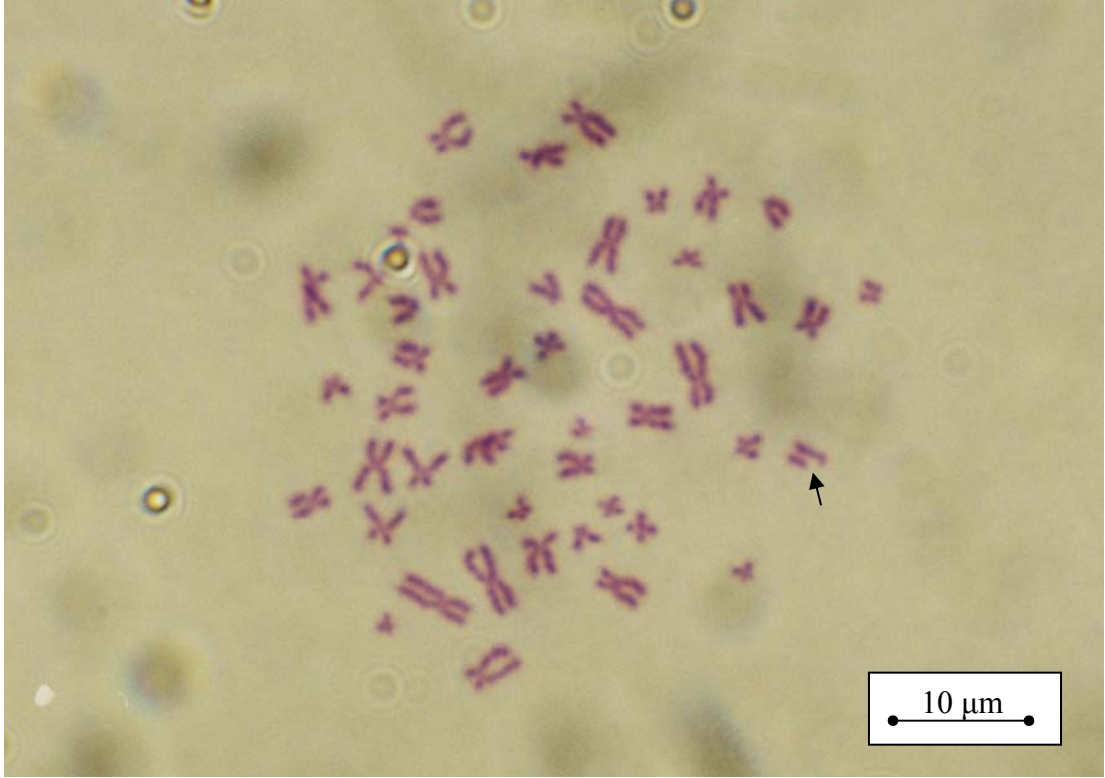
* : $P < 0.05$



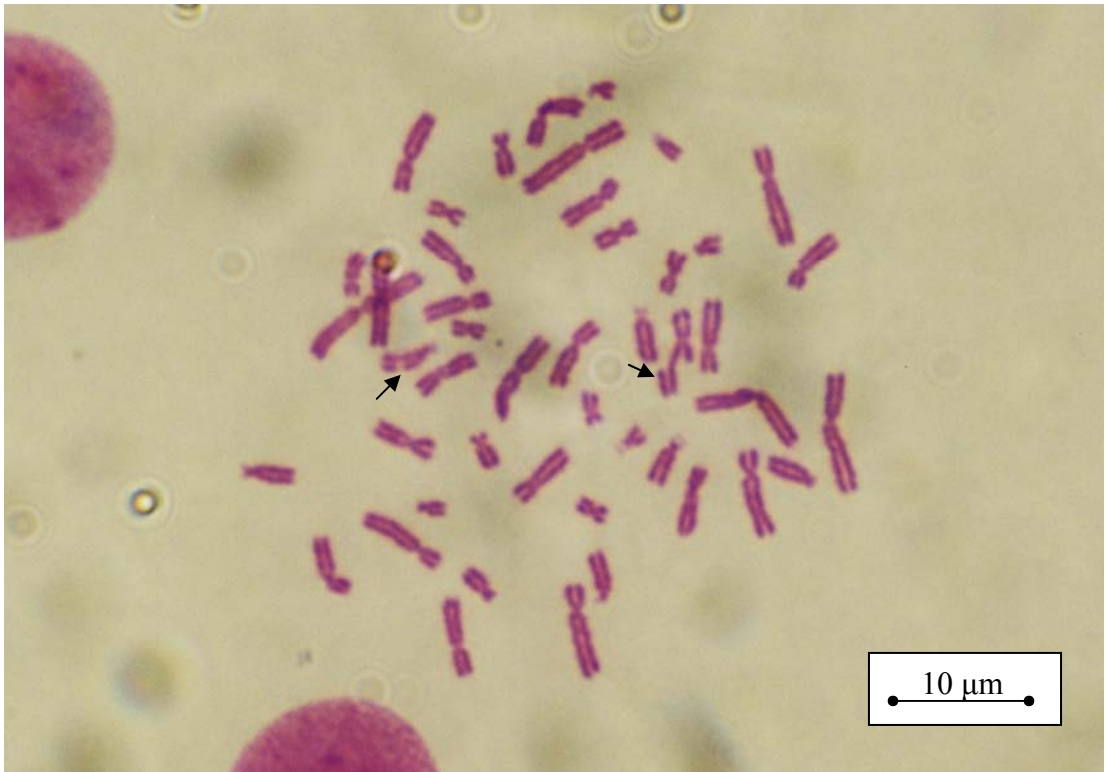
Şekil 4.5. Kromatid Kırığı (B') (100 µg/ml benzol peroksit, 24 saatlik muamele, ♂) (x1000).



Şekil 4.6. Kromatid Kırığı (B') (75 µg/ml benzol peroksit, 48 saatlik muamele, ♀) (x1000).



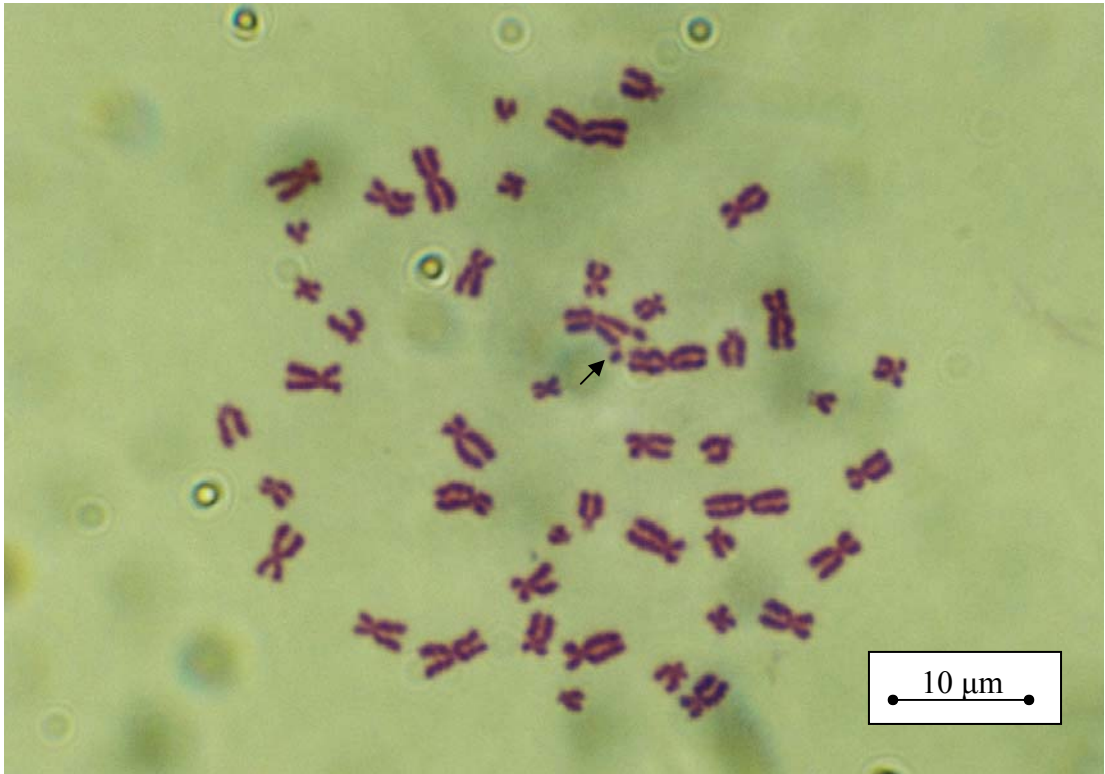
Şekil 4.7. Kromatid Kırığı (B') (50 µg/ml benzol peroksid, 48 saatlik muamele, ♀) (x1000).



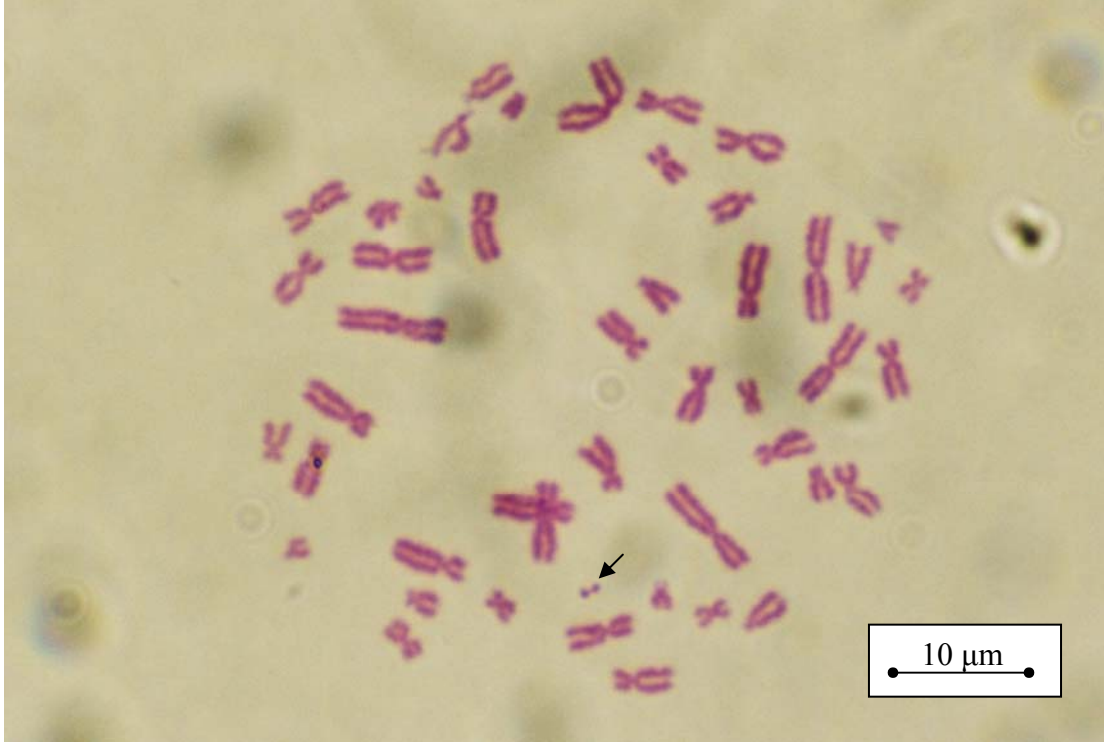
Şekil 4.8. Kromatid Kırığı (B') (25 µg/ml benzol peroksid, 48 saatlik muamele, ♂) (x1000).



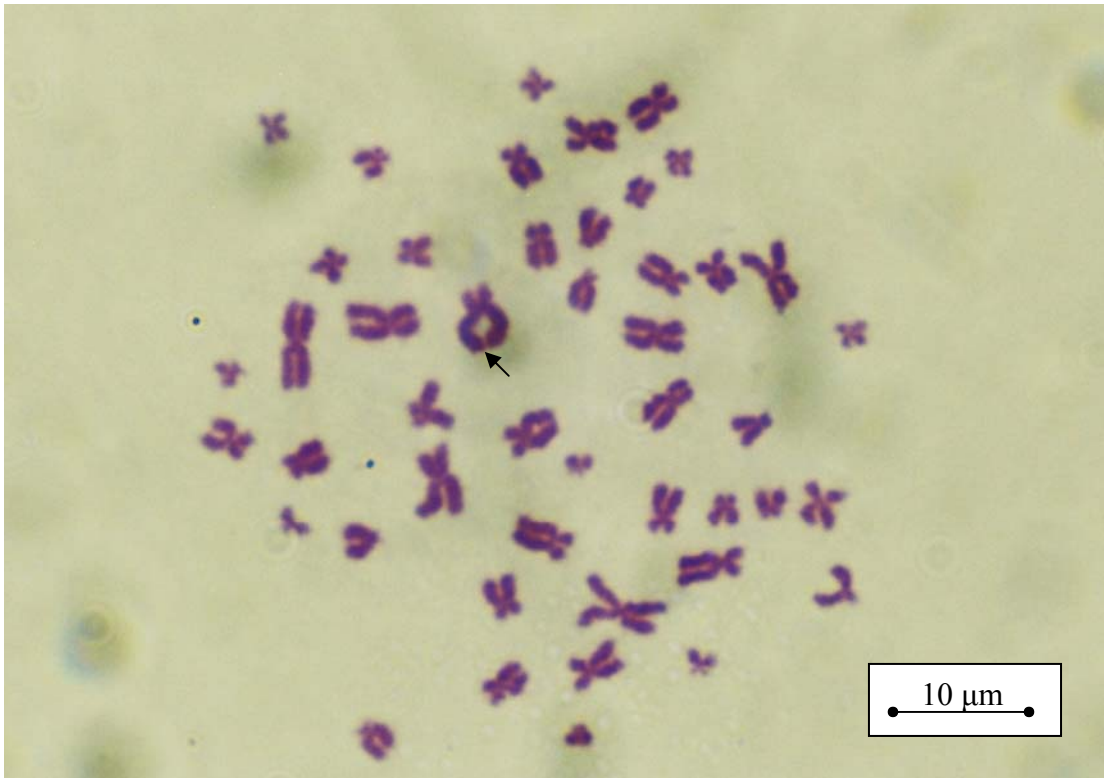
Şekil 4.9. Kromatid Kırığı (B') (50 µg/ml benzol peroksid, 48 saatlik muamele, ♂) (x1000).



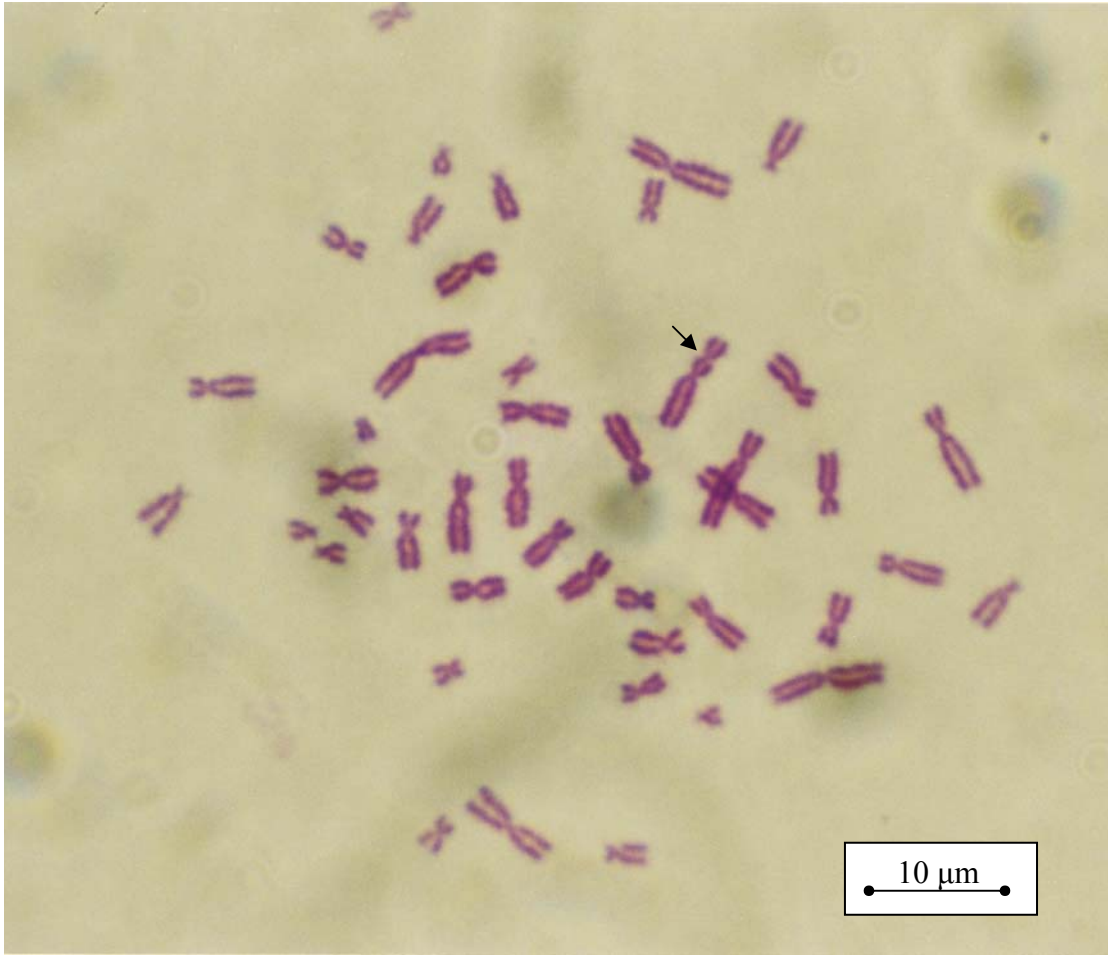
Şekil 4.10. Kromozom Kırığı (B'') (25 µg/ml benzol peroksid, 24 saatlik muamele, ♂) (x1000).



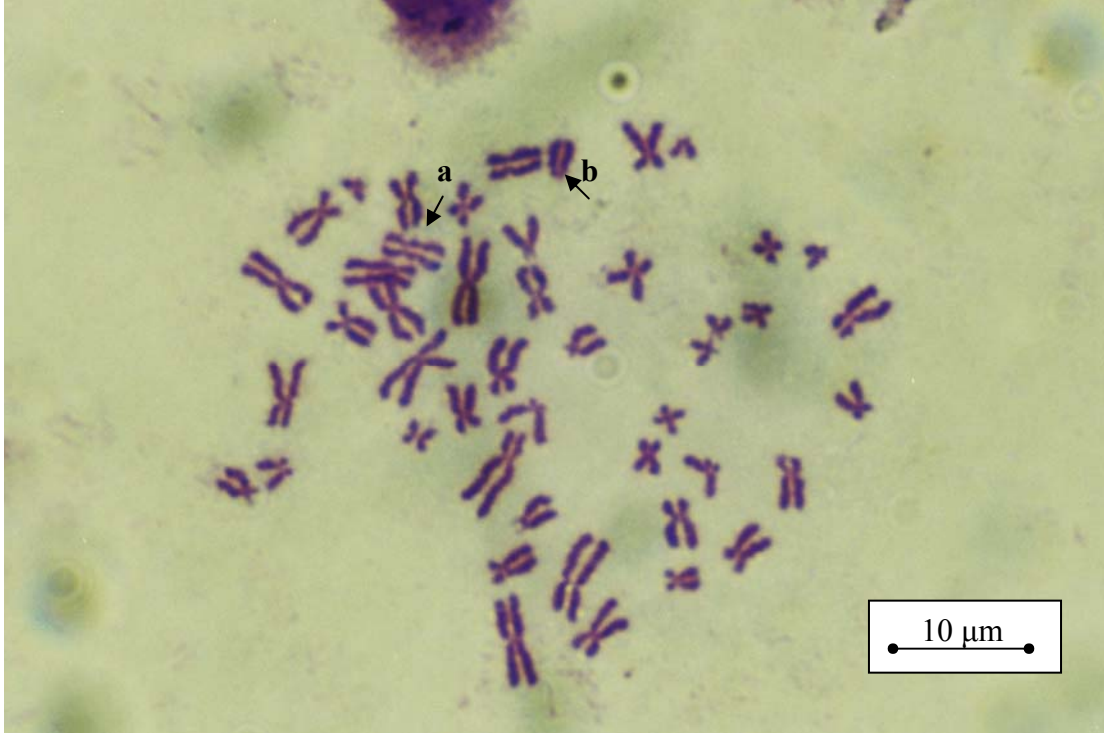
Şekil 4.11. Fragment (F) (25 µg/ml benzol peroksid, 24 saatlik muamele, ♂) (x1000).



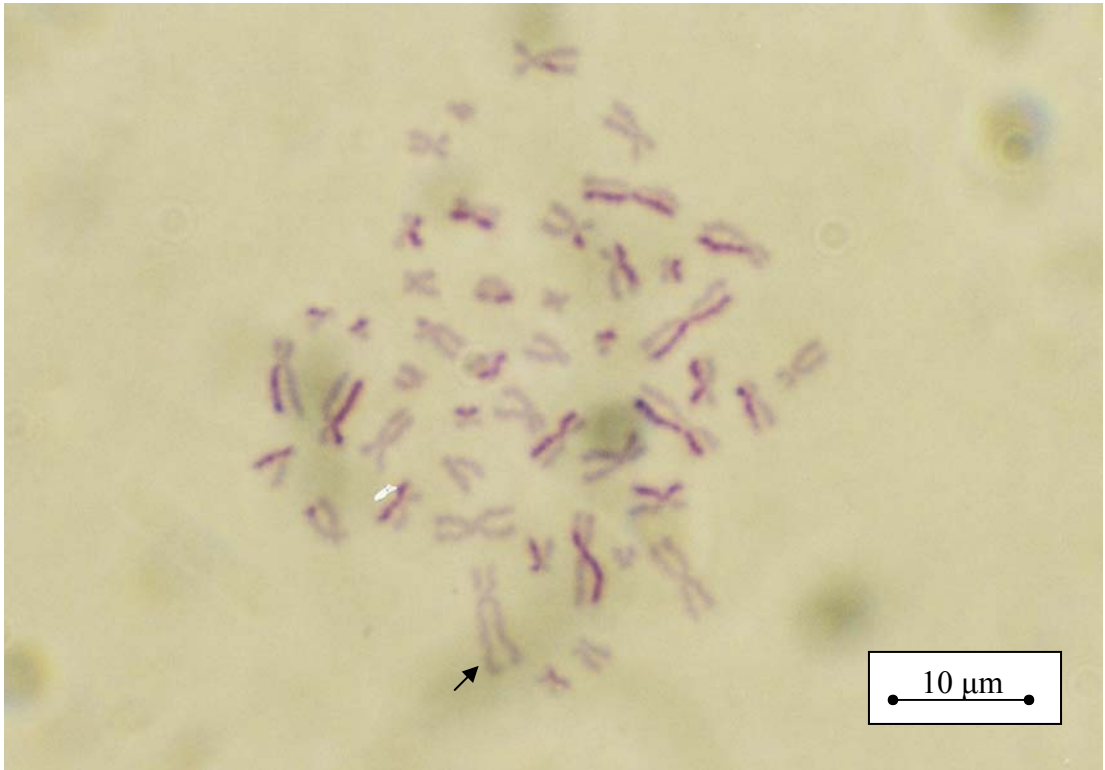
Şekil 4.12. Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB) (25 µg/ml benzol peroksid, 48 saatlik muamele, ♂) (x1000).



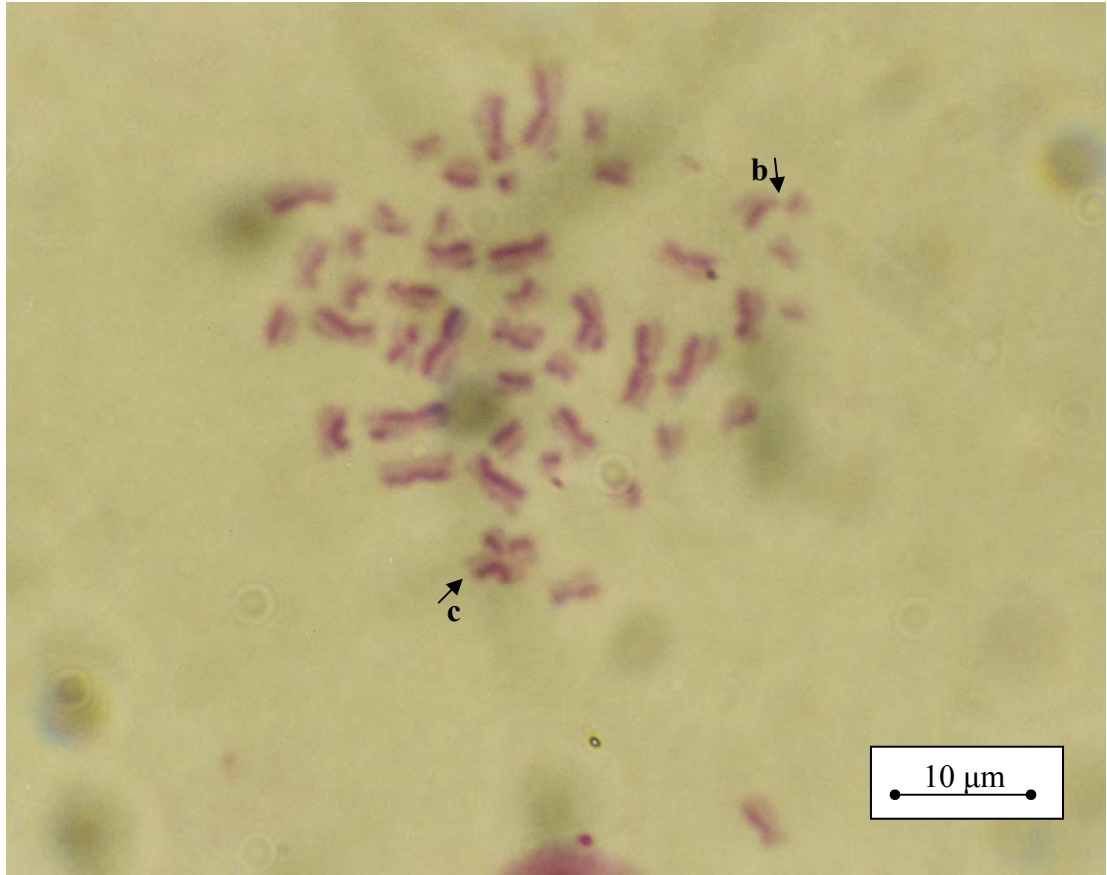
Şekil 4.13. Disentrik Kromozom (DS) (75 µg/ml benzol peroksit, 24 saatlik muamele, ♂) (x1000).



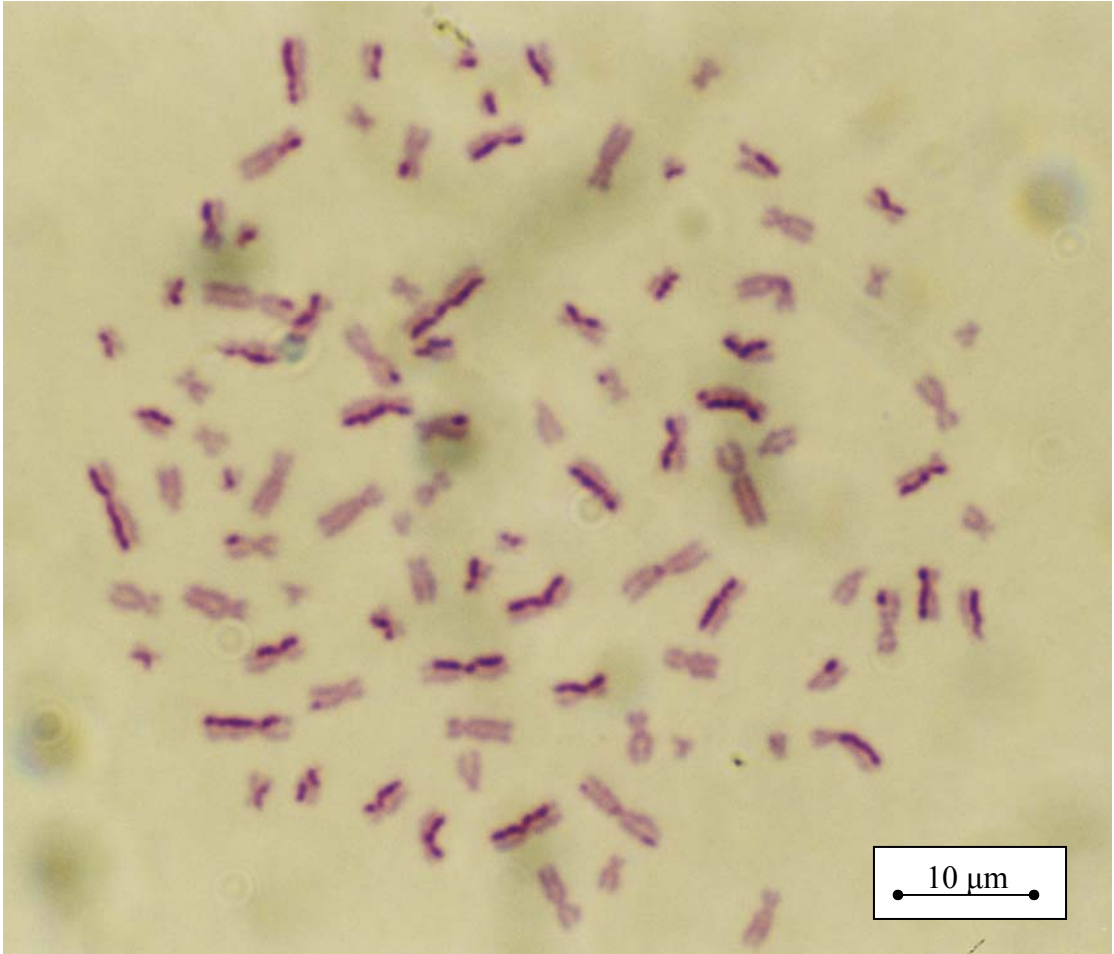
Şekil 4.14. Translokasyon (T) (a) ve Kromozom Kırığı (B'') (b) (50 µg/ml benzol peroksit, 48 saatlik muamele, ♂) (x1000).



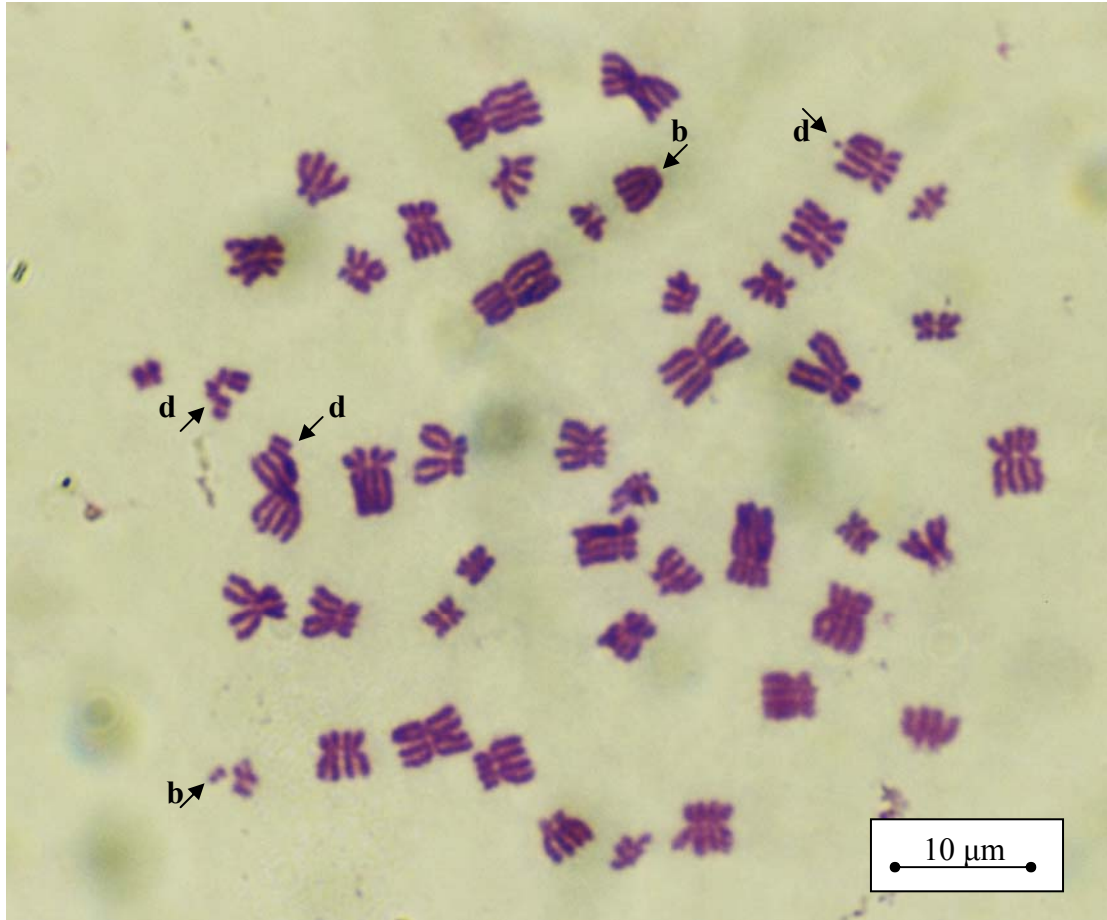
Şekil 4.15. Translokasyon (T) (50 µg/ml benzol peroksit, 24 saatlik muamele, ♂) (x1000).



Şekil 4.16. Quadriradyal Şekilde Kromatid Değişimi (KD) (c) ve Kromozom Kırığı (B'') (b) (25 µg/ml benzol peroksit, 48 saatlik muamele, ♂) (x1000).



Şekil 4.17. Poliploidi (P) (25 µg/ml benzol peroksit, 24 saatlik muamele, ♂) (x1000).



Şekil 4.18. Endoreduplikasyon (E); Kromozom Kırığı (b) ve Kromatid Kırığı (d) (50 µg/ml benzol peroksit, 48 saatlik muamele, ♂) (x1000).

4.3. Benzol Peroksit'in DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri

Benzol peroksit'in DNA replikasyonu üzerindeki etkisi replikasyon indeksinin (RI) saptanmasıyla, mitoz bölünme üzerindeki etkisi de mitotik indeksin (MI) saptanmasıyla belirlenmiştir.

Benzol peroksit ile 24 saat muamele edilen kültürlerde RI kontrol ve eritici kontroldekine göre genel olarak düşük bulunmuş, fakat aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.3). Benzol peroksit ile 48 saat muamele edilen kültürlerde RI, kontrol ve eritici kontrole göre önemli derecede düşük

bulunmuştur (Çizelge 4.3). Hem 24 hem de 48 saatlik muamele süresinde RI’de doza bağlı bir düşüş kaydedilmiştir (Şekil 4.19; Şekil 4.20).

24 saat benzol peroksit ile muamele edilen kültürlerde MI kontrol ve eritici kontroldekine nazaran genel olarak düşük bulunmuştur. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 4.3). Benzol peroksit ile 48 saatlik muamelede ise MI, son iki yüksek konsantrasyonda (75 µg/ml, 100 µg/ml) kontrol ve eritici kontrole nazaran önemli derecede düşük bulunmuştur (Çizelge 4.3). Gerek 24 saatte gerekse 48 saatte MI’deki düşüş doza bağlı durum göstermiştir (Şekil 4.21; Şekil 4.22).

Çizelge 4.3. Değişik Dozlarda Benzol Peroksit ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferik Lenfositlerinde Replikasyon İndeksi (RI) ve Mitotik İndeks (MI).

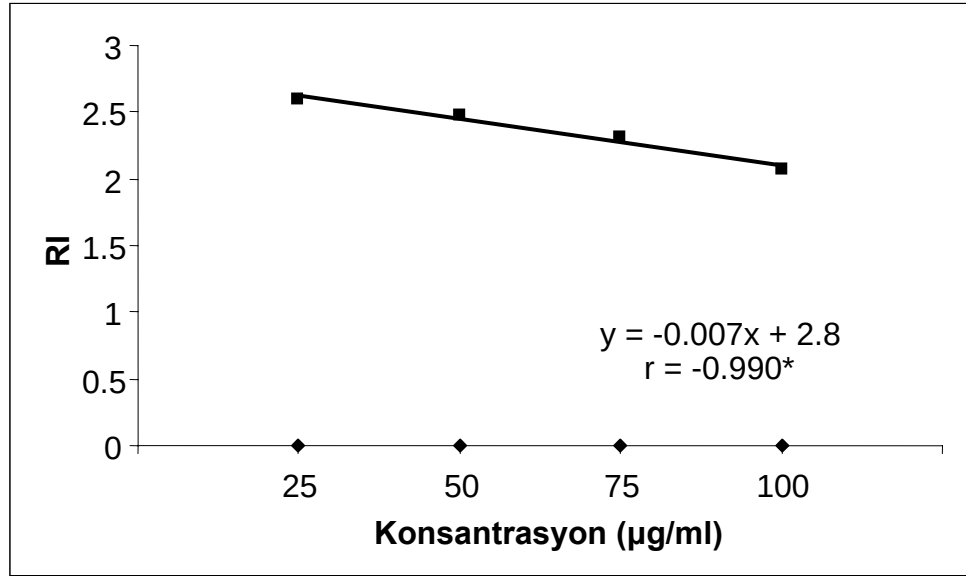
Test Maddesi	Muamele		M ₁	M ₂	M ₃	RI±SH	MI±SH
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)					
Kontrol	--	--	42	113	245	2.51±0.09	6.35±0.91
DMSO (çözücü kontrol)	24	20 µl	27	90	283	2.64±0.04	5.62±0.59
MMC (pozitif kontrol)	24	0.25	45	164	191	2.37±0.06	4.59±0.17
BPO	24	25	36	91	275	2.60±0.04 c ₁	5.45±0.52
BPO	24	50	50	118	233	2.47±0.13	4.77±0.72
BPO	24	75	61	142	197	2.31±0.17	4.46±0.68
BPO	24	100	113	138	149	2.07±0.26	3.56±0.89
DMSO (çözücü kontrol)	48	20 µl	52	98	250	2.50±0.07	5.26±0.62
MMC (pozitif kontrol)	48	0.25	184	202	14	1.57±0.06	2.64±0.62
BPO	48	25	83	177	140	2.15±0.09 a ₁ b ₁ c ₂	4.51±0.46 a ₁ c ₁
BPO	48	50	103	202	95	1.98±0.05 a ₂ b ₁ c ₂	3.90±0.64 a ₁
BPO	48	75	140	190	70	1.83±0.06 a ₂ b ₂ c ₁	3.12±0.50 a ₂ b ₁
BPO	48	100	189	172	39	1.62±0.09 a ₂ b ₂	1.84±0.51 a ₂ b ₂

a: Kontrol ile; b: Eritici Kontrol ile; c: Pozitif Kontrol ile karşılaştırmada fark önemlidir.

a₁b₁c₁: P < 0.05

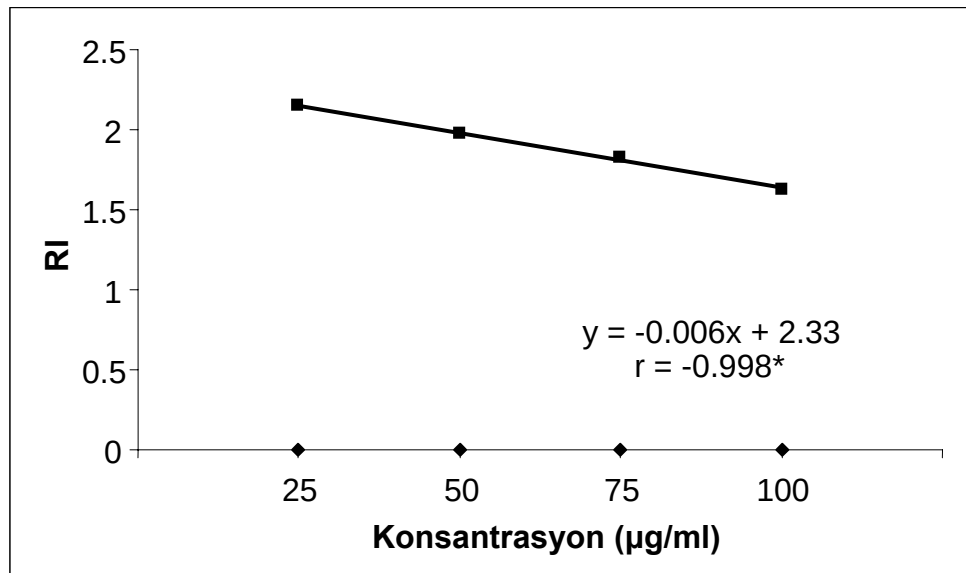
a₂b₂c₂: P < 0.01

a₃b₃c₃: P < 0.001



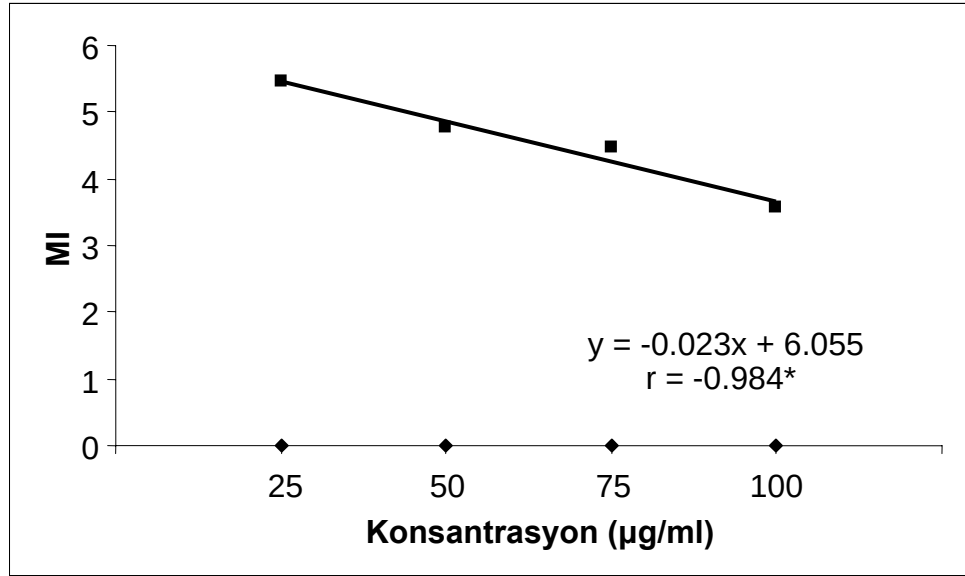
Şekil 4.19.Farklı Dozlarda Benzol Peroksit ile 24 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde RI'nin Doza Bağlı Olarak Azalmasını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.

* : $P < 0.01$



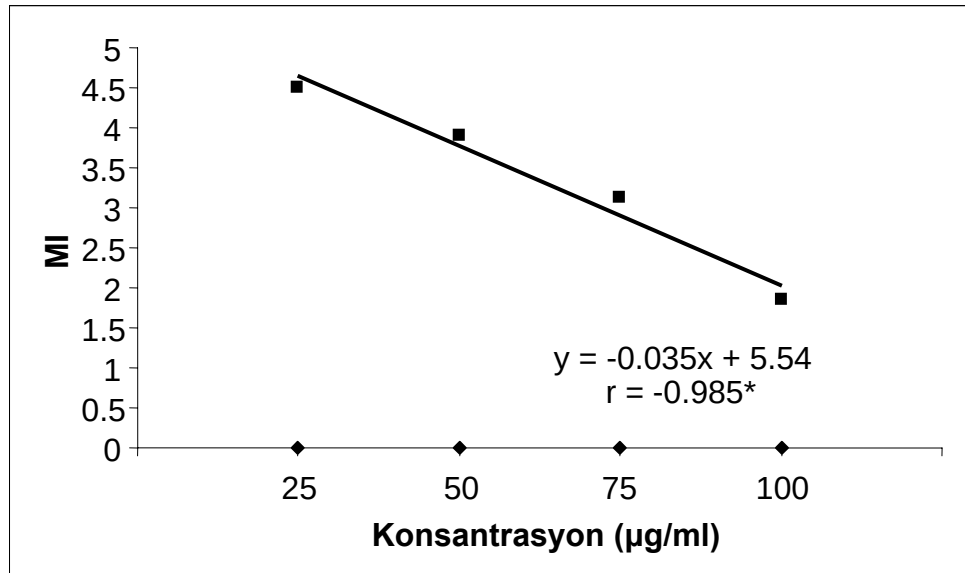
Şekil 4.20.Farklı Dozlarda Benzol Peroksit ile 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde RI'nin Doza Bağlı Olarak Azalmasını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.

* : $P < 0.01$



Şekil 4.21. Farklı Dozlarda Benzol Peroksit ile 24 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde MI'in Doza Bağlı Olarak Azalmasını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.

* : $P < 0.05$



Şekil 4.22. Farklı Dozlarda Benzol Peroksit ile 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde MI'in Doza Bağlı Olarak Azalmasını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.

* : $P < 0.05$

4.4. Benzol Peroksit'in Mikronükleus (MN) Oluşumları Üzerindeki Etkileri

24 saat benzol peroksit ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde MN'lu hücre oranı kontrol ve eritici kontrole nazaran yüksek bulunmuştur, ancak bu artış istatistiksel olarak önemli değildir (Çizelge 4.4). Fakat bu muamele süresinde MN'lu hücre oranındaki artış doza bağlı bir durum göstermektedir (Şekil 4.23).

Benzol peroksit ile 48 saat muamele edilmiş kültürlerde ise 75 µg/ml konsantrasyonda MN'lu hücre oranının sadece kontrole nazaran önemli derecede arttığı bulunmuştur. 100 µg/ml konsantrasyonundaki benzol peroksit ise MN'lu hücre oranını hem kontrol hem de eritici kontrole göre önemli derecede arttırmıştır (Çizelge 4.4). Muameleli kültürlerdeki MN'lu hücre oranındaki artış pozitif kontroldeki kadar olmamıştır (Çizelge 4.4).

İki nükleuslu hücrelerde rastlanan mikronükleuslar değişik büyüklüktedir (Şekil 4.24; Şekil 4.25; Şekil 4.26).

Çizelge 4.4. Değişik Dozlarda Benzol Peroksit ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş Olan İnsan Periferik Lenfositlerinde MN'lu İki Nükleuslu Hücre Yüzdesi.

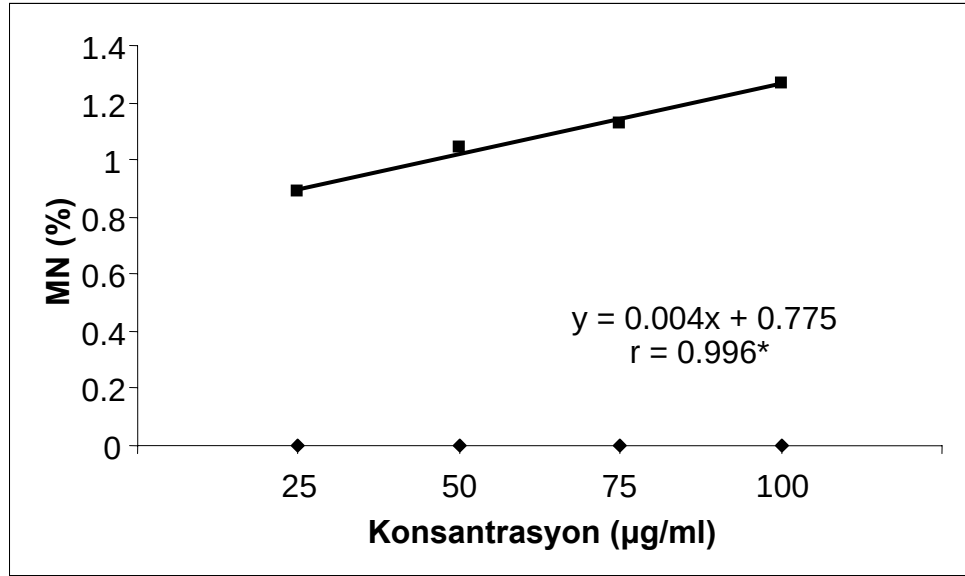
Test maddesi	Muamele süresi (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	Mikronükleuslu hücre yüzdesi (MN±SH)
Kontrol	--	--	0.59 ± 0.14
DMSO (eritici kontrol)	24	20 µl	0.80 ± 0.10
MMC (pozitif kontrol)	24	0.25	6.50 ± 0.82
BPO	24	25	0.89 ± 0.13 c ₃
BPO	24	50	1.04 ± 0.16 c ₃
BPO	24	75	1.13 ± 0.19 c ₃
BPO	24	100	1.27 ± 0.21 c ₃
DMSO (eritici kontrol)	48	20 µl	0.65 ± 0.12
MMC (pozitif kontrol)	48	0.25	43.62 ± 7.60
BPO	48	25	1.08 ± 0.22 c ₃
BPO	48	50	1.28 ± 0.24 c ₃
BPO	48	75	1.54 ± 0.29 a ₁ c ₃
BPO	48	100	2.51 ± 0.29 a ₂ b ₂ c ₃

a: Kontrol ile; b: Eritici Kontrol ile; c: Pozitif Kontrol ile karşılaştırmada fark önemlidir.

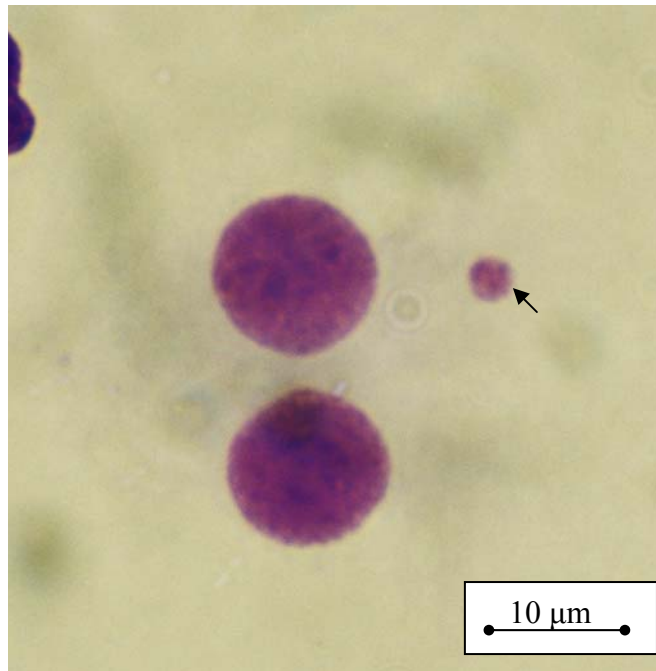
a₁b₁c₁: P < 0.05

a₂b₂c₂: P < 0.01

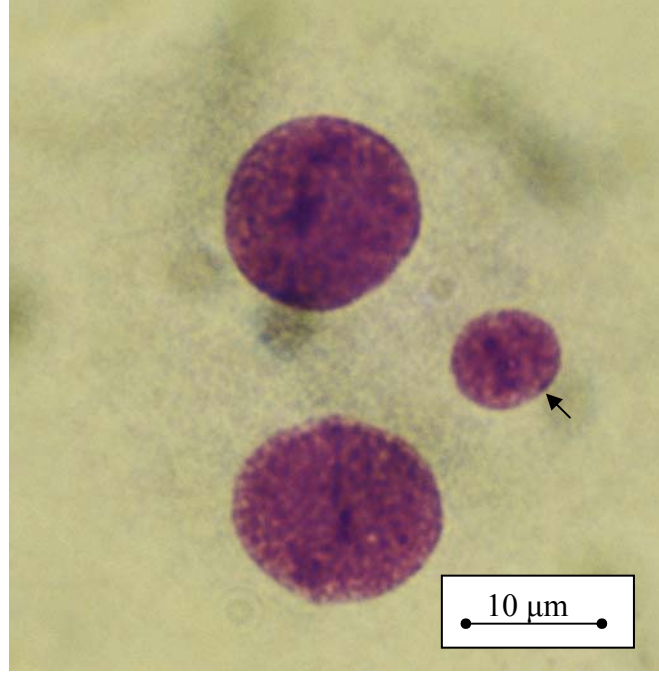
a₃b₃c₃: P < 0.001



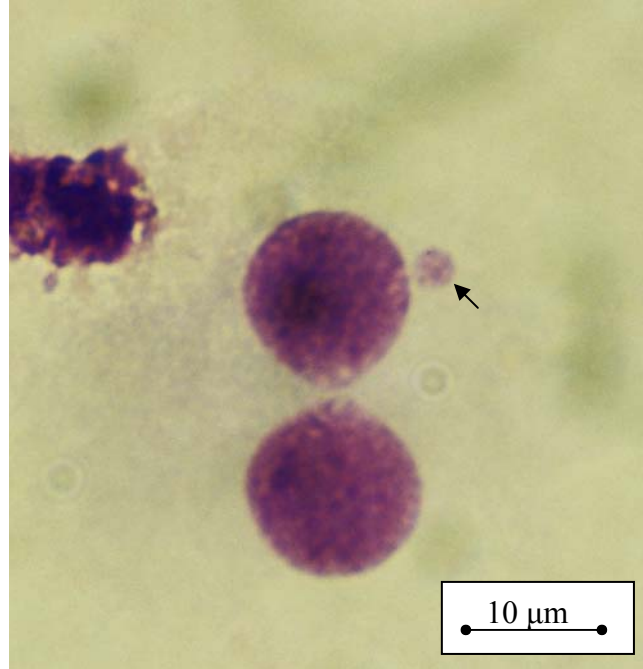
Şekil 4.23. Farklı Dozlarda Benzol Peroksit ile 24 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde MN'lu Hücre Oranının Doza Bağlı Olarak Artışını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.
* : $P < 0.01$



Şekil 4.24. Mikronükleus taşıyan iki nükleuslu hücre (50 µg/ml benzol peroksit, 48 saatlik muamele, ♀) (x1000).



Şekil 4.25. Büyük bir mikronükleusa sahip iki nükleuslu hücre (100 µg/ml benzol peroksit, 48 saatlik muamele, ♂) (x1000).



Şekil 4.26. Mikronükleus taşıyan iki nükleuslu hücre (50 µg/ml benzol peroksit, 48 saatlik muamele, ♀) (x1000).

5. TARTIŞMA

Bu çalışma ilaç endüstrisinde reçeteli ya da reçetesiz akne ilacı olarak veya gıda endüstrisinde unları beyazlatmak amacıyla kullanılan ve bu şekilde tüm insanları etkileyen benzol peroksit'in genotoksik etkiye sahip olup olmadığını insan periferik lenfositlerinde kromozom aberasyonu (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri ile araştırmak amacıyla yapılmıştır. Bu çalışmada, insan periferik lenfositleri *in vitro* olarak 25, 50, 75 ve 100 µg/ml konsantrasyonlarındaki benzol peroksit ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş ve çalışmadan elde edilen sonuçlar diğer araştırmacıların sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

5.1. Benzol Peroksit'in Kardeş Kromatid Değişimleri (KKD) ve Kromozom Aberasyonları (KA) Üzerindeki Etkileri

KKD ve KA testleri, kimyasal maddelerin genotoksik risklerinin belirlenmesinde kullanılan en hassas indikatör testler arasında yer almaktadır (Perry ve ark. 1975; Carrano ve ark. 1978). Bu çalışmada benzol peroksit'in KKD'de genel olarak artış meydana getirdiği ancak bu artışın sadece en yüksek doz (100 µg/ml) ile 48 saatlik muamele süresinde kontrole göre önemli olduğu bulunmuştur. Yapılan bir başka çalışmada, benzol peroksit'in Chinese hamster yumurtalık hücre kültüründe metabolik aktivasyonun olduğu durumda KKD'yi yaklaşık iki kat kadar arttırdığı ancak metabolik aktivasyonun olmadığı ortamda KKD'de artış meydana getirmediği bildirilmiştir (Jarventaus ve ark. 1984; Binder ve ark. 1995'ten). Benzol peroksit'in KKD üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla yapılan bir başka çalışmada da Chinese hamster V79 hücrelerinde benzol peroksit'in KKD'de kontrole göre 1.2 kat kadar küçük bir artışa neden olduğu bildirilmiştir (Swierenga ve ark. 1987; Binder ve ark. 1995'ten). Görüldüğü gibi bizim çalışmamızda bulunan sonuçlar, benzol peroksit'in KKD üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla farklı canlılarda yapılan diğer iki çalışmadan elde edilen sonuçları desteklemektedir.

Yaptığımız çalışmada benzol peroksit'in insan periferik lenfositlerinde düşük konsantrasyonlarda (25 ve 50 µg/ml) 24 saatlik muamele süresinde kromozom

aberrasyonlarını uyarmadığı ancak yüksek konsantrasyonlarda (75 ve 100 µg/ml) kromozomal anormallikleri arttırdığı saptanmıştır. 48 saatlik muamele süresinde benzol peroksit'in tüm konsantrasyonlarda kontrole nazaran KA'yı arttırdığı saptanmıştır. Ayrıca bu muamele süresinde KA'daki artışın doza bağlı olduğu belirlenmiştir. Benzol peroksit'in KA üzerindeki etkisini araştıran bir başka çalışma Ishidate ve ark. (1984) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada Chinese hamster fibroblast hücre kültüründe maksimum 0.2 mg/ml benzol peroksit'in kromozomal anormallikleri arttırmadığı saptanmıştır. Bizim çalışmamızın sonuçları bu çalışmadan elde edilen sonuçlarla uyusmamaktadır. Bunun sebebi olarak çalışmalarda kullanılan hücre hattının birbirlerinden farklı olması söylenebilir. Ayrıca başka araştırmacılar da unlarda beyazlatma maddesi olarak kullanılan diğer kimyasallarla yaptıkları çalışmaların bazılarında KA ve KKD'nin arttığını bazılarında ise artmadığını belirlemişlerdir. Örneğin Tsuda ve ark. (1981), nitrojen dioksit'in (NO₂) kromozom morfolojisi üzerindeki etkilerini 0, 5, 10, 20, 50 ve 100 ppm NO₂ ile 10 dakika muamele edilen Chinese hamster V79-H3 hücrelerinde KKD ve KA testleri ile araştırmışlar, KKD ve KA'da doza bağlı artış olduğunu belirlemişlerdir. Ishidate ve ark. (1984), Salmonella/mikrozom testi ve Chinese hamster fibroblast hücrelerinde *in vitro* KA testi ile 190 sentetik ve 52 doğal gıda katkı maddesinin mutajenik etkilerini araştırmışlar ve 0.15 mg/ml klor dioksit'in KA testinde negatif sonuç verdiğini ancak 0.4 mg/petri klor dioksit'in Ames testinde pozitif etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bu araştırmacılar unlarda beyazlatma maddesi olarak kullanılan potasyum bromat'ı da test maddesi olarak belirlemişler ve 0.25 mg/kg potasyum bromat'ın KA testinde, 3.0 mg/petri potasyum bromat'ında Ames testinde pozitif sonuç verdiğini belirtmişlerdir. Fujie ve ark. (1988), sıçan kemik iliğinde i.p. enjeksiyon ile verilen potasyum bromat'ın doza bağlı olarak KA'yı arttırdığını belirlemişlerdir. Yadav ve Seth (1998), NO₂ ve NO gazlarının karışımının genotoksik etkisini insan lenfositlerinde MI, KA, KKD ve satellit assosiasyonunu (SAs) testleriyle araştırmışlar ve çalışmada tüm parametrelerin kontrole göre önemli ölçüde arttığını belirlemişlerdir. Sutiakova ve ark. (2004), içme sularındaki klor'un kromozom hasarları oluşturmadaki aktivitesini dişi koyunların periferik

lenfositlerinde KA ve MN testleri ile araştırmışlar ve hem anormal hücre frekansının hem de MN frekansının kontrole göre önemli derecede arttığını belirlemişlerdir.

Benzol peroksit'in mutajenik aktivitesini belirlemek amacıyla yapılan Ames test çalışmalarında da birbirlerinden farklı sonuçlar bildirilmiştir. *Salmonella typhimurium*'un TA1535, TA1537 ve TA1538 suşları kullanılarak yapılan bir çalışmada (+/-S9 mix) benzol peroksit'in mutajenik etkileri araştırılmış ve bu maddenin negatif sonuç verdiği bildirilmiştir (Litton Bionetics, 1975: Binder ve ark. 1995'ten). Benzer şekilde TA98 ve TA100 suşları ile yapılan bir başka çalışmada (+S9 mix) benzol peroksit'in negatif sonuç verdiği belirtilmiştir (Yamaguchi ve Yamashita, 1980: Binder ve ark. 1995'ten). TA97, TA98, TA100, TA1535, TA1537, TA1538 ve reaktif oksijen türlerine hassas TA102 suşlarını kullanılarak yapılan deneylerde benzol peroksit'in etkisiz olduğunu bildirilmiştir (DeFlora ve ark. 1984: Binder ve ark. 1995'ten). Ishidate ve ark. (1984), 5.0 mg/petri benzol peroksit'in *S. typhimurium*'un TA98, TA100, TA1535 ve TA1537 suşlarında mutajenik aktiviteden yoksun olduğunu belirlemişlerdir. Bir başka çalışmada 0.001, 0.005, 0.01, 0.05 ve 0.1 µg/petri benzol peroksit'in mutajenik etkilerini belirlemek için TA97 ve TA102 suşları kullanılmış ve negatif sonuç (+/-S9 mix) bildirilmiştir (Fujita ve Sasaki, 1987: SIDnitial Assessment Report, 2002'den). Diğer bir çalışmada benzol peroksit'in TA97, TA98, TA100 ve TA1535 suşlarında negatif sonuç verdiği belirtilmiştir (Zeiger ve ark. 1988: Binder ve ark. 1995'ten). Daha yakın zamanlarda Dillon ve ark. (1998) tarafından düzenlenen deneylerde 1-100 µg/petri benzol peroksit'in TA97, TA100, TA102 ve TA104 suşlarında negatif sonuç verdiği belirlenmiştir. TA98, TA100, TA1535 ve TA1537 suşları kullanılarak yapılan deneylerde (+/-S9 mix), 0.274, 0.74, 2.22, 6.67, 20 ve 60 µg/petri benzol peroksit'in negatif sonuç verdiği bildirilmiştir (National Institute of Environmental Research (NIER), 2001: SIDnitial Assessment Report, 2002'den). Ancak bu çalışmaların yanı sıra benzol peroksit'in Ames testinde pozitif sonuç verdiğini belirten çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birisinde benzol peroksit'in TA98, TA100, TA1535 ve TA102 suşlarında (+/-S9 mix) negatif sonuç verirken TA97 suşunda S9 mix yokken zayıf mutajenik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bunların dışında, bu çalışmalarda emülsiyon veya lipozom olarak kullanılan ticari bir

benzol peroksit losyonunun TA97 ve TA1537 suşlarında (-S9 mix) pozitif sonuç verdiği belirtilmiştir (Matula ve ark. 1987; Binder ve ark. 1995'ten). Benzer şekilde Sultana ve ark. (2004), yaptıkları çalışmalarda benzol peroksit'in TA98 ve TA100 (+S9 mix) suşlarında pozitif sonuç verdiğini ve 13-sis retinoik asit'in bu etkileri ortadan kaldırdığını belirlemişlerdir.

Görüldüğü gibi gerek bizim gerekse başka araştırmacıların sonuçlarından anlaşıldığı gibi benzol peroksit'in genotoksitesini belirlemek amacıyla yapılan testlerden farklı sonuçlar alınmıştır. Bu konuda kesin yargıya varabilmek için *in vivo* aberasyon testleri ile benzol peroksit'in genotoksik olup olmadığının araştırılması gerekir.

Bizim yaptığımız çalışmada benzol peroksit'in daha çok kromatid ve kromozom kırıklarına sebep olduğu saptanmıştır. Daha önce yapılan birçok çalışmada da benzol peroksit'in serbest radikaller üreterek DNA tek iplik kırıklarına neden olduğu belirtilmiştir (Gensler ve Bowden, 1983; Saladino ve ark. 1985; Birnboim, 1986; Hartley ve ark. 1985 ve 1987; Swierenga ve ark. 1987; Binder ve ark. 1995'ten; Swauger ve ark. 1991; Kensler ve ark. 1991; Binder ve ark. 1995'ten). Hazlewood ve Davies (1996), benzol peroksit'in benzoloksil ve fenil radikalleri oluşturduğunu, bu radikallerin nükleobazlarla, şekerlerle, nükleositlerle, nükleotidlerle, DNA ve RNA ile reaksiyona girdiğini belirlemişlerdir. Ayrıca DNA'nın şeker-fosfat omurgasından H ayırarak iplik kırıkları oluşturmada benzoloksil radikallerinin fenil radikallerine göre daha etkili olduğunu da belirlemişlerdir. Bu sonuçlardan yola çıkarak benzol peroksit'in ürettiği benzoloksil ve fenil radikalleri aracılığıyla DNA molekülünün şeker-fosfat omurgasındaki fosfodiester bağı kopardığı söylenebilir. Bu DNA hasarı sonucunda da kromatid ve kromozom kırıklarına meydana gelmektedir.

5.2. Benzol Peroksit'in DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri

Bu çalışmada benzol peroksit'in insan periferik lenfositlerinde DNA replikasyonu üzerindeki etkisi replikasyon indeksinin (RI) (Proliferasyon

indeksi=PI), mitoz bölünme üzerindeki etkisi ise mitotik indeksin (MI) saptanması yoluyla belirlenmiştir. Bizim çalışmamızda benzol peroksit'in 24 saatlik muamelede RI ve MI'ı etkilemediği saptanmıştır. Ancak 48 saatlik muamele süresinde benzol peroksit'in RI ve MI'te kontrole nazaran önemli derecede düşüşe neden olduğu belirlenmiştir. 48 saatlik muamele süresinde RI ve MI'te gözlenen bu azalma doza bağlı bir durum göstermiştir. Saladino ve ark. (1985), çeşitli aldehit ve peroksitlerin insan bronşiyal epitel hücrelerinde büyüme ve farklılaşma üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve benzol peroksit'in mitojenik olmadığını, 0.065 mM benzol peroksit'in büyümeyi kontrole göre % 50 oranında ortadan kaldırdığını belirlemişlerdir. Babich ve ark. (1996), benzol peroksit'in sitotoksitesini insan keratinosit RHEK-1 hücre hattında araştırmışlar ve 0.15 mM benzol peroksit ile 1 saatlik muamelenin geri dönüşsüz sitotoksite oluşturduğunu, 0.06 mM benzol peroksit ile 7 günlük muamelede büyüme kinetiğinin engellendiğini belirlemişlerdir. Bu sonuçlardan benzol peroksit'in DNA replikasyonunu olumsuz yönde etkilediğini ve ayrıca mitoz bölünmeyi olumsuz etkileyerek hücre bölünmesini baskı altına aldığını söyleyebiliriz.

5.3. Benzol Peroksit'in Mikronükleus (MN) Oluşumları Üzerindeki Etkileri

Yaptığımız çalışmada benzol peroksit'in insan periferik lenfositlerinde MN oluşumunu sadece yüksek iki konsantrasyonda (75 µg/ml ve 100 µg/ml) 48 saatlik muamele süresinde arttırdığı, diğer konsantrasyon ve muamele sürelerinde ortaya çıkan artışın önemli olmadığı bulunmuştur. Bununla tutarlı olarak 2000 yılında yapılan bir çalışmada 50, 100, 200 mg/kg benzol peroksit'in ICR (SPF) farelerine i.p. yoldan verilmesinin MN oluşumunu uyarmadığı bulunmuştur (NIER, 2001: SIDnitial Assessment Report, 2002'den). Bu sonuçlar da bizim sonuçlarımızı destekler yöndedir. Ayrıca benzol peroksit gibi unlarda beyazlatma maddesi olarak kullanılan kimyasal maddelerle yapılan çalışmaların birçoğunda bu maddelerin MN oluşumunu uyardığı bildirilmiştir. Örneğin Hayashi ve ark. (1988), 47 kimyasal maddenin genotoksik etkisini farelerde MN testi ile araştırmışlar ve farelere i.p. enjeksiyon yöntemiyle verilen klor dioksit'in MN oluşumunu uyardığını, ayrıca hem i.p. yoldan

hem de oral yoldan verilen potasyum bromat'ın MN oluşumunu uyardığını belirlemişlerdir. Nakajima ve ark. (1989), MS/Ae ve CD-1 erkek farelerde 18.8, 37.5, 75 ve 150 mg/kg potasyum bromat'ın i.p. veya 37.5, 75, 150, 300 mg/kg oral gavaj (p.o) yoluyla verilmesinin her iki fare dölünde de doza bağlı olarak MN oluşumunu uyardığını belirlemişlerdir. Hayashi ve ark. (1989) tarafından yapılan bir başka çalışmada MS/Ae ve CD-1 farelerinde potasyum bromat'ında içinde yer aldığı 17 kimyasalın i.p. veya p.o. yoldan verilmesinin MN oluşumu üzerindeki etkileri araştırılmış ve her iki fare ırkında da her iki yoldan verilen potasyum bromat'ın MN oluşumunu uyardığı belirlenmiştir. Sai ve ark. (1992), F344 sıçanlarında i.p. yoldan verilen 60 mg/kg potasyum bromat'ın 32 saat sonra MN frekansını arttırdığını belirlemişlerdir. Robbiano ve ark. (1999), sıçan ve insan böbrek hücre kültüründe MN oluşumu ve DNA hasarlarının uyarılması üzerinde çeşitli maddelerin etkilerini araştırdıkları deneylerde 0.56-1.8 mM konsantrasyonlarındaki potasyum bromat'ın hem insan hem de sıçan böbrek hücre kültüründe MN frekansını, Comet testinde DNA kırıklarını doza bağlı olarak arttırdığını belirlemişlerdir. Liu ve ark. (1999), klor ile muameleli su örneklerinin mutajenik etkilerini Ames testi, Chinese hamster akciğer hücrelerinde KKD testi ve gümüş sazanı'nın periferik eritrositlerinde MN testi ile araştırmışlardır. Çalışmaların sonunda klorla muamele edilmiş su örneklerinin hem Ames testinde hem de KKD ve MN testlerinde pozitif sonuç verdiğini belirlemişlerdir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada benzol peroksit'in insan periferik lenfositlerinde sadece en yüksek konsantrasyonda (100 µg/ml) 48 saatlik muamelede KKD'yi arttırdığı belirlenmiştir.

Ayrıca bu çalışmada benzol peroksit ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde 24 saatlik muamele süresinde 75 µg/ml ve 100 µg/ml konsantrasyonlarda, 48 saatlik muamele süresinde tüm konsantrasyonlarda kromozom aberasyonlarını hem kontrol hem de eritici kontrole göre arttırdığı belirlenmiştir. KA'da gözlenen bu artış doza bağlıdır.

Bu çalışmalarda benzol peroksit'in 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde hem RI hem de MI'in düşmesine neden olduğu ancak bu azalmanın 48 saatlik muamelede kontrole göre önemli olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca yapılan çalışmalarda benzol peroksit'in insan periferik lenfositlerinde sadece yüksek iki konsantrasyonda (75 µg/ml ve 100 µg/ml) 48 saatlik muamelede MN oluşumunu uyardığı belirlenmiştir.

Benzol peroksit özellikle akne tedavisi için kullanıldığından benzol peroksit içeren ürünlerle tedavi gören hastalarda yapılan epidemiyolojik çalışmalarda deri kanseri ile benzol peroksit kullanımı arasında bir ilişkinin olmadığı belirlenmiştir (Cartwright ve ark. 1988; Hogan ve ark. 1991). Bununla birlikte yapılan birçok kanserojenite çalışmasında benzol peroksit'in deney hayvanlarında kimyasal maddelerle kanser oluşumunda tamamen kanserojen ya da kanser başlatıcı aktiviteye sahip olmamakla birlikte tümör geliştirici ve ilerletici potansiyelinin olduğu gösterilmiştir (Slaga ve ark. 1981; Odukoya ve Shklar, 1984; Kurokawa ve ark. 1984; Reinert ve ark. 1984; Kraus ve ark. 1995'ten; O'Connell ve ark. 1986; Schweizer ve ark. 1987; DiGiovanni ve ark. 1992; Kraus ve ark. 1995'ten; NTP, 1994; Kraus ve ark. 1995'ten; Qiu ve ark. 2000).

Bunların dışında benzol peroksit'in serbest radikaller üreterek DNA iplik kırıklarını uyardığını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Gensler ve Bowden, 1983; Saladino ve ark. 1985; Birnboim, 1986; Hartley ve ark. 1985 ve 1987;

Swierenga ve ark. 1987; Binder ve ark. 1995'ten; Swauger ve ark. 1991; Kensler ve ark. 1991; Binder ve ark. 1995'ten).

Ayrıca yapılan birçok çalışmada benzol peroksit'in hücreler arası haberleşmeyi engellediği bulunmuştur (Slaga ve ark. 1981; Lawrence ve ark. 1984; Binder ve ark. 1995; Hu ve Cotgreave, 1995; Jansen ve Jongen, 1996; Jansen ve ark. 1996; Budunova ve ark. 1996).

Yapılan çalışmalar bir bütün olarak değerlendirildiğinde benzol peroksit'in genotoksik ve kanserojenik bir risk taşıyabileceği söylenebilir. Ancak benzol peroksit'in genotoksitesi hakkında kesin sonuca ulaşmak için *in vivo* genotoksidite testleri ile ilave çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- ABE, S. and SASAKI, M., 1977. Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchanges in Chinese Hamster Cells Exposed to Various Chemicals. *J. Natl. Cancer Inst.*, 58(6):1635-41.
- AHMAD, S., HODA, A. and AFZAL, M., 2002. Additive Action of Vitamins C and E against Hydrocortisone-Induced Genotoxicity in Human Lymphocyte Chromosomes. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 72(4):204-9.
- AHMAD, M.S., SHEEBA and AFZAL, M., 2004. Amelioration of Genotoxic Damage by Certain Phytoproducts in Human Lymphocyte Cultures. *Chem. Biol. Interact.*, 149(2-3):107-15.
- AKMAN, S.A., DOROSHOW, J.H. and KENSLER, T.W., 1992. Copper-Dependent Site-Specific Mutagenesis by Benzoyl Peroxide in the supF Gene of the Mutation Reporter Plasmid pS189. *Carcinogenesis*, 13(10):1783-7.
- AKMAN, S.A., DOROSHOW, J.H. and KENSLER, T.W., 1993. Copper Ion-Mediated Modification of Bases in DNA *In Vitro* by Benzoyl Peroxide. *Carcinogenesis*, 14(9):1971-4.
- ALVES, I., OLIVEIRA, N.G., LAIRES, A., RODRIGUES, A.S. and RUEFF, J., 2000. Induction of Micronuclei and Chromosomal Aberrations by the Mycotoxin Patulin in Mammalian Cells: Role of Ascorbic Acid as a Modulator of Patulin Clastogenicity. *Mutagenesis*, 15(3):229-34.
- ALY, F.A. and DONYA, S.M., 2002. *In Vivo* Antimutagenic Effect of Vitamins C and E against Rifampicin-Induced Chromosome Aberrations in Mouse Bone-Marrow Cells. *Mutat. Res.*, 518(1):1-7.
- ANDERSON, D., BASARAN, N., BLOWERS, S.D. and EDWARDS, A.J., 1995. The Effect of Antioxidants on Bleomycin Treatment in *In Vitro* and *In Vivo* Genotoxicity Assays. *Mutat. Res.*, 329(1):37-47.
- ANTUNES, L.M. and TAKAHASHI, C.S., 1999. Protection and Induction of Chromosomal Damage by Vitamin C in Human Lymphocyte Cultures. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 19(1):53-9.

- ATHAR, M., LLOYD, J.R., BICKERS, D.R. and MUKHTAR, H., 1989. Malignant Conversion of UV Radiation and Chemically Induced Mouse Skin Benign Tumors by Free-Radical-Generating Compounds. *Carcinogenesis*, 10(10):1841-5.
- ATHAR, M., AGARWAL, R., WANG, Z.Y., LLOYD, J.R., BICKERS, D.R. and MUKHTAR, H., 1991. All-Trans Retinoic Acid Protects against Conversion of Chemically Induced and Ultraviolet B Radiation-Induced Skin Papillomas to Carcinomas. *Carcinogenesis*, 12(12):2325-9.
- AWOGI, T., MURATA, K., UEJIMA, M., KUWAHARA, T., ASANAMI, S., SHIMONO, K. and MORITA, T., 1992. Induction of Micronucleated Reticulocytes by Potassium Bromate and Potassium Chromate in CD-1 Male Mice. *Mutat. Res.*, 278(2-3):181-5.
- BABICH, H., ZUCKERBRAUN, H.L., WURZBURGER, B.J., RUBIN, Y.L., BORENFREUND, E. and BLAU, L., 1996. Benzoyl Peroxide Cytotoxicity Evaluated *In Vitro* with the Human Keratinocytes Cell Line, RHEK-1. *Toxicology*, 106(1-3):187-96.
- BASLER, A., VON DER HUDE, W. and SCHEUTWINKEL, M., 1987. Screening of the Food Additive Propionic Acid for Genotoxic Properties. *Food Chem. Toxicol.*, 25(4):287-90.
- BANERJEE, T.S. and GIRI, A.K., 1986. Effects of Sorbic Acid and Sorbic Acid-Nitrite *In Vivo* on Bone Marrow Chromosomes of Mice. *Toxicol. Lett.*, 31(2):101-6.
- BENCINI, P.N., GALIMBERTI, M. and SIGNORINI, M., 1994. Utility of Topical Benzoyl Peroxide for Prevention of Surgical Skin Wound Infection. *J. Dermatol. Surg. Oncol.*, 20 (8):538-40.
- BINDER, R.L., AARDEMA, M.J. and THOMPSON, E.D., 1995. Benzoyl Peroxide: Review of Experimental Carcinogenesis and Human Safety Data. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 391:245-94.
- BIRNBOIM, H.C., 1986. DNA Strand Breaks in Human Leukocytes Induced by Superoxide Anion, Hydrogen Peroxide and Tumor Promoters Are Repaired

- Slowly Compared to Breaks Induced by Ionizing Radiation. *Carcinogenesis*, 7(9):1511-7.
- BOBYLEVA, L.A., CHOPIKASHVILI, L.V., ALEKHINA, N.I. and ZASUKHINA, G.D., 1993. Modification with Ascorbic Acid of the Level of Spontaneous and Induced Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchanges in Lymphocytes of Workers in Contact with Molybdenum Salts. *Genetika*, 29(3):430-4.
- BONFIL, R.D., MOMIKI, S., CONTI, C.J. and KLEIN-SZANTO, A.J., 1989. Benzoyl Peroxide Enhances the Invasive Ability of a Mouse Epidermal Carcinoma Cell Line. *Int. J. Cancer.*, 44(1):165-9.
- BUDUNOVA, I.V., CARBAJAL, S. and SLAGA, T.J., 1996. Effect of Diverse Tumor Promoters on the Expression of Gap-Junctional Proteins Connexin (Cx)26, Cx31.1 and Cx43 in SENCAR Mouse Epidermis. *Mol. Carcinog.*, 15(3):202-14.
- BUSCHINI, A., CARBONI, P., FURLINI, M., POLI, P. and ROSSI, C., 2004. Sodium Hypochlorite-, Chlorine Dioxide- and Peracetic Acid-Induced Genotoxicity Detected by the Comet Assay and *Saccharomyces cerevisiae* D7 tests. *Mutagenesis*, 19(2):157-62.
- CABRERA, G., 2000. Effect of Five Dietary Antimutagens on the Genotoxicity of Six Mutagens in the Microscreen Prophage-Induction Assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 36(3):206-20.
- CADENAS, S. and BARJA, G., 1999. Resveratrol, Melatonin, Vitamin E, and Pbn Protect Against Renal Oxidative DNA Damage Induced by the Kidney Carcinogen KBrO₃. *Free Radic. Biol. Med.*, 26(11-12):1531-7.
- CARRANO, A.V., THOMPSON, L.L., LINDI, P.A. and MINKLER, J.L., 1978. Sister Chromatid Exchanges as an Indicator of Mutagenesis. *Nature*, 271, 551-553.
- CARTWRIGHT, R.A., HUGHES, B.R. and CUNLIFFE, W.J., 1988. Malignant Melanoma, Benzoyl Peroxide and Acne: A Pilot Epidemiological Case-Control Investigation. *Br. J. Dermatol.*, 118(2):239-42.

- CECCHI, A.O. and TAKAHASHI, C.S., 1999. Comparative Study of the Effects of Vitamin C and Bleomycin on Smokers' and Non-smokers' Lymphocytes in Clastogenicity Assays. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 19(1):43-51.
- CHO, D.H., HONG, J.T., CHIN, K., CHO, T.S. and LEE, B.M., 1993. Organotropic Formation and Disappearance of 8-hydroxydeoxyguanosine in the Kidney of Sprague-Dawley Rats Exposed to Adriamycin and KBrO₃. *Cancer Lett.*, 74(3):141-5.
- COORAY, R., KIESSLING, K.H. and LINDAHL-KIESSLING, K., 1982. The Effects of Patulin and Patulin-Cysteine Mixtures on DNA Synthesis and the Frequency of Sister-Chromatid Exchanges in Human Lymphocytes. *Food Chem. Toxicol.*, 20(6):893-8.
- COVE, J.H. and HOLLAND, K.T., 1983. The Effect of Benzoyl Peroxide on Cutaneous Micro-organism *In Vitro*. *J. Appl. Bacteriol.*, 54(3):379-82.
- COZZI, R., RICORDY, R., AGLITTI, T., GATTA, V., PERTICONE, P. and DE SALVIA, R., 1997. Ascorbic Acid and Beta-Carotene as Modulators of Oxidative Damage. *Carcinogenesis*, 18(1):223-8.
- CROSBY, L.M., HYDER, K.S., DEANGELO, A.B., KEPLER, T.B., GASKILL, B., BENAVIDES, G.R., YOON, L. and MORGAN, K.T., 2000. Morphologic Analysis Correlates with Gene Expression Changes in Cultured F344 Rat Mesothelial Cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 169(3):205-21.
- DEANGELO, A.B., GEORGE, M.H., KILBURN, S.R., MOORE, T.M. and WOLF, D.C., 1998. Carcinogenicity of Potassium Bromate Administered in the Drinking Water to Male B6C3F1 Mice and F344/N Rats. *Toxicol. Pathol.*, 26(5):587-94.
- DILLON, D., COMBES, R. and ZEIGER, E., 1998. The Effectiveness of *Salmonella* Strains TA100, TA102 and TA104 for Detecting Mutagenicity of Some Aldehydes and Peroxides. *Mutagenesis*, 13(1):19-26.
- DOUGLAS, G.R., NESTMANN, E.R. and LEBEL, G., 1986. Contribution of Chlorination to the Mutagenic Activity of Drinking Water Extracts in *Salmonella* and Chinese Hamster Ovary Cells. *Environ. Health. Perspect.*, 69:81-7.

- DURAN, H.A., LANFRANCHI, H., PALMIERI, M.A. and DE REY B.M., 1993. Inhibition of Benzoyl Peroxide-Induced Tumor Promotion and Progression by Copper(II)(3,5-diisopropylsalicylate)₂. *Cancer Lett.*, 69(3):167-72.
- DUYDU, Y., 2005. Türk Toksikoloji Derneği Web Sitesi (www.turktox.org.tr) www.turktox.org.tr/guncel/BenzoilPeroksid.doc
- EDENHARDER, R., KERKHOFF, G. and DUNKELBERG, H., 1998. Effects of Beta-Carotene, Retinal, Riboflavin, Alpha-Tocopherol and Vitamins C and K1 on Sister-Chromatid Exchanges Induced by 3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-2) and Cyclophosphamide in Human Lymphocyte Cultures. *Food Chem. Toxicol.*, 36(11):897-906.
- EDER, E., FAVRE, A., STICHTMANN, C. and DEININGER, C., 1989. Induction of *sfia* SOS Function by Peroxides Using Three Different *E. coli* Strains. *Toxicol. Lett.*, 48(3):225-34.
- EGEL, C., BILALOGLU, R. and AYDEMİR, N., 2002. Inhibitory Effects of Ascorbic Acid and Folinic Acid on Chromosome Aberrations Induced by Pyrimethamine *In Vitro*. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 22(5):353-62.
- EPSTEIN, S.S., ARNOLD, E., ANDREA, J., BASS, W. and BISHOP, Y., 1972. Detection of Chemical Mutagens by the Dominant Lethal Assay in the Mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 23:288-325.
- EPSTEIN, J.H., 1988. Photocarcinogenesis Promotion Studies with Benzoyl Peroxide (BPO) and Croton Oil. *J. Invest. Dermatol.*, 91(2):114-6.
- FAHMY, M.A. and ALY, F.A., 2000. *In Vivo* and *In Vitro* Studies on the Genotoxicity of Cadmium Chloride in Mice. *J. Appl. Toxicol.*, 20(3):231-8.
- FERETTI, D., ZANI, C., ALBERTI, A., COPETTA, L., NARDI, G. and MONARCA, S., 2003. Evaluation of Genotoxicity of Sodium Hypochlorite, Chlorine Dioxide and Peracetic Acid Using Plant Tests. *Ann. Ig.*, 15(6):959-63.
- FERRAND, C., MARC, F., FRITSCH, P., CASSAND, P., DE SAINT BLANQUAT, G., 2000a. Genotoxicity Study of Reaction Products of Sorbic Acid. *J. Agric. Food Chem.*, 48(8):3605-10.

- FERRAND, C., MARC, F., FRITSCH, P., CASSAND, P., DE SAINT BLANQUAT, G., 2000b. Mutagenicity and Genotoxicity of Sorbic Acid-Amine Reaction Products. *Toxicol. In Vitro*, 14(5):423-8.
- FERRAND, C., MARC, F., FRITSCH, P., CASSAND, P., DE SAINT BLANQUAT, G., 2000c. Mutagenicity and Genotoxicity of Sorbic Acid-Amine Reaction Products. *Food Addit. Contam.*, 17(11):895-901.
- FERRAND, C., MARC, F., FRITSCH, P., CASSAND, P., DE SAINT BLANQUAT, G., 2000d. Chemical and Toxicological Studies of Products Resulting from Sorbic Acid and Methylamine Interaction in Food Conditions. *Amino Acids*, 18(3):251-63.
- FOLTINOVA, P., LAHITOVA, N. and EBRINGER, L., 1994. Antimutagenicity in *Euglena gracilis*. *Mutat. Res.*, 323(4):167-71.
- FOOD and AGRICULTURE ORGANISATION/WORLD HEALTH ORGANISATION EXPERT COMMITTEE on FOOD ADDITIVES, 2001. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants., World Health Organ. Tech. Rep. Ser., 901:i-viii,x,1-107.
- FUJIE, K., SHIMAZU, H., MATSUDA, M. and SUGIYAMA, T., 1988. Acute Cytogenetic Effects of Potassium Bromate on Rat Bone Marrow Cells *In Vivo*. *Mutat. Res.*, 206(4):455-8.
- GABRIELSON, E.W., SMITH, C.B. and POMMIER, Y.G., 1990. Genotoxicity of Hydrogen Peroxide and Benzoyl Peroxide for Normal Human Bronchial Epithelial Cells and Human Lung Cancer Cell Lines. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 31:150.
- GEBHART, E. and KAPPAUF, H., 1980. The Action of Three Anticlastogens on the Induction of Sister Chromatid Exchange by Trenimon and 8-Hydroxyquinoline Sulfate in Human Lymphocyte Cultures. *Environ. Mutagen.*, 2(2):191-200.
- GEETHA, T., MALHOTRA, V., CHOPRA, K. and KAUR, I.P., 2005. Antimutagenic and Antioxidant/Prooxidant Activity of Quercetin. *Indian J. Exp. Biol.*, 43(1):61-7.

- GENSLER, H.L. and BOWDEN, G.T., 1983. Evidence Suggesting a Dissociation of DNA Strand Scissions and Late-Stage Promotion of Tumor Cell Phenotype. *Carcinogenesis*, 4(12):1507-11.
- GENTILE, J.M., RAHIMI, S., ZWIESLER, J., GENTILE, G.J. and FERGUSON, L.R., 1998. Effect of Selected Antimutagens on the Genotoxicity of Antitumor Agents. *Mutat. Res.*, 402(1-2):289-98.
- GHASKADBI, S. and VAIDYA, V.G., 1991. Studies on Modulation of the Effects of Colchicine by L-Cysteine Using Bone Marrow of Swiss Mice. *Mutat. Res.*, 260(2):181-5.
- GIRI, A., KHYNRIAM, D. and PRASAD, S.B., 1998. Vitamin C Mediated Protection on Cisplatin Induced Mutagenicity in Mice. *Mutat. Res.*, 421(2):139-48.
- GIRI, U., IQBAL, M. and ATHAR, M., 1999. Potassium Bromate (KBrO₃) Induces Renal Proliferative Response and Damage by Elaborating Oxidative Stress. *Cancer Lett.*, 135(2):181-8.
- GLATT, H., 1989. Mutagenicity Spectra in *Salmonella typhimurium* Strains of Glutathione, L-Cysteine and Active Oxygen Species. *Mutagenesis*, 4(3):221-7.
- GREY, C.E. and ADLERCREUTZ, P., 2003. Ability of Antioxidants to Prevent Oxidative Mutations in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mutat. Res.*, 527(1-2):27-36.
- GUZZELLA, L., MONARCA, S., ZANI, C., FERETTI, D., ZERBINI, I., BUSCHINI, A., POLI, P., ROSSI, C. and RICHARDSON, S.D., 2004. *In Vitro* Potential Genotoxic Effects of Surface Drinking Water Treated with Chlorine and Alternative Disinfectants. *Mutat. Res.*, 564(2):179-93.
- HARRINGTON-BROCK, K., COLLARD, D.D. and CHEN, T., 2003. Bromate Induces Loss of Heterozygosity in the Thymidine Kinase Gene of L5178Y/Tk(+/-)-3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. *Mutat. Res.*, 537(1):21-8.
- HARTLEY, J.A., GIBSON, N.W., ZWELLING, L.A. and YUSPA, S.H., 1985. Association of DNA Strand Breaks with Accelerated Terminal

- Differentiation in Mouse Epidermal Cells Exposed to Tumor Promoters. *Cancer Res.*, 45(10):4867-70.
- HARTLEY, J.A., GIBSON, N.W., KILKENNY, A. and YUSPA, S.H., 1987. Mouse Keratinocytes Derived from Initiated Skin or Papillomas are Resistant to DNA Strand Breakage by Benzoyl Peroxide: A Possible Mechanism for Tumor Promotion Mediated by Benzoyl Peroxide. *Carcinogenesis*, 8(12):1827-30.
- HASEGAWA, M.M., NISHI, Y., OHKAWA, Y. and INUI, N., 1984. Effects of Sorbic Acid and Its Salts on Chromosome Aberrations, Sister Chromatid Exchanges and Gene Mutations in Cultured Chinese Hamster Cells. *Food Chem. Toxicol.*, 22(7):501-7.
- HAYASHI, M., KISHI, M., SOFUNI, T. and ISHIDATE, M. J.R., 1988. Micronucleus Tests in Mice on 39 Food Additives and Eight Miscellaneous Chemicals. *Food Chem. Toxicol.*, 26(6):487-500.
- HAYASHI, M., SUTOU, S., SHIMADA, H., SATO, S., SASAKI, Y.F. and WAKATA, A., 1989. Difference Between Intraperitoneal and Oral Gavage Application in the Micronucleus test. The 3rd Collaborative Study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test/Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan. *Mutat. Res.*, 223(4):329-44.
- HAZLEWOOD, C. and DAVIES, M.J., 1996. Benzoyl Peroxide-Induced Damage to DNA and Its Components: Direct Evidence for the Generation of Base Adduct, Sugar Radicals and Strand Breaks. *Arch. Biochem. Biophys.*, 332(1):79-91.
- HIRAKAWA, K., MIDORIKAWA, K., OIKAWA, S. and KAWANISHI, S., 2003. Carcinogenic Semicarbazide Induces Sequence-Specific DNA Damage Through the Generation of Reactive Oxygen Species and the Derived Organic Radicals. *Mutat. Res.*, 536(1-2):91-101.
- HODA, Q. and SINHA, S.P., 1993. Vitamin C-Mediated Minimisation of Rogor-Induced Genotoxicity. *Mutat. Res.*, 299(1):29-36.

- HOGAN, D.J., TO, T., WILSON, E.R., MILLER, A.B., ROBSON, D., HOLFELD, K. and LANE, P., 1991. A Study of Acne Treatments as Risk Factors for Skin Cancer of the Head and Neck. *Br. J. Dermatol.*, 125(4):343-8.
- HU, J. and COTGREAVE, I.A., 1995. Glutathione Depletion Potentiates 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA)-Induced Inhibition of Gap Junctional Intercellular Communication in WB-F344 Rat Liver Epithelial Cells: Relationship to Intracellular Oxidative Stress. 1995. *Chem. Biol. Interact.*, 95(3):291-307.
- INOUE, H., FUKUNAGA, A. and OKUBO, S., 1981. Mutagenic Effects of Nitrogen Dioxide Combined with Methylurea and Ethylurea in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 88(3):281-90.
- INOUE, K., SHIBATA, T., KOSAKA, H., UOZUMI, M., TSUDA, S. and ABE, T., 1985. Induction of Sister-Chromatid Exchanges by N-nitrosocimetidine in Cultured Human Lymphocytes and Its Inhibition by Chemical Compounds. *Mutat. Res.*, 156(1-2):117-21.
- ISHIDATE, M. J.R. and ODASHIMA, S., 1977. Chromosome Tests with 134 Compounds on Chinese Hamster Cells *In Vitro*--A Screening for Chemical Carcinogens. *Mutat. Res.*, 48(3-4):337-53.
- ISHIDATE, M. J.R., SOFUNI, T., YOSHIKAWA, K., HAYASHI, M., NOHMI, T., SAWADA, M. and MATSUOKA, A., 1984. Primary Mutagenicity Screening of Food Additives Currently Used in Japan. *Food Chem. Toxicol.*, 22(8):623-36.
- ISOMURA, K., CHIKAHIRA, M., TERANISHI, K. and HAMADA, K., 1984. Induction of Mutations and Chromosome Aberrations in Lung Cells Following *In Vivo* Exposure of Rats to Nitrogen Oxides. *Mutat. Res.*, 136(2):119-25.
- JANSEN, L.A. and JONGEN, W.M., 1996. The Use of Initiated Cells as a Test System for the Detection of Inhibitors of Gap Junctional Intercellular Communication. *Carcinogenesis*, 17(2):333-9.
- JANSEN, L.A., MESNIL, M. and JONGEN, W.M., 1996. Inhibition of Gap Junctional Intercellular Communication and Delocalization of the Cell

- Adhesion Molecule E-Cadherin by Tumor Promoters. *Carcinogenesis*, 17(7):1527-31.
- JUNG, R., COJOCEL, C., MULLER, W., BOTTGER, D. and LUCK, E., 1992. Evaluation of the Genotoxic Potential of Sorbic Acid and Potassium Sorbate. *Food Chem. Toxicol.*, 30(1):1-7.
- KANO, T., FUKUDA, M., MIZOGUCHI, I., KINOUCHI, T., NISHIFUJI, K. and OHNISHI, Y., 1987. Detection of Mutagenic Compounds in the Urine of Mice Administered Pyrene During Exposure to NO₂. *Jpn. J. Cancer Res.*, 78(10):1057-62.
- KASSIE, F., POOL-ZOBEL, B., PARZEFALL, W. and KNASMULLER, S., 1999. Genotoxic Effects of Benzyl Isothiocyanate, a Natural Chemopreventive Agent. *Mutagenesis*, 14(6):595-604.
- KATIYAR, S.K., AGARWAL, R. and MUKHTAR, H., 1993. Protection Against Malignant Conversion of Chemically Induced Benign Skin Papillomas to Squamous Cell Carcinomas in SENCAR Mice by a Polyphenolic Fraction Isolated From Green Tea. *Cancer Res.*, 53(22):5409-12.
- KAUDERER, B., ZAMITH, H., PAUMGARTEN, F.J. and SPEIT, G., 1991. Evaluation of the Mutagenicity of Beta-Myrcene in Mammalian Cells *In Vitro*. *Environ. Mol. Mutagen.*, 18(1):28-34.
- KAWANISHI, S., OIKAWA, S., MURATA, M., TSUKITOME, H. and SAITO, I., 1999. Site-Specific Oxidation at GG and GGG Sequences in Double-Stranded DNA by Benzoyl Peroxide as a Tumor Promoter. *Biochemistry*, 38(51):16733-9.
- KAYA, B., CREUS, A., VELAZQUEZ, A., YANIKOGLU, A. and MARCOS, R., 2002. Genotoxicity is Modulated by Ascorbic Acid. Studies Using the Wing Spot Test in *Drosophila*. *Mutat. Res.*, 520(1-2):93-101.
- KAYAALP, S.O., 1994. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 7. Baskı, Feryal Matbaacılık, Ankara, Cilt 1, s. 327-332.
- KHAIDAKOV, M., BISHOP, M.E., MANJANATHA, M.G., LYN-COOK, L.E., DESAI, V.G., CHEN, J.J. and AIDOO, A., 2001. Influence of Dietary

- Antioxidants on the Mutagenicity of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and Bleomycin in Female Rats. *Mutat. Res.*, 481:163-70.
- KHAN, N., SHARMA, S. and SULTANA, S., 2003. *Nigella sativa* (black cumin) Ameliorates Potassium Bromate-Induced Early Events of Carcinogenesis: Diminution of Oxidative Stress. *Hum. Exp. Toxicol.*, 22(4):193-203.
- KHAN, N. and SULTANA, S., 2004. Abrogation of Potassium Bromate-Induced Renal Oxidative Stress and Subsequent Cell Proliferation Response by Soy Isoflavones in Wistar Rats. *Toxicology*, 201(1-3):173-84.
- KHAN, N., SHARMA, S. and SULTANA, S., 2004. Attenuation of Potassium Bromate-Induced Nephrotoxicity by Coumarin (1,2-benzopyrone) in Wistar Rats: Chemoprevention against Free Radical-Mediated Renal Oxidative Stress and Tumor Promotion Response. *Redox Rep.*, 9(1):19-28.
- KIM, J., MARSHALL, M.R., DU, W.X., OTWELL, W.S. and WEI, C.I., 1999. Determination of Chlorate and Chlorite and Mutagenicity of Seafood Treated with Aqueous Chlorine Dioxide. *J. Agric. Food Chem.*, 47(9):3586-91.
- KING, J.K., EGNER, P.A. and KENSLER, T.W., 1996. Generation of DNA Base Modification Following Treatment of Cultured Murine Keratinocytes with Peroxide. *Carcinogenesis*, 17(2):317-20.
- KITANO, K., FUKUKAWA, T., OHTSUJI, Y., MASUDA, T. and YAMAGUCHI, H., 2002. Mutagenicity and DNA-Damaging Activity Caused by Decomposed Products of Potassium Sorbate Reacting with Ascorbic Acid in the Presence of Fe Salt. *Food Chem. Toxicol.*, 40(11):1589-94..
- KONOPACKA, M., WIDEL, M. and RZESZOWSKA-WOLNY, J., 1998. Modifying Effect of Vitamins C, E and Beta-Carotene against Gamma-Ray-Induced DNA Damage in Mouse Cells. *Mutat. Res.*, 417(2-3):85-94.
- KONOPACKA, M., PALYVODA, O. and RZESZOWSKA-WOLNY, J., 2002. Inhibitory Effect of Ascorbic Acid Post-Treatment on Radiation-Induced Chromosomal Damage in Human Lymphocytes *In Vitro*. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 22(6):443-50.

- KOSAKA, H., ODA, Y. and UOZUMI, M., 1985. Induction of umuC Gene Expression by Nitrogen Dioxide in *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.*, 142(3):99-102.
- KOSAKA, H., YAMAMOTO, K., ODA, Y. and UOZUMI, M., 1986. Induction of SOS Functions by Nitrogen Dioxide in *Escherichia coli* with Different DNA-Repair Capacities. *Mutat. Res.*, 162(1):1-5.
- KOSAKA, H., UOZUMI, M. and NAKAJIMA, T., 1987. Induction of SOS Functions in *Escherichia coli* and Biosynthesis of Nitrosamine in Rabbits by Nitrogen Dioxide. *Environ. Health Perspect.*, 73:153-6.
- KRAUS, A.L., MUNRO, I.C., ORR, J.C., BINDER, R.L., LEBOEUF, R.A. and WILLIAMS, G.M., 1995. Benzoyl peroxide: An Integrated Human Safety Assessment for Carcinogenicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 21, 87-107.
- KRISHNA, G., NATH, J. and ONG, T., 1986. Inhibition of Cyclophosphamide and Mitomycin C-Induced Sister Chromatid Exchanges in Mice by Vitamin C. *Cancer Res.*, 46(6):2670-4.
- KRISHNAJA, A.P. and SHARMA, N.K., 2003. Ascorbic Acid Potentiates Mitomycin C-Induced Micronuclei and Sister Chromatid Exchanges in Human Peripheral Blood Lymphocytes *In Vitro*. *Teratog. Carcinog. Mutagen. Suppl.*, 1:99-112.
- KURATA, Y., DIWAN, B.A. and WARD, J.M., 1992. Lack of Renal Tumour-Initiating Activity of a Single Dose of Potassium Bromate, a Genotoxic Renal Carcinogen in Male F344/NCr Rats. *Food Chem. Toxicol.*, 30(3):251-9.
- KUROKAWA, Y., HAYASHI, Y., MAEKAWA, A., TAKAHASHI, M., KOKUBO, T. and ODASHIMA, S., 1983. Carcinogenicity of Potassium Bromate Administered Orally to F344 Rats. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 71(5):965-72.
- KUROKAWA, Y., TAKAMURA, N., MATSUSHIMA, Y., IMAZAWA, T. and HAYASHI, Y., 1984. Studies on the Promoting and Complete Carcinogenic Activities of Some Oxidizing Chemicals in Skin Carcinogenesis. *Cancer Let.*, 24(3):299-304.

- KUROKAWA, Y., TAKAYAMA, S., KONISHI, Y., HIASA, Y., ASAHINA, S., TAKAHASHI, M., MAEKAWA, A. and HAYASHI, Y., 1986. Long-Term *In Vivo* Carcinogenicity Tests of Potassium Bromate, Sodium Hypochlorite and Sodium Chlorite Conducted in Japan. *Environ. Health Perspect.*, 69:221-35.
- KUROKAWA, Y., MATSUSHIMA, Y., TAKAMURA, N., IMAZAWA, T. and HAYASHI, Y., 1987. Relationship Between the Duration of Treatment and the Incidence of Renal Cell Tumors in Male F344 Rats Administered Potassium Bromate. *Jpn. J. Cancer Res.*, 78(4):358-64.
- KUROKAWA, Y., MAEKAWA, A., TAKAHASHI, M. and HAYASHI, Y., 1990. Toxicity and Carcinogenicity of Potassium Bromate--A New Renal Carcinogen. *Environ. Health Perspect.*, 87:309-35.
- LAWRENCE, N.J., BARKINSON, E.K. and EMMERSON, A., 1984. Benzoyl Peroxide Interferes with Metabolic Co-Operation Between Cultured Human Epidermal Keratinocytes. *Carcinogenesis*, 5(3):419-21.
- LIALIARIS, T., MOURELATOS, D. and DOZI-VASSILIADES, J., 1987. Enhancement and Attenuation of Cytogenetic Damage by Vitamin C in Cultured Human Lymphocytes Exposed to Thiopeta or L-Ethionine. *Cytogenet. Cell Genet.*, 44(4):209-14.
- LIU, Q., JIAO, Q.C., HUANG, X.M., JIANG, J.P., CUI S.Q., YAO, G.H., JIANG, Z.R., ZHAO, H.K. and WANG, N.Y., 1999. Genotoxicity of Drinking Water from Chao Lake. *Environ. Res.*, 80(2 Pt 1):127-31.
- LU, X., ZHANG, L. and WANG, R., 1999. Application of *In Vitro* Micronucleus Tests Using L5178Y Mouse Lymphoma and WTK1 Human Lymphoblastoid Cell Lines to Antimutagenicity Assay. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao.*, 30(3):283-5.
- MATHUR, S., KAUR, P., SHARMA, M., KATYAL, A., SINGH, B., TIWARI, M. and VHANDRA, R., 2004. The Treatment of Skin Carcinoma, Induced by UV B Radiation, Using Oxo-5beta,6-beta-epoxy-with a-2-enolide, Isolated from the Roots of *Withania somnifera*, in a Rat Model. *Phytomedicine*, 11(5):452-60.

- McDORMAN, K.S., PACHKOWSKI, B.F., NAKAMURA, J., WOLF, D.C. and SWENBERG, J.A., 2005. Oxidative DNA Damage from Potassium Bromate Exposure in Long-Evans Rats is not Enhanced by a Mixture of Drinking Water Disinfection By-Products. *Chem. Biol. Interact.*, 152(2-3):107-17.
- McLAREN, J., BOULIKAS, T. and VAMVAKAS, S., 1994. Induction of Poly(ADP-ribosyl)ation in the Kidney after *In Vivo* Application of Renal Carcinogens. *Toxicology*, 88(1-3):101-12.
- MEIER, J.R., BULL, R.J., STOBBER, J.A. and CIMINO, M.C., 1985. Evaluation of Chemicals Used for Drinking Water Disinfection for Production of Chromosomal Damage and Sperm-Head Abnormalities in Mice. *Environ. Mutagen.*, 7(2):201-11.
- MINNUNNI, M., WOLLEB, U., MUELLER, O., PFEIFER, A. and AESCHBACHER, H.U., 1992. Natural Antioxidants as Inhibitors of Oxygen Species Induced Mutagenicity. *Mutat. Res.*, 269(2):193-200.
- MONARCA, S., FERETTI, D., ZANI, C., RIZZONI, M., CASARELLA, S. and GUSTAVINO, B., 2005. Genotoxicity of Drinking Water Disinfectants in Plant Bioassays. *Environ. Mol. Mutagen.* [Epub ahead of print].
- MORALES-RAMIREZ, P., MENDIOLA-CRUZ, M.T. and CRUZ-VALLEJO, V., 1998. Effect of Vitamin C or Beta-Carotene on SCE Induction by Gamma Rays in Radiosensitized Murine Bone Marrow Cells *In Vivo*. *Mutagenesis*, 13(2):139-44.
- MORGAN, W.F., DJORDJEVIC, M.C., JOSTES, R.F. and PANTELIIAS, G.E., 1985. Delayed Repair of DNA Single-Strands Breaks Does Not Increase Cytogenetic Damage. *Int. J. Radiat. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, 48(5):711-21.
- MORSCHES, H. and HOLZMANN, H., 1982. Studies on the Percutaneous Absorption of Benzoyl Peroxide (author's transl). *Arzneimittelforschung*, 32(3):298-300.
- MUKHERJEE, A., GIRI, A.K., TALUKDER, G. and SHARMA, A., 1988. Sister Chromatid Exchanges and Micronuclei Formations Induced by Sorbic Acid and Sorbic Acid-Nitrite *In Vivo* in Mice. *Toxicol. Lett.*, 42(1):47-53.

- MUKHTAR, H., KATIYAR, S.K. and AGARWAL, R., 1994. Green Tea and Skin-Anticarcinogenic Effects. *J. Invest. Dermatol.*, 102(1):3-7.
- MUNZNER, R., GUIGAS, C. and RENNER, H.W., 1990. Re-Examination of Potassium Sorbate and Sodium Sorbate for Possible Genotoxic Potential. *Food Chem. Toxicol.*, 28(6):397-401.
- NACTH, S., YEUNG, D., BEASLEY, J.N. J.R., ANJO, M.D. and MAIBACH, H.I., 1981. Benzoyl Peroxide: Percutaneous Penetration and Metabolic Disposition. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 4(1):31-7.
- NAKAJIMA, M., KITAZAWA, M., OBA, K., KITAGAWA, Y. and TOYODA, Y., 1989. Effect of Route of Administration in the Micronucleus Test with Potassium Bromate. *Mutat. Res.*, 223(4):399-402.
- NAMIKI, M., UDAKA, S., OSAWA, T., TSUJI, K. and KADA, T., 1980. Formation of Mutagens by Sorbic Acid-Nitrite Reaction: Effects of Reaction Conditions on Biological Activities. *Mutat. Res.*, 73(1):21-8.
- NEFIC, H., 2001. Anticlastogenic Effect of Vitamin C on Cisplatin Induced Chromosome Aberrations in Human Lymphocyte Cultures. *Mutat. Res.*, 498(1-2):89-98.
- NJAGI, G.D. and GOPALAN, H.N., 1982. Cytogenetic Effects of the Food Preservatives--Sodium Benzoate and Sodium Sulphite on *Vicia faba* Root Meristems. *Mutat. Res.*, 102(3):213-9.
- O'CONNELL, J.F., KLEIN-SZANTO, A.J., DIGIOVANNI, D.M., FRIES, J.W. and SLAGA, T.J., 1986. Enhanced Malignant Progression of Mouse Skin Tumors by the Free-Radical Generator Benzoyl Peroxide. *Cancer Res.*, 46(6):2863-5.
- O'DONOGHUE, J., BARBER, E.D., HILL, T., AEBI, J. and FIORICA, L., 1999. Hydroquinone: Genotoxicity and Prevention of Genotoxicity Following Ingestion. *Food Chem. Toxicol.*, 37(9-10):931-6.
- ODUKOYA, O. and SHKLAR, G., 1984., Initiation and Promotion in Experimental Oral Carcinogenesis. *Oral Surg. Oral Med. Pathol.*, 58(3):315-20.
- OWUSU-YAW, J., WHEELER, W.B. and WEI, C.I., 1991. Genotoxicity Studies of the Reaction of Chlorine or Chlorine Dioxide with L-Tryptophan. *Toxicol. Lett.*, 56(1-2):213-27.

- ÖZER, K., 2003. Tüketiciler Birliği Web Sitesi (www.tuketiciler.org)
http://www.tuketiciler.org/dosya/ekmek.doc
- PARSONS, J.L. and CHIPMAN, J.K., 2000. The Role of Glutathione in DNA Damage by Potassium Bromate *In Vitro*. *Mutagenesis*, 15(4):311-6.
- PERMINOVA, I.N., SINEL'SHCHIKOVA, T.A., ALEKHINA, N.I., PERMINOVA, E.V. and ZASUKHINA, G.D., 2001. Individual Sensitivity to Genotoxic Effects of Nickel and Antimutagenic Activity of Ascorbic Acid. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 131(4):367-70.
- PERRY, P. and EVANS, H.J., 1975. Cytological Detection of Mutagen- Carcinogen Exposure by Sister Chromatid Exchange. *Nature*, 258,121-125.
- PREMKUMAR, K. and BOWLUS, C.L., 2003. Ascorbic Acid Reduces the Frequency of Iron Induced Micronuclei in Bone Marrow Cells of Mice. *Mutat. Res.*, 542(1-2):99-103.
- PHILIPOSE, B., SINGH, R., KHAN, K.A. and GIRI, A.K., 1997. Comparative Mutagenic and Genotoxic Effects of Three Propionic Acid Derivatives Ibuprofen, Ketoprofen and Naproxen. *Mutat. Res.*, 393(1-2):123-31.
- PLEWA, M.J., KARGALIOGLU, Y., VANKERK, D., MINEAR, R.A. and WAGNER, E.D., 2002. Mammalian Cell Cytotoxicity and Genotoxicity Analysis of Drinking Water Disinfection By-Products. *Environ. Mol. Mutagen.*, 40(2):134-42.
- POUL, J.M., HUET, S., GODARD, T. and SANDERS, P., 2004. 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):203-9.
- QIU, C., FU, F., GAO, Q., WANG, C. and WEN, Y., 2000. The Function of Benzoyl Peroxide in the Induction of Syrian Golden Hamster Tongue Carcinoma by Chemical Carcinogen. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 18(5):291-3.
- RACZ, G., SUJBERT, L., BOCSI, J. and SZENDE, B., 2004. Rapid Communication: Water Disinfection By-Products Enhanced Apoptotic Activity in Human Lymphocytes. *J. Toxicol. Environ. Health A.*, 67(17):1315-9.

- RAO, M.V., CHINOY, N.J., SUTHAR, M.B. and RAJVANSI, M.I., 2001. Role of Ascorbic Acid on Mercuric Chloride-Induced Genotoxicity in Human Blood Cultures. *Toxicol. In Vitro*, 15(6):649-54.
- RAY-CHAUDHURI, R., CURRENS, M. and IYPE, P.T., 1982. Enhancement of Sister-Chromatid Exchanges by Tumour Promoters. *Br. J. Cancer*, 45(5):769-77.
- RENCÜZOĞULLARI, E., and TOPAKTAŞ, M., 1991. The Relationship Between Quantities of Bromodeoxyuridine and Human Peripheral Blood with Determination of the Best Differential Staining of Sister Chromatids Using Chromosome Medium-B. *Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, (5), 19-24.
- RENCÜZOĞULLARI, E., KAYRALDIZ, A., İLA, H.B., ÇAKMAK, T. and TOPAKTAŞ, M., 2001a. The Cytogenetic Effect of Sodium Metabisulfite, a Food Preservative in Root Tip Cells of *Allium cepa* L. *Turkish J. of Biology*. 25:361-370.
- RENCÜZOĞULLARI, E., İLA, H.B., KAYRALDIZ, A. and TOPAKTAŞ, M., 2001b. Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange in Cultured Human Lymphocytes Treated with Sodium Metabisulfite, a Food Preservative. *Mutation Res.*, 490:107-112.
- RIVAS-OLMEDO, G., BARRIGA-ARCEO, S.D. and MADRIGAL-BUJADAR, E., 1992. Inhibition of Mitomycin C-Induced Sister Chromatid Exchanges by Vitamin C *In Vivo*. *J. Toxicol. Environ. Health*, 35(2):107-13.
- ROBICHOVA, S., SLAMENOVA, D., CHALUPA, I. and SEBOVA, L., 2004. DNA Lesions and Cytogenetic Changes Induced by N-nitrosomorpholine in HepG2, V79 and VH10 Cells: The Protective Effects of Vitamins A, C and E. *Mutat. Res.*, 560(2):91-9.
- ROBBIANO, L., CARROZZINO, R., PUGLIA, C.P., CORBU, C. and BRAMBILLA, G., 1999. Correlation Between Induction of DNA Fragmentation and Micronuclei Formation in Kidney Cells from Rats and Humans and Tissue-Specific Carcinogenic Activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 161(2):153-9.

- ROTHFUSS, A., SCHUTZ, P., BOCHUM, S., VOLM, T., ELBERHARD, E., KREINBERG, R., VOGEL, V. and SPEIT, G., 2000. Induced Micronucleus Frequencies in Peripheral Lymphocytes as a Screening Test for Carriers of a BRCA1 Mutation in Breast Cancer Families. *Cancer Res.*, 60:390-394.
- SAI, K., TAKAGI, A., UMEMURA, T., HASEGAWA, R. and KUROKAWA, Y., 1991. 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.
- SAI, K., HAYASHI, M., TAKAGI, A., HASEGAWA, R., SOFUNI, T. and KUROKAWA, Y., 1992. Effects of Antioxidants on Induction of Micronuclei in Rat Peripheral Blood Reticulocytes by Potassium Bromate. *Mutat. Res.*, 269(1):113-8.
- SAI, K., TYSON, C.A., THOMAS, D.W., DABBS, J.E., HASEGAWA, R. and KUROKAWA, Y., 1994. Oxidative DNA Damage Induced by Potassium Bromate in Isolated Rat Renal Proximal Tubules and Renal Nuclei. *Cancer Lett.*, 87(1):1-7.
- SAIZ, A.I., MARIQUE, G.D. and FRITZ, R., 2001. Determination of Benzoyl Peroxide and Benzoic Acid Levels by HPLC During Wheat Flour Bleaching Process. *Agric. Food Chem.*, 49(1):98-102.
- SALADINO, A.J., WILLEY, J.C., LECHNER, J.F., GRAFSTROM, R.C., LAVECK, M. and HARRIS, C.C., 1985. Effects of Formaldehyde, Acetaldehyde, Benzoyl Peroxide and Hydrogen Peroxide on Cultured Normal Human Bronchial Epithelial Cells. *Cancer Res.*, 45(6):2522-6.
- SALEEM, M., ALAM, A. and SULTANA, S., 2000. Attenuation of Benzoyl Peroxide Mediated Cutaneous Oxidative Stress and Hyperproliferative Response by the Propylactic Treatment of Mice with Spearmint (*Mentha spicata*). *Food and Chemical Toxicology*, 38(10):939-948.
- SALEEM, M., ALAM, A., ARIFIN, S., SHAH, M.S., AHMED, B. and SULTANA, S., 2001. Lupeol, a Triterpene Inhibits Early Responses of Tumor Promotion Induced by Benzoyl Peroxide in Murine Skin. *Pharmacol. Res.*, 43(2):127-34.

- SCHIFFMANN, D. and SCHLATTER, J., 1992. Genotoxicity and Cell Transformation Studies with Sorbates in Syrian Hamster Embryo Fibroblasts. *Food Chem. Toxicol.*, 30(8):669-72.
- SCHLATTER, J., WURGLER, F.E., KRANZLIN, R., MAIER, P., HOLLIGER, E. and GRAF, U., 1992. The Potential Genotoxicity of Sorbates: Effects on Cell Cycle *In Vitro* in V79 Cells and Somatic Mutations in *Drosophila*. *Food Chem. Toxicol.*, 30(10):843-51.
- SCHWEIZER, J., LOEHRKE, H., EDLER, L. and GOERTTLER, K., 1987. Benzoyl Peroxide Promotes the Formation of Melanotic Tumors in the Skin of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-Initiated Syrian Golden Hamsters. *Carcinogenesis*, 8(3):479-82.
- SEUBERT, S., SEUBERT, A. and IPPEN, H., 1984. Penetration of Benzoyl Peroxide in the Skin. *Hautarzt.*, 35(9):455-8.
- SHAH, V.C. and MITTAL, S.C., 1987. Studies on Sister Chromatid Exchange (SCE) Induction by Gamma-Irradiation and Protective Effect of L-Cysteine in HeLa Cells. *Strahlenther. Onkol.*, 163(1):54-60.
- SHARMA, S., KHAN, N. and SULTANA, S., 2004. Modulatory Effect of Gentisic Acid on the Augmentation of Biochemical Events of Tumor Promotion Stage by Benzoyl Peroxide and Ultraviolet Radiation in Swiss Albino Mice. *Toxicol. Lett.*, 153(3):293-302.
- SHARMA, S. and SULTANA, S., 2004. Effects of *Hibiscus rosa sinensis* Extract on Hyperproliferation and Oxidative Damage Caused by Benzoyl Peroxide and Ultraviolet Radiations in Mouse Skin. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 95(5):220-5.
- SHIRAISHI, F. and BANDOW, H., 1985. The Genetic Effects of the Photochemical Reaction Products of Propylene Plus NO₂ on Cultured Chinese Hamster Cells Exposed *In Vitro*. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 15(3-4):531-8.
- SHIRAISHI, F., HASHIMOTO, S. and BANDOW, H., 1986. Induction of Sister-Chromatid Exchanges in Chinese Hamster V79 Cells by Exposure to the Photochemical Reaction Products of Toluene Plus NO₂ in the Gas Phase. *Mutat. Res.*, 173(2):135-9.

SIDnitial Assessment Report For SIAM 15; 22-25 October 2002, Boston, USA.

(www.inchem.org/documents/sids/sids/BENZOYLPER.pdf)

SIPI, P., JARVENTAUS, H. and NORPPA, H., 1992. Sister-Chromatid Exchanges Induced by Vinyl Esters and Respective Carboxylic Acids in Cultured Human Lymphocytes. *Mutat. Res.*, 279(2):75-82.

SIPI, P., ROSENBERG, C., RUDEK, Z., JAPPINEN, P., VAINIO, H. and NORPPA, H., 1997. Cytogenetic Effects of Softwood Kraft Pulp Bleaching Effluents and Methanesulfonyl Chloride in Chinese Hamster Ovary Cells. *Mutat. Res.*, 390(1-2):105-12.

SLAGA, T.J., KLEIN-SZANTO, A.J., TRIPLETT, L.L., YOTTI, L.P. and TROSKO, K.E., 1981. Skin Tumor-Promoting Activity of Benzoyl Peroxide, a Widely Used Free Radical-Generating Compounds. *Science*, 213(4511):1023-5.

SPEIT, G., WICK, C. and WOLF, M., 1980. Induction of Sister Chromatid Exchanges by Hydroxylamine, Hydrazine and Isoniazid and Their Inhibition by Cysteine. *Hum. Genet.*, 54(2):155-8.

SPEIT, G., HOCHSATTEL, R. and VOGEL, W., 1984. The Contribution of DNA Single-Strand Breaks to the Formation of Chromosome Aberrations and SCEs. *Basic Life Sci.*, 29 Pt A:229-44.

SPEIT, G., 1984. Consideration on the Mechanism of Differential Giemsa Staining of BrdU-Substitued Chromosomes. *Hum. Genet.*, 67, 264-269.

SPEIT, G. and HAUPTER, S., 1985. On the Mechanism of Differential Giemsa Staining of Bromodeoxyuridine Substitued Chromosomes. II. Differences Between the Demonstration of Sister Chromatid Differantiation and Replication Patterns. *Hum. Genet.*, 70, 126-129.

SPEIT, G., HAUPTER, S., SCHUTZ, P. and KREIS, P., 1999. Comparative Evaluation of the Genotoxic Properties of Potassium Bromate and Potassium Superoxide in V79 Chinese Hamster Cells. *Mutat. Res.*, 439(2):213-21.

STICH, H.F., WEI, L. and LAM, P., 1978. The Need for a Mammalian Test System for Mutagens: Action of Some Reducing Agents. *Cancer Lett.*, 5(4):199-204.

- SUDA, D., SCHWARTZ, J. and SHKLAR, G., 1986. Inhibition of Experimental Oral Carcinogenesis by Topical Beta Carotene. *Carcinogenesis*, 7(5):711-5.
- SULTANA, S., ALAM, A., KHAN, N. and SHARMA, S., 2003. Inhibition of Benzoyl Peroxide and Ultraviolet-B Radiation Induced Oxidative Stress and Tumor Promotion Markers by Cycloartenol in Murine Skin. *Redox Rep.*, 8(2):105-12.
- SULTANA, S., ALAM, A., SHARMA, S. and KHAN, N., 2004. 13-Cis Retinoic Acid Ameliorates Benzoyl Peroxide-Induced Oxidative Stress and Hyperproliferative Response in Murine Skin: A Chemopreventive Study. *Cancer Detect. Prev.*, 28(3):200-7.
- SURH, Y.J., LIEM, A., MILLER, J.A. and TANNENBAUM, S.R., 1994. 5-Sulfooxymethylfurfural as a Possible Ultimate Mutagenic and Carcinogenic Metabolite of the Maillard Reaction Product, 5-hydroxymethylfurfural. *Carcinogenesis*, 15(10):2375-7.
- SURJAN, A., 1989. Analysis Of Genotoxic Activity of 16 Compounds and Mixtures by the *Drosophila* Mosaic Test. *Ann. Ist. Super Sanita*, 25(4):569-72.
- SUTIAKOVA, I., SUTIAK, V., RIMKOVA, S. and PORACOVA, J., 2004. Chromosome Damage in Peripheral Lymphocytes of Sheep Induced by Chlorine in Drinking Water. *Int. J. Environ. Health Res.*, 14(5):381-90.
- SUZUKI, T., HAYASHI, M., HAKURA, A., ASITA, A.O., KODAMA, Y., HONMA, M. and SOFUNI, T., 1995. Combination Effects of Clastogens in the Mouse Peripheral Blood Micronucleus Assay. *Mutagenesis*, 10(1):31-6.
- SWAUGER, J.E., DOLAN, P.M., ZWEIER, J.L., KUPPOSAMY, P. and KENSLER, T.W. 1991. Role of the Benzoyloxyl Radical in DNA Damage Mediated by Benzoyl Peroxide. *Chem. Res. Toxicol.*, 4(2):223-8.
- TAN, H.K., WHEELER, W.B. and WEI, C.I., 1987. Reaction of Chlorine Dioxide with Amino Acids and Peptides: Kinetics and Mutagenicity Studies. *Mutat. Res.*, 188(4):259-66.
- TAYAMA, S. and NAKAGAWA, Y., 1991, Sulfhydryl Compounds Inhibit the Cyto- and Geno-toxicity of O-phenylphenol Metabolites in CHO-K1 Cells. *Mutat. Res.*, 259(1):1-12.

- TOPAKTAŞ, M. and SPEIT, G., 1990. Sister Chromatid Exchange (SCE) Testinin Mutajenite ve Kanserojenitenin Belirlenmesinde Kullanılması. Ç. Ü. Sağlık Bil. Der., 5(1,2,3), 73-84.
- TOPAKTAŞ, M. and RENCÜZOĞULLARI, E., 1995. Sitogenetik. Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü. s. 68.
- TSUDA, H., KUSHI, A., YOSHIDA, D. and GOTO, F., 1981. Chromosomal Aberrations and Sister-Chromatid Exchanges Induced by Gaseous Nitrogen Dioxide in Cultured Chinese Hamster Cells. Mutat. Res., 89(4):303-9.
- TYRSINA, E.G., ROSSIKHINA, O.G., ABILEV, S.K. and TYRSIN, YU. A., 1994. Inhibition of the Bacterial Mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine by Ascorbic Acid and Ascorbyl Palmitate. Mutat. Res., 321(1-2):81-7.
- UMEMURA, T., KITAMURA, Y., KANKI, K., MARUYAMA, S., OKAZAKI, K., IMAZAWA, T., NISHIMURA, T., HASEGAWA, R., NISHIKAWA, A. and HIROSE, M., 2004. Dose-Related Changes of Oxidative Stress and Cell Proliferation in Kidneys of Male and Female F344 Rats Exposed to Potassium Bromate. Cancer Sci., 95(5):393-8.
- VICTORIN, K. and STAHLBERG, M., 1988. A Method for Studying the Mutagenicity of Some Gaseous Compounds in *Salmonella typhimurium*. Environ. Mol. Mutagen., 11(1):65-77.
- VICTORIN, K., BUSK, L., CEDERBERG, H. and MAGNUSSON, J., 1990. Genotoxic Activity of 1,3-Butadiene and Nitrogen Dioxide and Their Photochemical Reaction Products in *Drosophila* and in the Mouse Bone Marrow Micronucleus Assay. Mutat. Res., 228(2):203-9.
- VICTORIN, K. and STAHLBERG, M., 1991. Mutagenic Activity of Photoreaction Products Formed from Chlorinated Ethenes and Nitrogen Dioxide. Environ. Res., 55(2):178-87.
- VIJAYALAXMI, K.K. and VENU, R., 1999. *In Vivo* Anticlastogenic Effects of L-Ascorbic Acid in Mice. Mutat. Res., 438(1):47-51.

- VOGEL, R. and SPIELMANN, H., 1989. Beneficial Effects of Ascorbic Acid on Preimplantation Mouse Embryos After Exposure to Cyclophosphamide *In Vivo*. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 9(1):51-9.
- WALKER, R., 1990. Toxicology of Sorbic Acid and Sorbates. *Food Addit. Contam.*, 7(5):671-6.
- WEITBERG, A.B. and WEITZMAN, S.A., 1985. The Effect of Vitamin C on Oxygen Radical-Induced Sister-Chromatid Exchanges. *Mutat. Res.*, 144(1):23-6.
- WEITBERG, A.B., 1987. Antioxidants Inhibits the Effects of Vitamin C on Oxygen Radical-Induced Sister-Chromatid Exchanges. *Mutat. Res.*, 191(1):53-6.
- WOLF, D.C., CROSBY, L.M., GEORGE, M.H., KILBURN, S.R., MOORE, T.M., MILLER, R.T. and DEANGELO, A.B., 1998. Time- and Dose-Dependent Development of Potassium Bromate-Induced Tumors in Male Fischer 344 Rats. *Toxicol. Pathol.*, 26(6):724-9.
- WRISBERG, M.N. and VAN DER GAAG, M.A., 1992. *In Vivo* Detection of Genotoxicity in Waste Water from a Wheat and Rye Straw Paper Pulp Factory. *Sci. Total Environ.*, 121:95-108.
- YADAV, J.S. and SETH, N., 1998. Effect of NO_x on the Somatic Chromosomes of Goldsmiths. *Environ. Health Perspect.*, 106(10):643-7.
- YAMASHITA, Y., SUMI, N., ARIMOTO, S. and HAYATSU, H., 1995. Synergistic Action of N-nitrosodialkylamines and Near-UV in the Induction of Chromosome Aberrations in Chinese Hamster Lung Fibroblasts *In Vitro*. *Mutat. Res.*, 348(4):163-8.
- YEUNG, D., NACHT, S., BUCKS, D. and MAIBACH, H.I., 1983. Benzoyl Peroxide: Percutaneous Penetration and Metabolic Disposition. II. Effect of Concentration. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 9(6):920-4.
- YUAN, H. and ZHANG, Z., 1992. Some Factors Affecting Sister-Chromatid Differentiation (SCD) and Sister-Chromatid Exchange (SCE) in *Hordeum vulgare*. *Mutat. Res.*, 272(2):125-31.
- ZEILMAKER, M.J. and YAMASAKI, H., 1986. Inhibition of Junctional Intercellular Communication as a Possible Short-Term Test to Detect Tumor-

Promoting Agents: Result With Nine Chemicals Tested by Dye Transfer Assay in Chinese Hamster V79 Cells. *Cancer Res.*, 46(12 Pt 1):6180-6.

ZHAO, J., LAHIRI-CHATTERJEE, M., SHARMA, Y. and AGARWAL, R., 2000. Inhibitory Effects of a Flavonoid Antioxidant Silymarin on Benzoyl Peroxide-Induced Tumor Promotion, Oxidative Stress and Inflammatory Responses in SENCAR Mouse Skin. *Carcinogenesis*, 21(4):811-6.

http://www.bakingbusiness.com/refbook_results.asp?ArticleID=37148 (Additives Permitted in U.S. for Baked Foods (F.D.A.); Additives Permitted in Canada for Baked Foods (Health Canada))

<http://www.ekmekdunyasi.com/ekmekhastaliklari.htm>

http://www.naturalovens.com/lib/content/default/sci_articles/20ed1925a21cde16a13e65142127d20d/Toxin_Additives_in_Food_and_Drink.PDF (Additives Permitted in U.S. for Baked Foods (F.D.A.))

<http://www.ourcivilisation.com/bread.htm> (The Faltering Quality of Breads)

<http://www.vankim.com/products/askorbik.htm>

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Adana’da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Adana’da tamamladım. 1997 yılında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans öğrenimime başladım ve 2001 yılında bölüm birincisi, fakülte üçüncüsü olarak mezun oldum. Aynı yıl Ç. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimime başladım.